



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**INSENSIBILIDAD A H⁺ DE LOS CANALES TIPO K_{IR} EN
OLIGODENDROCITOS DEL NERVIO ÓPTICO DE LA RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. JUAN PABLO MOCTEZUMA HERNÁNDEZ

TUTORES:

DR ROGELIO ARELLANO OSTOA
DRA TERESA EDITH GARAY ROJAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
DR DANIEL REYES ARO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Santiago de Querétaro, Querétaro, a 1 de septiembre del 2017



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.

JURADO DE EXAMEN

DR. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Presidente

DR. Rogelio Arellano Ostoá

Secretario

DRA. Angelina Rodríguez Torres

Vocal

DR. Mauricio Díaz Muñoz

Suplente

DR. José Gerardo Rojas Piloni

Suplente

RESUMEN

Los oligodendrocitos (OLs), las células mielinizantes del Sistema Nervioso Central, expresan en su membrana canales de K^+ del tipo rectificador entrante (Kir). Existen 7 subfamilias (1-7) de canales Kir. Los canales funcionales se ensamblan en tetrámeros homoméricos o heteroméricos y son modulados dependiendo de su conformación por factores como el ATP y los H^+ . La subunidad Kir 4.1 está asociada con la maduración de los OLs, ya que animales nulos para dicha subunidad presentan ausencia de la corriente Kir, así como un mayor número de células oligodendrogiales inmaduras que provoca hipomielinización. Sin embargo, la identidad molecular de los canales Kir en los OLs aún no ha sido demostrada, si bien la interacción heteromérica de la subunidad Kir 4.1 con la Kir 5.1 y con la Kir 2.1 en otros tipos celulares si lo es. Las corrientes iónicas a través de los canales conformados por combinaciones entre estas tres subunidades son inhibidas por H^+ con la siguiente relación de potencias: heterómero Kir 4.1/5.1 >> homómeros Kir 4.1 >> Kir 2.1. Un estudio de la sensibilidad a los H^+ de la corriente Kir en OLs daría por lo tanto información de la posible estequiometría del canal. En este estudio, utilizamos la técnica de "patch-clamp" estándar para explorar esta característica de las corrientes Kir de OLs purificados del nervio óptico de la rata. Encontramos que las corrientes son insensibles al pH en el rango de 5.0 a 8.0. La ausencia de sensibilidad a los H^+ no parece deberse a la difusión de componentes del citoplasma característica de la técnica utilizada, ya que el uso de la modalidad de "parche perforado" con gramicidina no alteró la insensibilidad observada del canal. Además, las subunidades clonadas de los OLs, expresadas heterológamente, presentaron una sensibilidad al pH con una potencia similar a la encontrada en otros tipos celulares, por lo que su insensibilidad en los OLs no puede ser explicada por cambios en su secuencia. Los datos sugieren que la sensibilidad al pH de la corriente Kir en los OLs es regulada de manera extrínseca, a través de cambios postraduccionales o a través de moléculas accesorias al canal que provocan su insensibilidad a los H^+ . Alternativamente, entre otras posibilidades, los canales estudiados en los OLs podrían no corresponder con homómeros de Kir 4.1 o con heterómeros de esta subunidad con Kir 5.1 o Kir 2.1.

ABSTRACT

Oligodendrocytes (OLs), the central nervous system myelinating cells, express inward rectifier K⁺ channels (Kir). Seven Kir channel subtypes (Kir1-7) are known. Functional channels assemble as homomeric or heteromeric tetramers, and modulators such as ATP and H⁺ can regulate them depending on their conformation. It is known, that Kir 4.1 subunit is involved in OLs maturation process, since Kir 4.1 KO model shows that Kir current is downregulated and causes an increase of immature oligodendroglia cell number and hypomyelination. Nevertheless, the molecular identity of Kir channels expressed in OLs remains imprecise, given that Kir 4.1 present heteromeric interactions with Kir 2.1 or Kir 5.1 in other cell types. These Kir channels are sensitive to intracellular H⁺ and are inhibited with the following potency: heteromer Kir 4.1/5.1 >> homomers Kir 4.1 >> Kir 2.1. Taking advantage of this fact, we studied the sensitivity to H⁺ of Kir currents expressed in OLs, in order to get information about the possible stoichiometry of the endogenous channel. Here, we probed electrophysiologically, that in OLs from the optic nerve of the rat, Kir currents were insensitive to H⁺ within the range of pHi 5.0 to 8.0. This insensitivity to H⁺ was not provoked by a cytoplasmic component dilution, a common consequence of the “standard” patch-clamp technique, because using the gramicidin “perforated” patch-clamp technique did not change the result. Moreover, Kir subunits cloned from OLs, that were expressed in *X. laevis* oocytes through the injection of the respective cRNA, displayed sensitivity to H⁺, matching to that shown in previous studies. Thus, our data suggested that sensitivity to H⁺ of Kir channels in OLs is regulated by an extrinsic factor(s), for example, among several possibilities, through specific postranscriptional changes or by accessory molecules that conferred insensitivity to H⁺. Alternately, among other possibilities, the channels studied in OLs may not correspond with Kir 4.1 homomers or with heteromers of this subunit with Kir 5.1 or Kir 2.1.

AGRADECIMIENTOS

Ésta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neurofisiología Celular (D-13) del departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM bajo la dirección del DR Rogelio Arellano Ostoa y la DRA Teresa Edith Garay Rojas. Y financiada por **PAPIIT DGAPA** No. IN205615 y **CONACyT** No. 252121 (R.O.A). Durante la maestría recibí apoyo de **CONACyT** (número de becario 696027), **UNAM** por parte del **PAEP** y el Estado de Querétaro por el **CONCyTEQ**.

Extiendo mis agradecimientos a:

La Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología por la oportunidad de continuar con mi formación académica dentro de sus prestigiosas aulas y laboratorios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por favorecer el comienzo de mi formación científica.

El DR. Arellano y la DRA. Garay por su gran apoyo e invaluable enseñanzas durante mis estudios de maestría y en la dirección de ésta tesis.

El DR. Díaz y el DR. Haro por sus destacadas contribuciones como miembros del Comité Tutor.

La M. en C. Leonor Casanova Rico por el apoyo y asistencia como jefe de la Unidad de Enseñanza y Estudios de Posgrado.

Los compañeros de laboratorio Abraham, Letty, Osvaldo y Pablo que con sus consejos y apoyo contribuyeron a que el trabajo siempre se realizara de la mejor manera.

Los compañeros y amigos de la Maestría con quienes creamos gratas y enriquecedoras memorias.

D E D I C A T O R I A S

Difícilmente se concretarían metas tan complicadas sin una fuente de motivación y un pilar emocional.

A ustedes la gran fortaleza de mi vida:

Mis padres José y Carmen, y mi hermano Jesús.

Por mostrarme cada día lo mejor de la vida aún en los momentos más adversos.

A la mujer más bondadosa en el planeta:

A María

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. SISTEMA NERVIOSO	5
2.2. CÉLULAS GLIALES	5
2.3. LOS OLIGODENDROCITOS	6
2.4. IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LA MIELINIZACIÓN AXÓNICA.	7
2.5. CANALES IÓNICOS.	9
2.6. CANALES DE POTASIO K ⁺ .	10
2.7. CANALES KIR	12
2.8. MODULACIÓN DE KIR POR PHi.	14
2.9. CORRIENTE TIPO KIR EN OLIGODENDROCITOS Y ASTROCITOS.	15
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	21
4.1. OBJETIVO GENERAL	21
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5. METODOLOGÍA	23
5.1. ANIMALES	23
5.2. CULTIVO PRIMARIO DE OLIGODENDROCITOS	23
5.3. OBTENCIÓN DE OVOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i> .	24
5.4. MICROINYECCIÓN DE cRNA.	25
5.5. DESFOLICULACIÓN DE OVOCITOS.	25
5.6. ELECTROFISIOLOGÍA.	26
5.6.1. CONTROL DE VOLTAJE EN CONFIGURACIÓN DE CÉLULA COMPLETA ESTÁNDAR Y DE “PARCHE PERFORADO” CON GRAMICIDINA.	26
5.6.3. MONITOREO DE LOS CAMBIOS DE PHi POR MÉTODOS FLUOROMÉTRICOS.	28
5.6.4. PHi EN OVOCITOS DE <i>X. LAEVIS</i> POR EL MÉTODO “RATIOOCYTE”.	29
6. RESULTADOS	30

6.1. CARACTERIZACIÓN DE LA CORRIENTE KIR EN OLS Y SU CURSO TEMPORAL DE EXPRESIÓN <i>IN VITRO</i>.	30
6.2. INSENSIBILIDAD A H⁺ DE LAS CORRIENTES KIR EN OLS.	34
6.3. CORRIENTES KIR MONITOREADAS CON LA TÉCNICA DE "PARCHE PERFORADO" Y SU SENSIBILIDAD A LA ACIDIFICACIÓN INTRACELULAR EN OLS.	37
6.3. SECUENCIA DE LAS SUBUNIDADES KIR CLONADAS DE LOS OLS.	41
6.4. SUBUNIDADES KIR DE OLS EXPRESADAS HETERÓLOGAMENTE EN OVOCITO DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>.	43
6.6. CAMBIOS EN pHi DE OVOCITOS MONITOREADOS POR "RATIOOCYTE".	44
6.7. SENSIBILIDAD A H⁺ DE LAS SUBUNIDADES KIR PROVENIENTES DE NERVIO ÓPTICO DE RATA EXPRESADAS EN OVOCITO.	46
6.5. INTERACCIÓN KIR 4.1/2.1	50
<u>7. DISCUSIÓN</u>	<u>52</u>
<u>8. CONCLUSIONES</u>	<u>61</u>
<u>9.REFERENCIAS</u>	<u>62</u>
ÍNDICE DE FIGURAS	69
APÉNDICE	70

1. INTRODUCCIÓN

La función principal de los tractos neuronales es transmitir información entre diversas regiones del cerebro y a distintas partes del cuerpo. Esta información debe ser transmitida muchas veces a largas distancias con rapidez, esto es posible gracias a la función de células altamente especializadas, que pertenecen al conjunto de células gliales, llamadas oligodendrocitos (OLs) en el sistema nervioso central (SNC), y células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP). Estos tipos celulares, envuelven a los axones de las neuronas con una vaina de membrana glial, con características aislantes, y que se le conoce como vaina de mielina (Faivre-Sarrailh et al., 2013).

Además de la mielinización, los OLs participan en el control de la concentración extracelular de K^+ , tarea que realizan en conjunto con los astrocitos. Esta función es de suma importancia durante la generación de potenciales de acción (PA), ya que permite la adecuada homeostasis del K^+ , ión esencial en el mantenimiento del potencial de membrana y la generación del mismo PA. Esta función se lleva a cabo gracias a la alta permeabilidad al K^+ que poseen tanto los OLs como los astrocitos. El componente molecular que les confiere dicha capacidad son los canales de potasio tipo Kir, particularmente los canales conformados por la subunidad Kir 4.1.

Los efectos de la ausencia de expresión de esta proteína, se observaron en experimentos donde el gen Kir 4.1 fue noqueado, obteniéndose un fenotipo con discapacidad motriz y muerte prematura (Neuch et al., 2001). A nivel celular los OLs fueron el tipo celular más afectado lo que resultó en una severa hipomielinización de los axones, así como una alta proporción de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs). Esto ha llevado a proponer que la subunidad Kir 4.1 estaría implicada también en el proceso de la maduración del linaje oligodendroglial.

A pesar de las funciones esenciales que parecen tener los canales rectificantes en los OLs aún no se conoce cuál es la identidad molecular del canal expresado, pues como se sabe, estos canales para ser funcionales conforman tetrámeros. Si bien, la participación principal de la subunidad Kir 4.1 no está en controversia, al ser conformados los canales por cuatro subunidades, es probable que se conformen ya sea como homómeros sí es

solo por Kir 4.1, o como heterómeros sí son conformados por subunidades diferentes incluyendo la subunidad Kir 4.1. Se sabe que la subunidad Kir 4.1 pueden interaccionar con otras subunidades tales como las subunidades Kir 5.1 y Kir 2.1 para formar canales funcionales (Pessia et al., 2001, Kubo et al., 2005, Hibino et al., 2010).

Una herramienta experimental que ayudaría a determinar la posible conformación del canal sería a través de su sensibilidad al pH intracelular (pHi); por ejemplo, los canales Kir 4.1 homoméricos son inhibidos al aumentar la concentración de iones H⁺ con un pKa de 6.0, mientras que los heterómeros Kir 4.1/5.1 son inhibidos con un pKa de 7.4 (Pessia et al., 2001; Hibino et al., 2010).

En experimentos recientes, hemos mostrado que los OLs expresan el mRNA que codifica para las subunidades Kir 2.1, Kir 4.1 y Kir 5.1. Además, utilizando la técnica de control de voltaje en su configuración estándar de célula completa, mostramos que las corrientes iónicas del tipo Kir generadas en los OLs no parecen ser sensibles a una disminución del pHi a pH 6.0, en el mismo rango al cual son inhibidos los canales homoméricos de Kir 4.1 y los heteroméricos de Kir 4.1/5.1. Es así que, en el presente estudio ampliamos el rango del pHi analizado sobre las corrientes Kir, y también exploramos posibles explicaciones para su insensibilidad a H⁺: 1) La participación de elementos citoplásmicos que hubieran sido dializados durante la técnica de registro de célula completa, y 2) Una posible heteromerización de subunidades Kir, expresando heterologamente las subunidades Kir clonadas a partir del mRNA de los OLs de nervio óptico.

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistema Nervioso

El SN está conformado fundamentalmente por dos tipos de células neurales: las neuronas y las células gliales. Estos dos tipos celulares fueron observados y catalogados morfológicamente desde mediados del siglo XIX y principios del siglo XX por varios científicos como Santiago Ramón y Cajal -padre de la teoría neuronal-, Camillo Golgi, Rudolf Virchow, Pio del Rio Hortega, entre muchos otros investigadores quienes cimentaron las bases de la neurociencia moderna. Las neuronas se especializan en transmitir señales eléctricas de manera rápida en forma de potenciales de acción, mientras que, las células gliales presentan excitabilidad mediada por incrementos de calcio intracelular, no generan potenciales de acción y regulan la homeostasis del SNC, lo que permite a las neuronas llevar a cabo su tarea de recibir, transmitir y procesar la información (Somjen, 1988, Purves et al., 2007, Allen y Barres, 2009, Parpura et al., 2012, Parpura y Verkhratsky, 2012).

2.2. Células Gliales

Las células gliales o neuroglía fueron descritas por primera vez por Rudolf Virchow a mediados del siglo XIX, como un tejido conectivo que une elementos neuronales, de ahí el nombre propuesto por Virchow "nervenkit", que se puede traducir del alemán como neuro-cemento o neuro-pegamento (Verkhratsky & Butt, 2013). Rudolf Virchow anunció el concepto de neuroglía el 3 de abril de 1858 en el Nuevo Instituto de Patología de la Universidad de Berlín (Kettenman & Verkhratsky, 2008) con el siguiente enunciado: *"Hasta ahora, caballeros, al considerar el sistema nervioso, sólo he hablado de algunas partes de éste. Pero si queremos estudiar el sistema nervioso y su relación real en el cuerpo, es extremadamente importante tener conocimiento acerca de una substancia que*

se encuentra entre los componentes nerviosos, los mantiene unidos y también, en un mayor o menor grado les otorga su forma”.

A lo largo de los años muchos científicos describieron células o componentes celulares con características semejantes a las descritas por Virchow, inclusive antes de que él mismo hiciera ver su importancia en el SN. Por ejemplo, Robert Remak quien en 1838 encontró unas vainas que recubrían a las fibras nerviosas, Heinrich Müller quien publicó en 1851 las primeras imágenes de la glía de la retina llamadas después “células de Müller”, nombre acuñado por Albert Kölliker en 1852. Un poco después en 1857, Karl Bergman identificó células gliales en el cerebelo, sólo por mencionar algunos ejemplos de científicos que reconocieron componentes celulares distintos a las neuronas (Verkhatsky, 2010). Actualmente, se acepta ampliamente que todas las funciones fundamentales del sistema nervioso son reguladas, de manera directa o indirecta, a través de la comunicación neurona-neuroglía, e.g., el metabolismo y la viabilidad neuronal, la transmisión sináptica, la propagación del impulso nervioso, la respuesta inmune dentro del SNC, el desarrollo y la diferenciación de estas células, entre muchas otras (Susuki, 2013).

La relación que se establece entre las neuronas y las células gliales clasificadas como oligodendrocitos, sin duda es la más estrecha y de mayor extensión en el SN. Esta relación apareció en la evolución según los registros fósiles hacia el periodo paleozoico (ca. 400 millones de años) en un grupo de placodermos, los primeros peces provistos de mandíbula. Los hallazgos fósiles de cráneos con huellas de los nervios craneales apoyan la idea de que la evolución de los placodermos fue favorecida por las ventajas que un sistema de rápida conducción nerviosa, con axones mielinizados (Zalc et al., 2008).

2.3. Los oligodendrocitos

Los OLs son las células mielinizantes del SNC y fueron descritas inicialmente por Pío del Río Hortega en 1921. Estas células son el producto final de un linaje celular precursor que se diferencia a través de un complejo y preciso programa de proliferación y migración,

hasta llegar a ser células maduras capaces de mielinizar axones en el SNC. Los OLs están presentes tanto en la materia gris como en la materia blanca y están implicados en diversas funciones tales como: 1) La propagación rápida del potencial de acción (PA) en los axones mielinizados; los cuales constituyen la mitad del volumen del cerebro humano (Czopka et al., 2013). 2) la regulación de la concentración de iones K^+ en el espacio extracelular (*buffering* de K^+), lo cual es debido principalmente a la alta permeabilidad para estos iones de un tipo de canales expresados en su membrana, los llamados, canales de potasio de rectificación entrante o de tipo Kir. 3) El soporte metabólico de las neuronas, función que realizan en conjunto con otros tipos de células gliales (Kalsi et al., 2004, Kettenmann & Ramsom, 2013).

2.4. Importancia biológica de la mielinización axónica.

La velocidad de conducción del PA puede llegar a ser una limitante en el flujo de información y su procesamiento en el SN. Como la conducción del PA requiere flujo pasivo (movimiento de iones a través de canales) y activo (movimiento de iones a través de bombas y transportadores) de corriente, la velocidad de propagación de un PA está determinada por ambos fenómenos. Varios mecanismos que permitían optimizar la propagación de señales a lo largo de los axones fueron apareciendo a lo largo de la evolución. Por ejemplo, una de las estrategias evolutivas que aumentan la velocidad en la propagación de las señales, es el incremento en el diámetro del axón, y por lo tanto disminuyendo la resistencia interna al flujo pasivo de corriente aumentando su velocidad de propagación. El consiguiente aumento en la velocidad explicaría que invertebrados, como el calamar, desarrollaran axones gigantes (cerca de 1 mm de diámetro) en sus circuitos neuronales responsables de comportamientos de sobrevivencia como la huida (Purves et al., 2007).

Otra estrategia para disminuir el flujo pasivo es aislar la membrana axónica; esta estrategia es evidente en la mielinización de los axones (Seidl, 2013). La mielina modifica las propiedades eléctricas pasivas de la membrana neuronal, aumentando las constantes de tiempo (τ) y de espacio (λ) de las propiedades de cable del axón. Como ocurre en los vertebrados, los axones están aislados por varias capas de mielina, comúnmente a este

arreglo se le llama la vaina de mielina, el cual permite la rápida propagación de los impulsos nerviosos a velocidades 10 veces mayores que la de axones amielínicos del mismo diámetro, i.e., mientras las velocidades de conducción de los axones amielínicos varían entre unos 0.5 y 10 ms⁻¹, los axones mielinizados pueden conducir a velocidades de hasta 150 ms⁻¹.

Los axones mielinizados tienen regiones sin recubrir, de aproximadamente 1 μm, a estas zonas se les llama nodos de Ranvier, mientras que a las zonas cubiertas se les conoce como zonas internodales (Figura 1.; Aracibia-Carcamo et al., 2014). En la zona del nodo de Ranvier se concentran moléculas de importancia para la propagación del PA, por ejemplo, los canales de Na⁺ y de K⁺ dependientes de voltaje. Cuando el impulso nervioso se propaga a través de un axón mielinizado, la despolarización se transmite de nodo en nodo, por lo que se dice que se lleva a cabo un fenómeno de propagación “saltatoria”, que aumenta la velocidad de conducción. Además, el nodo es el único espacio donde el axón puede movilizar nutrientes como lactato y piruvato entre otros, ayudado por transportadores especializados (e.g., transportador de monocarboxilato o MCT) presentes en la membrana oligodendroglial. Así que, los nodos no solo son importantes en la transmisión de señales, sino que cumplen un papel importante en el metabolismo de la neurona (Lee et al., 2012).

Se sabe que el proceso de mielinización es continuo, comienza en el nacimiento y se lleva a cabo hasta por lo menos la tercera década de vida en los humanos (Jahn et al., 2009, Miller et al., 2012), siendo indispensable, durante todo el proceso el suministro de nuevos OLs maduros. Un evento clave para que los OLs no lleguen a su estadio mielinizante es que el precursor de estos (OLs pre-mielinizante) sean incapaces de madurar, y este evento de transición entre OLs pre-mielinizante a OLs mielinizante se ha observado que es mediado al menos en parte por canales iónicos (Sontheimer et al., 1989), en este contexto se ha establecido la relación entre la expresión de canales tipo Kir y el proceso de maduración de los OLs (Neusch et al., 2001).

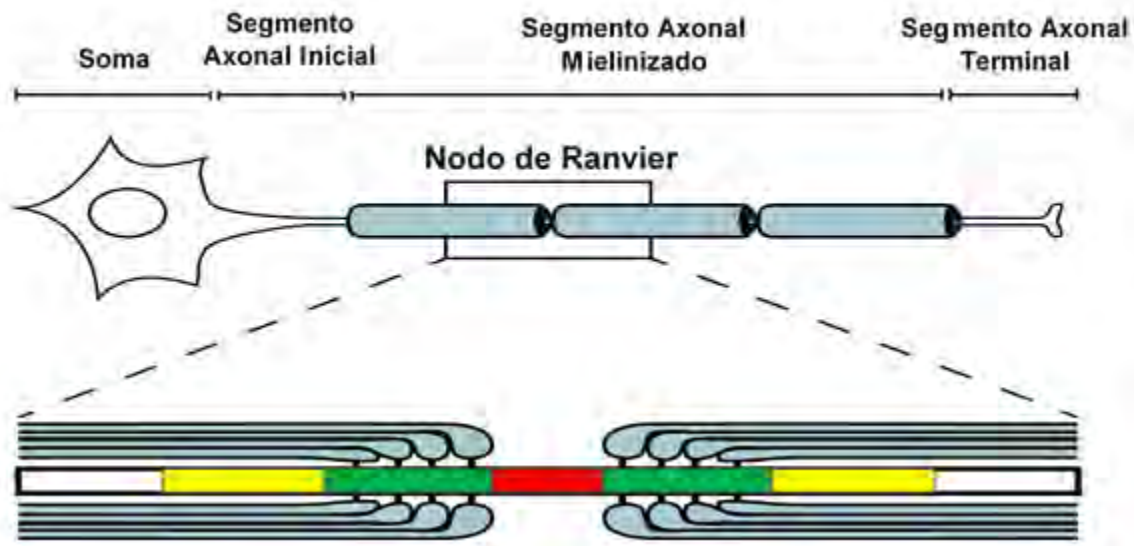


Figura 1. Esquema del axón mielinizado.

El esquema muestra las regiones principales de una neurona, el axón, y la vaina de mielina. Las regiones de esta última están detalladas en el esquema inferior en la zona del nodo de Ranvier. En el nodo, región desprovista de mielina, existe una alta concentración de canales Na_v (segmento de color rojo), en el paranodo, la vaina de mielina se fija al axón mediante múltiples proteínas (segmento de color verde), y en el juxtapanodo se localizan la mayor cantidad de canales K_v (segmento de color amarillo; Modificado de Aracibia-Carcamo et al., 2014).

2.5. Canales Iónicos.

Hace más de 3 mil millones de años, al originarse las primeras células simples con la característica de poseer una membrana de lípidos que las separaba del medio externo, se propició la evolución de componentes que permitían el intercambio de información con el medio externo, así como el intercambio de substratos vitales para la célula. Estos componentes, que pudieron haber comenzado como simples poros en la membrana, fueron adquiriendo selectividad para realizar determinados procesos y dando origen a los diferentes tipos de canales iónicos. Los canales iónicos guardan la misma utilidad para transmitir señales, que la que tienen las enzimas en el aspecto metabólico de la célula.

Estos canales son proteínas integrales de la membrana celular y juegan un papel clave en la fisiología de la membrana, tanto de células excitables como no excitables (Hille 2001). Los canales se pueden clasificar en función del ión para el que muestran permeabilidad selectiva, y esta cuestión es clave en el estudio de estas estructuras, por ejemplo, los canales de potasio son capaces de permear iones de potasio, pero no de sodio, a pesar de que el radio de Pauling del ión de potasio es sólo 0.4 Å mayor que el de los iones de sodio (Fowler et al., 2008). Los canales iónicos también se pueden clasificar en función de las circunstancias o elementos que provocan su apertura. Un canal puede estar abierto de forma permanente, de manera que el gradiente electroquímico es el único parámetro que determina el paso del ión o no a través del canal, y son denominados canales de fuga, pero por otro lado, existen canales que regularmente están cerrados y son abiertos en respuesta: a) a la despolarización o modificación del potencial de membrana (e.g., canales dependientes de voltaje de Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻); b) a ligandos extracelulares que interactúan con dominios específicos del canal (e.g., la acetilcolina (ACh), la serotonina (5-HT), la dopamina, y el ácido γ -amino butírico (GABA), etc.); c) a ligandos intracelulares (subunidades de proteínas G, al ATP, etc.) y d) a fuerzas mecánicas que tensionan o distienden la molécula que conforma el canal (Florez 1997; Waszkielewicz et al., 2013).

2.6. Canales de Potasio K⁺.

Los canales de potasio son macromoléculas que por mucho representan el tipo de canales iónicos de mayor diversidad, expresados tanto en bacterias como en plantas y en animales. Las subunidades moleculares que los componen son codificadas por aproximadamente 80 genes llamados KCN (Maljevic et al., 2012). Están involucrados en diversos fenómenos fisiológicos celulares, por ejemplo, uno de ellos de gran importancia para las células excitables, es la repolarización de la membrana de un axón ante la generación del PA. Durante un PA, los canales de sodio voltaje dependientes (Na_v) se activan lo que provoca la despolarización de la membrana celular, esto es seguido de la apertura de los canales de potasio dependientes del voltaje (K_v), quienes repolarizan la

membrana al permitir el flujo de iones K^+ hacia afuera de la célula. Esta característica ilustra la importancia de la selectividad de los canales iónicos, por ejemplo, si en el PA, a los iones sodio se les permitiera moverse libremente a través de los canales K_v , el sodio competiría con el eflujo de potasio, y la repolarización de la membrana no ocurriría (Hille 1984; Nimigean et al., 2011). Esta situación exhibe la característica que tiene un canal para seleccionar el ión que fluirá a través de él, este concepto de permeabilidad selectiva para iones de la membrana celular fue postulado por Julius Bernstein en 1902 (Hille 1970).

Se ha mencionado que los canales de potasio están involucrados en una gran diversidad de procesos fisiológicos, no es de extrañar entonces, que para poder cubrir esta diversidad funcional los canales presenten diversas características, que de manera general han sido utilizadas para poder clasificarlos, así podemos identificar, a los canales de potasio activados por Ca^{2+} (K_{Ca}), los canales de dos poros (K_{2P}), los canales de potasio sensibles al voltaje (K_v) y los canales de rectificación entrante (canales tipo Kir)

Una característica de gran importancia y bastante bien conservada en todos los canales de K^+ , es la región conocida como “filtro selectivo”, conformada por el motivo: Glicina o Fenilalanina, Tirosina, Glicina, X aminoácido y Tirosina (G(F)YGXY). Esta región le da identidad a los canales de potasio pues discrimina el paso de iones, que como ya se ejemplificó para el caso de los K_v en neuronas, es de importancia fundamental (Coetzee et al., 2006, Hibino et al., 2010, McCoy et al., 2013, Tsantoulas et al., 2014). El filtro selectivo expone una cadena de oxígenos del carbonilo terminal de cada aminoácido los cuales unen a los iones de K^+ lo que permite su movimiento dentro del poro del canal de potasio (Figura 2). La estructura del canal sugiere que se forman 4 sitios de unión iónica (S1-S4) por los oxígenos de los carbonilos dentro del poro, así el potasio por su preferencia hacia un ambiente quelante octaédrico, se ajusta en estos sitios de unión, y, por el contrario, el ión sodio prefiere ambientes quelantes tetraédricos, siendo esto parte del fundamento fisicoquímico para la selectividad de los canales por el ión potasio (Bhate et al., 2010).

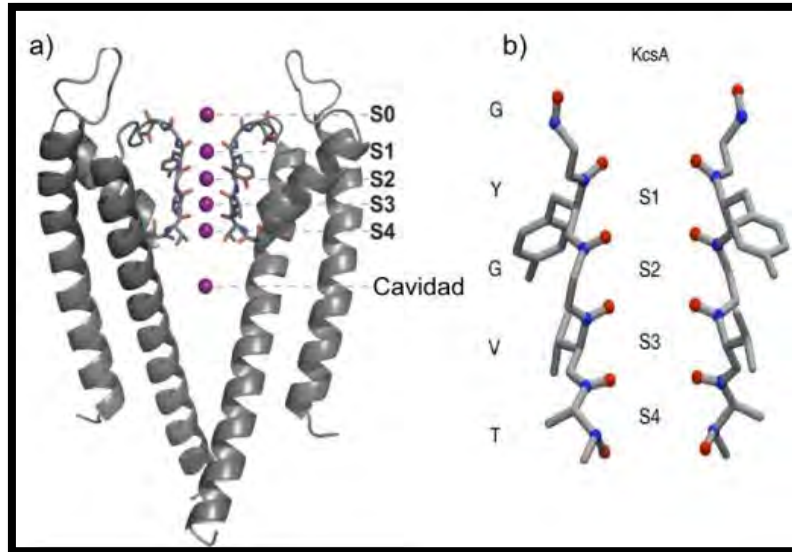


Figura 2. Estructura de canales de K⁺ (KcsA) de *Streptomyces lividans*.

El canal **KcsA** ha sido usado como modelo de estudio de la conducción iónica y “compuerta” de los canales de K⁺. **A** El esquema muestra dos subunidades del canal KcsA señalando los oxígenos de carbonilos que conforman los sitios de unión al K⁺ (S1 al S4), S0 indica la posición del ión en el espacio extracelular antes de entrar en contacto con el canal. **B** El filtro selectivo conformado por el motivo GYGVT de dos subunidades de KcsA, S1-S4 son los sitios de unión iónica (modificado de Fowler et al., 2008; Nimigean et al., 2011).

2.7. Canales Kir

Dentro del vasto número de canales de potasio se encuentran los canales de potasio de rectificación entrante (Kir por sus siglas en inglés *inward rectifier K⁺ channel*), estos canales se distinguen por conducir el flujo de iones K⁺ de forma más eficiente hacia el interior de la célula. Hace 68 años Bernard Katz (1949) describió por primera vez el fenómeno de la rectificación entrante como una “corriente anómala” en el músculo esquelético de la rana, poco después en 1960 se describieron conductancias iguales en músculo cardíaco y posteriormente en diversos tejidos tanto en mamíferos como en anfibios; ahora se conoce que estas corrientes fluyen a través de los canales de potasio tipo Kir. La clonación de estos canales de manera independiente en 1993 por Ho (Ho et

al., 1993) y Kubo (Kubo et al., 1993), permitió el estudio del mecanismo por el cual se lleva la rectificación entrante y se han logrado elucidar los componentes estructurales que los conforman. Hasta ahora han sido identificadas 7 subfamilias de estos canales, que son codificadas por 15 genes conocidos como KCNJ. Las subfamilias se pueden distinguir por la intensidad con la que rectifican y por responder a diferentes estímulos celulares y del medio extracelular, provocando una pérdida o ganancia de la función; que se refleja en una menor o mayor corriente rectificante (Anumonwo & Lopatin, 2010, Bichet et al., 2003, Nichols & Lopatin, 1997).

La propiedad de rectificación entrante de los canales Kir es debido a su bloqueo por Mg^{2+} o por poliaminas en potenciales despolarizantes. Los elementos estructurales que otorgan la propiedad rectificante fueron identificados a través de estudios de mutagénesis en canales Kir2.1 (Fujiwara et al., 2002). Además, los canales Kir pueden también ser regulados por varios factores tales como lípidos de membrana como el fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP_2), y por subunidades de las proteínas G, así como por la concentración de iones extracelulares, por el pH intracelular, por proteínas cinasas, y varios otros (Du et al. 2004, Wang, 2011).

La estructura de los canales Kir tiene una región transmembranal y otra citoplásmica, presentan dos dominios transmembranales por subunidad, un canal completo es un homo- o hetero-tetramero. Cada subunidad tiene una región conservada en todos los canales de potasio, la región P, la cual contiene el motivo selectivo para iones K^+ destacado anteriormente: G (F) Y G X T. Su estructura incluye una hélice adicional llamada hélice deslizante, la cual se desplaza sobre la cara citoplasmática de la membrana celular favoreciendo el cambio de conformación de un estado cerrado a uno abierto al interactuar con factores como el PIP_2 , el dominio conservado de PKKR se ha propuesto como el sitio de unión a PIP_2 (Nichols et al., 1997, Suh et al., 2008, Hansen et al., 2011). En la conformación cerrada de estos canales el dominio transmembranal 1 (M1) hace contacto con el transmembranal 2 (M2) y adquieren la forma de un “tipi” invertido impidiendo el paso de iones debido a un residuo de fenilalanina que provee un ambiente desfavorable para el paso de los iones K^+ , a esta zona se le llama haz o hélice de cruce (Bichet et al., 2003, Khurana et al., 2011).

La porción citoplásmica está constituida por el amino y el carboxilo terminales y representa dos tercios de la secuencia de aminoácidos del canal Kir (Bichet et al., 2003). La característica más interesante de esta sección del canal es que forma un poro del lado citoplasmático (Figura 3) que mide alrededor de 30 Å de largo y entre 7 a 15 Å de diámetro. Este poro presenta regiones de interacción con espermina y las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G, provocando la rectificación entrante y el control de la compuerta o “gating”, respectivamente (Nishida et al., 2002).

2.8. Modulación de Kir por pHi.

Durante los fenómenos fisiológicos en los que intervienen los canales Kir, su compuerta puede ser regulada por estímulos específicos los cuales causan que los canales pasen de un estado abierto al estado cerrado.

Un ejemplo importante de estos estímulos es el pH intracelular, el cual se sabe que induce el cierre de canales Kir cuando el pH disminuye. Anteriormente, se pensaba que un componente clave para la sensibilidad al pHi, era un residuo de lisina en el dominio M1 en la región “hélice de cruce” (Figura 3, Pessia et al., 2001). La acidosis intracelular inhibe con una diferente intensidad a los miembros de las familias de Kir, por ejemplo, los canales con residuos de lisina en el M1 muestran alta sensibilidad al pH como Kir 1.1 ($pK_a=6.5$), Kir 4.1 ($pK_a=6.0$), Kir 4.2 ($pK_a=7.1$) y Kir 4.1/5.1 ($pK_a=7.5$) (Kubo et al., 2005, Hibino et al., 2010). Cabe destacar que en este grupo de canales se puede distinguir entre una mayor o menor sensibilidad al pH, particularmente de Kir4.1, 4.2 y 4.1/5.1. Por ejemplo, se sabe que Kir 4.1 heteromerizado con Kir 5.1 (Kir 4.1/5.1) y el homómero de Kir 4.2 (además del heterómero Kir 4.2/5.1) son más sensibles que el homómero de Kir 4.1 (Pessia et al., 2001, Hibino et al., 2010). Por lo tanto, esta característica podría ser usada para definir la estequiometría de los canales expresados en un tipo celular específico. En contraste, los Kir sin residuo de lisina en el M1 como Kir 2.1, Kir 3.X y Kir 6.2 son marcadamente menos sensibles al pH (Rapedius, 2007).

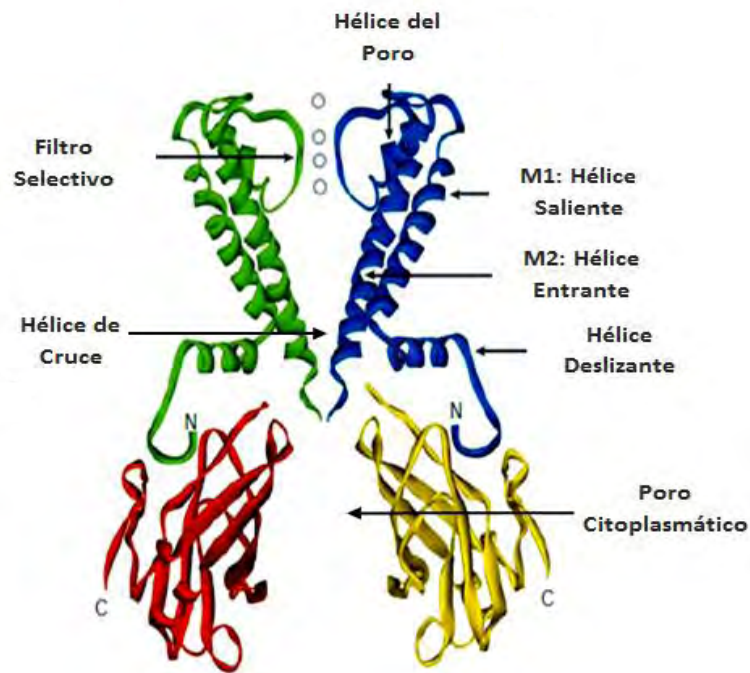


Figura 3. Componentes estructurales del canal Kir.

La vista lateral de dos subunidades de KirBac 1.1 mostrando los componentes funcionales transmembranales (regiones en verde y azul) como citoplasmáticos (regiones en rojo y amarillo) del canal; las 4 esferas blancas representan iones K^+ (modificado de Bichet et al., 2003).

2.9. Corriente tipo Kir en oligodendrocitos y astrocitos.

2.9.1. Expresión de subunidades tipo Kir en oligodendrocitos y sensibilidad a pH_i de la corriente

Los canales Kir 4.1 se encuentran expresados principalmente en el SNC y en el riñón de los mamíferos. En el riñón cumplen un papel importante en la reabsorción de sales en el asa de Henle (Pattnaik et al., 2012), mientras que en SNC están presentes predominantemente en la astroglia y su función es mantener la concentración de K^+ extracelular óptima (Butt A. & Kalsi A. 2006, Kattenmann H. & Ransom B., 2013). La importancia que tienen estos canales queda también de manifiesto con la identificación

de mutaciones en los genes KCNJ10 (gen codificante para Kir 4.1), relacionadas con un síndrome caracterizado por epilepsia, ataxia, sordera y desordenes en la homeostasis de sales por alteración del asa de Henle en riñón conocido como síndrome de EAST (Reichold et al., 2010).

La expresión de Kir 4.1, además de Kir 5.1, se ha mostrado en los OLs (Brasko et al. 2016). Se conoce además que es de importancia la expresión de este tipo particular de canales, dado que el modelo knock-out (KO) para Kir 4.1 presentan un fenotipo con discapacidad motriz y muerte prematura; a nivel celular se observa hipomielinización del SNC, además los OLs purificados de medula espinal, y mantenidos en cultivo, revelan una morfología inmadura con respecto a otros tipos celulares provenientes del mismo tejido (Neusch et al. 2001, Olsen et al. 2008). Sin embargo, la identidad de las subunidades que conforman el canal no es por completo conocida en los OLs, y hasta hace poco, tampoco habían sido estudiadas sus propiedades de regulación básicas, en especial su sensibilidad al pHi que distinguiría entre diferentes conformaciones estequiométricas. Por ejemplo, aún no se sabe si las corrientes de tipo Kir en los OLs son generadas por un homómero de Kir 4.1, o los canales están conformados por heterómeros con otras subunidades como Kir 5.1 o Kir 2.1, las cuales se sabe pueden interaccionar con la subunidad Kir 4.1 (Falker et al. 1996, Pessia et al., 2001, Kubo et al., 2005).

Conocer la identidad y el comportamiento del canal en los OLs podría ayudar a desarrollar fármacos específicos para su modulación, así como lograr el control de su expresión ya sea en condiciones experimentales o como tratamiento clínico. En nuestro laboratorio hemos analizado el comportamiento de los canales Kir de OLs utilizando técnicas de electrofisiología, así como técnicas de biología molecular. Sabemos, por ejemplo, que los OLs del nervio óptico, expresan las secuencias codificantes para las subunidades de Kir 2.1, 4.1 y 5.1 (Figura 4). También, encontramos que la corriente generada en OLs mantenidos en cultivo durante 48 – 96 h no fue sensible a la disminución de pHi a 6.3 medida en el rango de voltaje de -150 a +40 mV como se muestra en la Figura 5.

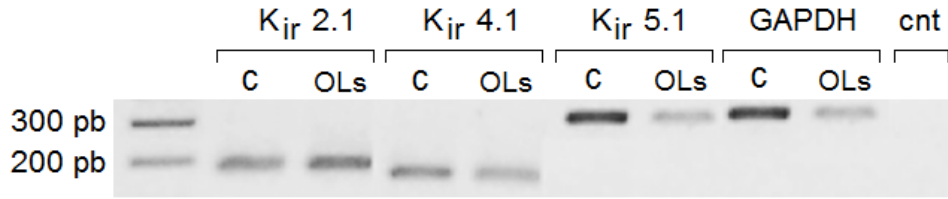


Figura 4. Análisis por RT-PCR.

Amplificación de las subunidades Kir 2.1, 4.1 y 5.1 de OLS mantenidos en cultivo entre 48-96 h. Fue usado homogenizado de cerebro como control (C) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de la PCR. El control negativo (cnt) fue la mezcla sin la RT.

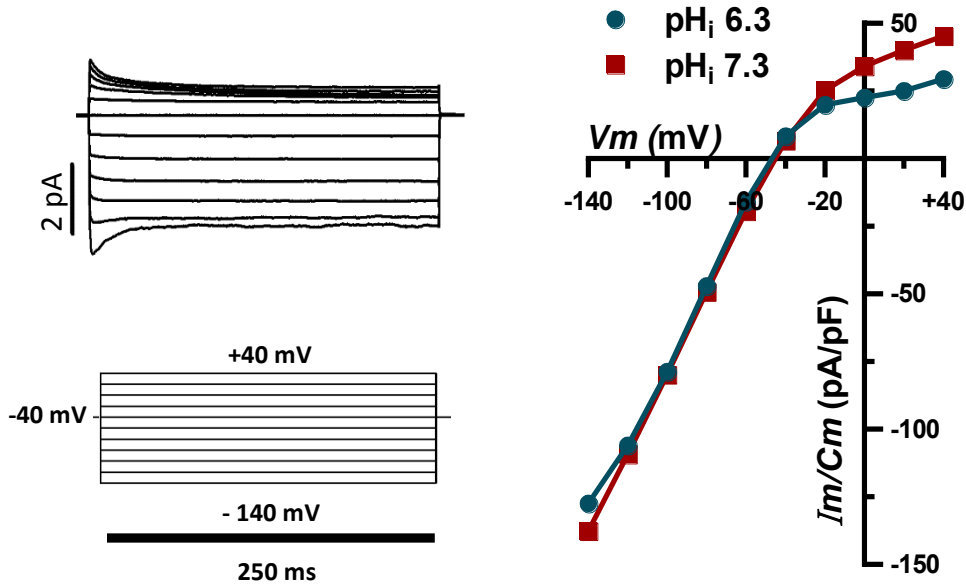


Figura 5. Relación I/V de las corrientes Kir en OLS e insensibilidad de la corriente en pH 6.3.

Los trazos muestran la corriente característica tipo Kir en OLS al mantener el voltaje en -40 mV y aplicar un protocolo de pulsos de 250 ms de duración, de -140mV a +40mV, en pasos de 10 mV. La gráfica es la relación I/V de la corriente de membrana, expresada en función de la capacitancia (pA/pF) monitoreada con soluciones internas ajustadas en pH_i de 7.3 ó 6.3 (modificado de Moctezuma 2014).

Este resultado inesperado, dado que la sensibilidad a H^+ de las subunidades Kir 4.1 ha sido confirmada de manera consistente, nos llevó en primera instancia a descartar la posibilidad de un artefacto por el tipo de técnica utilizado, por lo que fueron monitoreadas las respuestas tipo Kir en astrocitos en cultivo, ya que estas células también expresan corrientes Kir sensibles a pH. (Butt & Kalsi 2006; Olsen et al., 2006; Kattenmann & Ransom, 2013; Seifert et al., 2016). En estos experimentos el rango de pH_i fue ampliado a valores cercanos al fisiológico; los resultados mostraron que las corrientes tipo Kir registradas en los astrocitos si mostraban sensibilidad al aumento de la concentración de H^+ (Figura 6).

Por lo tanto, la insensibilidad al cambio en el pH_i de las corrientes medidas en los OLs sugiere que la conformación adoptada por el canal Kir en estas células no es la de un homómero de Kir 4.1 ni tampoco la de un heterómero Kir 4.1/Kir 5.1. Sin embargo, esta aparente insensibilidad al pH_i de los canales Kir en los OLs, podría tener otras explicaciones. Además, la necesidad experimental de ampliar el rango de pH_i analizado y de considerar tanto factores intrínsecos de la proteína (e.g., pérdida de dominios involucrados en la sensibilidad a protones, mutaciones que alteren su conformación promovida por la unión de protones, heteromerización, es decir, la unión de diferentes tipos de subunidades generando un canal insensible al pH, etc.), como también factores extrínsecos (e.g., cambios postraduccionales sobre la subunidad Kir 4.1, requerimiento de proteínas auxiliares, etc.).

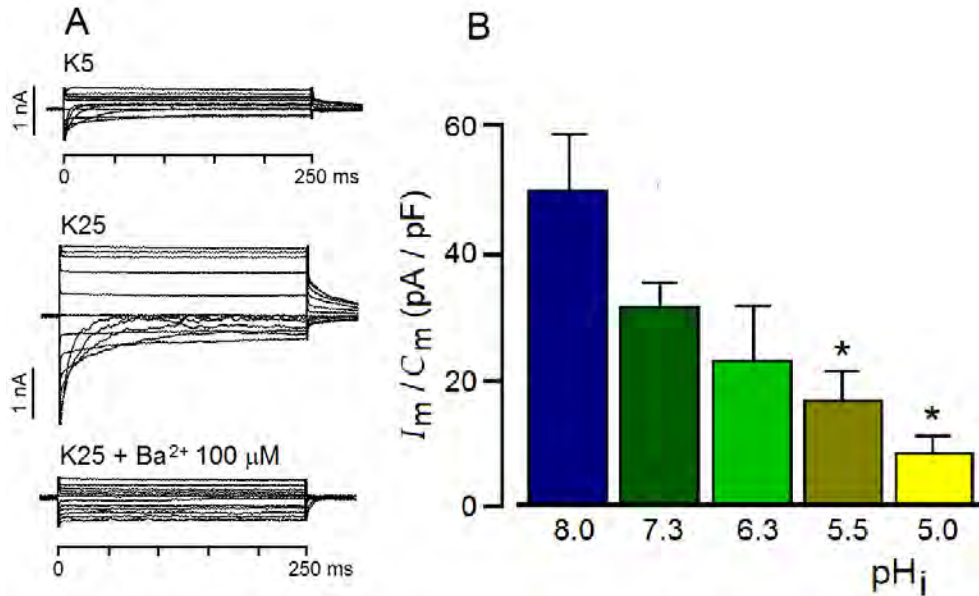


Figura 6. Corrientes Kir en astrocito monitoreadas en diferentes valores de pH_i .

A. Registros de corriente de membrana aplicando un protocolo de pulsos (de -170 mV a +50 mV, mantenidas en -50 mV) tanto en K5 como en K25, y esta última en presencia de 100 μM Ba^{2+} . **B.** Media y error estándar de la densidad de corriente en K25 medida en -50 mV, con soluciones intracelulares (en la pipeta de registro) ajustadas en diferentes pH_i 's en el rango de 8.0 a 5.0 ($n = 7-25$; * $P < 0.05$).

En el presente estudio ampliamos el rango (pH 5.0 a 8.0) del pH_i analizado sobre las corrientes Kir, y también exploramos posibles explicaciones para su insensibilidad a H^+ : 1) La participación de elementos citoplásmicos que hubieran sido dializados durante la técnica estándar de registro de célula completa, utilizando en su lugar la técnica de "parche perforado", y 2) Una posible heteromerización de subunidades Kir, expresando heterológicamente las subunidades Kir clonadas a partir del mRNA de los OLs de nervio óptico.

3. HIPÓTESIS

La insensibilidad al pHi de las corrientes tipo Kir de los OLs no es debida a factores intrínsecos de secuencia o a la heteromerización de las subunidades Kir 4.1, Kir 5.1 y Kir 2.1.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar factores intrínsecos y extrínsecos a las proteínas Kir que podrían explicar la insensibilidad al pHi de las corrientes tipo Kir expresada en los cultivos primarios de OLs del nervio óptico de rata.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar y caracterizar las corrientes tipo Kir en OLs de nervio óptico mantenidos en cultivo en un periodo de 24 a 96 h.
- Analizar la sensibilidad de las corrientes tipo Kir en OLs a la disminución del pHi en un rango de pH de 8 a 5, utilizando la técnica de control de voltaje de célula completa en su configuración estándar.
- Analizar la sensibilidad de las corrientes tipo Kir en OLs a la disminución del pHi utilizando la técnica de control de voltaje de célula completa en su configuración de “parche perforado” con gramicidina, y provocando la disminución del pH intracelular por perfusión de soluciones externas conteniendo un ácido débil.
- Explorar, por medios fluorométricos, el cambio en el pHi en los OLs, producido por la perfusión de soluciones externas conteniendo un ácido débil.
- Expresar las subunidades Kir 4.1, Kir 5.1 y Kir 2.1 clonadas a partir del mRNA de OLs del nervio óptico utilizando el modelo de expresión heteróloga de ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, y analizar sus propiedades electrofisiológicas.
- Caracterizar la sensibilidad al pHi de las corrientes generadas por las subunidades Kir 4.1, Kir 5.1 y Kir 2.1 de OLs, expresadas en ovocitos en diferentes conformaciones, tanto homoméricas como heteroméricas.

- Medir, por medios fluorométricos, el cambio en el pHi en los ovocitos de *Xenopus laevis*, producido por la perfusión de soluciones externas conteniendo un ácido débil.

5. METODOLOGÍA

5.1. Animales

Todos los procedimientos y el manejo de los animales se llevaron a cabo de acuerdo al Manual de Usuarios del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, emitido por el comité de bioética de dicha institución; el cual está basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y el uso de animales de laboratorio, y en la Guía para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio.

5.2. Cultivo primario de oligodendrocitos

Los cultivos primarios de OLs se obtuvieron a partir de nervios ópticos de rata de la cepa Sprague-Dawley de 11-12 días postnatales (P11-P12), siguiendo el método previamente descrito por Barres y colaboradores (1992). Dado el patrón de desarrollo del nervio óptico en estos animales, el uso de ratas en esta edad permite obtener una población altamente enriquecida en oligodendrocitos mielinizantes, siguiendo el siguiente protocolo:

En primer lugar, los animales fueron sacrificados por decapitación y se disecaron los nervios ópticos separándolos del globo ocular y del quiasma. Los nervios fueron colocados en una caja Petri de 35 mm conteniendo medio HBSSi suplementado con gentamicina (2 mM) a 37°C, y fueron eliminadas las meninges.

Utilizando cuchillas quirúrgicas RIBBEL® estériles del no. 20 fueron disgregados los nervios ópticos en trozos pequeños. A continuación, se realizó una digestión enzimática en una solución que contenía 1.25 mg/ml de colagenasa, DNAsa al 0.004% y 0.125% de tripsina, esto en una solución equilibrada de HBSSi por 40 min a 37°C. Se detuvo la reacción añadiendo DMEM suplementado con 10% de FBS (suero bovino fetal) y se centrifugó a 250 g por 5 min. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla obtenida se resuspendió en DMEM con 10% de FBS. El homogenizado fue filtrado para separar OLs

de otras células gliales. La suspensión celular fue centrifugada a 250 g por 10 min. La pastilla celular fue resuspendida en medio SATO el cual contenía DMEM suplementado con 4.5 g/l de glucosa y 0.11 g/l de piruvato sódico, factores que favorecen la supervivencia. Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 14 mm y fueron mantenidas a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂ hasta por 96 h.

5.3. Obtención de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos de rana *Xenopus laevis* han sido un modelo eficiente para el estudio de receptores, canales iónicos y transportadores de mamíferos. Estas proteínas pueden ser estudiadas al microinyectar el cRNA correspondiente, permitiendo la expresión heteróloga de la proteína en la membrana del ovocito. En el presente estudio utilizamos los ovocitos para expresar las subunidades de interés del canal Kir clonadas a partir del mRNA de los OLs.

A ranas *Xenopus laevis* se les indujo anestesia por hipotermia y fueron sometidas a cirugía para disecar de 2 a 3 lóbulos ováricos. La cirugía consistió en una incisión abdominal de 0.5 cm aproximadamente tanto en dermis como en músculo para tener acceso a la cavidad abdominal y al ovario; una vez disecados los lóbulos ováricos estos fueron colocados en una caja Petri con solución Barth normal (conteniendo en mM: NaCl 88, KCl 1, Na₂HCO₃ 2.4, Ca(NO₃)₂ 0.33, CaCl₂ 0.41, MgSO₄ 0.82 y HEPES 5; ajustada a pH7.4 con NaOH 5N). Al término de la disección la rana fue suturada y colocada en un estanque donde su recuperación fue supervisada durante dos semanas.

En un microscopio estereoscópico stemi1000 Zeiss™ y utilizando pinzas finas, fueron disecados folículos de los lóbulos ováricos en el estadio VI de desarrollo según la clasificación de Dumont (1972) y fueron conservados en viales de vidrio con 5 ml de solución Barth.

5.4. Microinyección de cRNA.

Una vez seleccionados los ovocitos sanos del estadio VI, y utilizando un microinyector Drumond (10 μ l), se procedió a microinyectarlos con 50 nl de una solución conteniendo el cRNA (0.1 ng/nl) de las subunidades Kir 4.1, Kir 2.1, o Kir 5.1 por separado, o a co-inyectarlos en una proporción 1:1 de combinaciones de las subunidades Kir 4.1 con Kir 2.1 (Kir 4.1/2.1), de Kir 4.1 con Kir 5.1 (Kir 4.1/5.1), o de Kir 2.1 con Kir 5.1 (Kir 2.1/5.1). También fue realizada la co-inyección de las tres subunidades estudiadas. Por otra parte, en una serie de experimentos, la subunidad Kir 2.1 fue co-inyectada en una proporción 2:1 con respecto a Kir 4.1. Como controles de expresión endógena, los ovocitos fueron microinyectados con H₂O (50 nl por ovocito) libre de RNAsas.

Los ovocitos inyectados se incubaron en viales de vidrio con 5 ml de solución Barth a 18°C por 24 h para su posterior defoliculación.

5.5. Defoliculación de ovocitos.

Para observar las características eléctricas de los canales Kir expresados en la membrana del ovocito, es necesaria la remoción de las distintas capas celulares que conforman el folículo ovárico (Arellano et al., 1995). Esto se logró, primero, aplicando un tratamiento enzimático de 0.5 mg/ml colagenasa de *Clostridium histolyticum* (SIGMA-ALDRICH tipo 1; no. C0130-1G,) en solución Ringer normal (RN, conteniendo en mM: 115 NaCl, 5 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, ajustada a pH 7.4) durante 30 min a temperatura ambiente, después del tratamiento los ovocitos fueron lavados en RN por triplicado, y mantenidos en esta solución o en solución de Barth para completar la remoción de las capas celulares con ayuda de pinzas finas y un estereoscopio stemi1000 Zeiss™. Una vez finalizada la remoción de las capas foliculares los ovocitos fueron lavados en solución de Barth e incubados de 24 a 48 h más para su registro electrofisiológico o el monitoreo de los cambios de pHi.

5.6. Electrofisiología.

5.6.1. Control de voltaje en configuración de célula completa estándar y de “parche perforado” con gramicidina.

En este estudio fueron registradas las corrientes generadas a través de los canales Kir en cultivos de OLs, mediante la técnica de control de voltaje en la configuración de célula completa estándar y por parche perforado con gramicidina de *Bacillus aneurinilyticus* (SIGMA-ALDRICH®; MDL: G5002-500MG).

Ambos tipos de registros se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20-23 °C), con pipetas de registro (2-5 MΩ) de tubo de vidrio de borosilicato (Sutter Instrument Co.) de 1.5 mm de diámetro externo y 1.17 mm de diámetro interno, las cuales fueron fabricadas en un estirador de pipetas horizontal Modelo P-97 (Sutter Instrument Co.) y pulidas con una microforja modelo MF-83 (Narishige Co.). Fue utilizado un amplificador de control de voltaje modelo Axopatch 200B y una interfase Digidata 1322, las señales digitalizadas fueron almacenadas y analizadas posteriormente en una computadora mediante software especializado (pCLAMP v10.4).

El registro por control de voltaje en célula completa estándar se obtuvo al realizar gigasellos con pipetas de registro cargadas con solución interna (SIA, conteniendo en mM: NaCl 140, KCl 2, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2 y HEPES 10, EGTA 11, ATP-Na 2, GTP 0.2) ajustada a pH 7.3 con NaOH). En una serie de experimentos, la solución interna fue ajustada a distintos pH's (8, 7.3, 6.3, 5.5 & 5.0) utilizando NaOH o HCl según el caso. Las corrientes transmembranales fueron registradas en solución externa normal (conteniendo en mM: NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1 y HEPES 10, ajustada a pH 7.3 con NaOH), utilizando dos protocolos principales, uno, al mantener de manera continua el potencial en -80 mV, o dos, aplicando un protocolo de pulsos (de 250 ms) desde un potencial de -50 mV a valores hiperpolarizantes (-140 mV) hasta despolarizantes (+40 mV) en pasos de 20 mV. Para aumentar la amplitud de la corriente Kir, las células fueron perfundidas con solución externa conteniendo 25 mM KCl, substituyendo 20 mM NaCl en la solución externa normal por KCl, a estas dos soluciones

se les llama solución K25 y K5, respectivamente, haciendo referencia a la concentración de KCl que contenían. En la mayoría de los experimentos fue utilizado Ba^{2+} como bloqueador de los canales Kir, éste fue agregado a la solución K5 o K25 desde una solución stock 1 M $BaCl_2$.

Para llevar a cabo la técnica de “parche perforado” con gramicidina, se llenó la punta de la pipeta de registro con solución interna, y el resto de la pipeta se cargó con la solución interna conteniendo gramicidina (1 μ l/ml del stock de gramicidina; 6 mg/250 μ l DMSO). De esta manera la punta de la pipeta libre de gramicidina permite realizar el giga-sello, en el transcurso de unos minutos, la gramicidina difunde a la punta de la pipeta, incorporándose a la membrana celular, y permitiendo el acceso eléctrico necesario para llevar a cabo el control de voltaje de la célula completa, que fue monitoreado por la medición continua de la resistencia de acceso y la capacitancia de la membrana.

5.6.2. Control de voltaje con dos electrodos.

Para el estudio de las corrientes membranales expresadas en ovocitos de rana *Xenopus*, fue utilizada la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Miledi 1982), los electrodos fueron llenados con solución KCl 3M y tuvieron una resistencia de 1 a 2 M Ω . Los registros electrofisiológicos fueron realizados a temperatura ambiente, de 48 a 72 h después de que los ovocitos fueron microinyectados con el cRNA de las subunidades Kir. En general, mientras los ovocitos fueron mantenidos a -80 mV, fueron perfundidos con solución Ringer conteniendo 25 mM de K^+ (K25) que fue preparada substituyendo 20 mM de NaCl por KCl en la solución RN (también llamada K5). La perfusión de K25 provocó regularmente el aumento de corriente entrante con características tipo Kir, sus características electrofisiológicas fueron estudiadas, así como su sensibilidad a Ba^{2+} , y a la acidificación del medio intracelular. La acidificación del medio intracelular fue realizada perfundiendo los ovocitos con soluciones conteniendo el ácido débil acetato de sodio, en una concentración final de 55 mM de acetato de Na^+ , a estas soluciones dependiendo de la concentración de K^+ , las llamamos K5-Ac $^-$ o K25-Ac $^-$, y fue ajustada a diferentes valores

de pH (6.3, 6.8 y 7.4). La perfusión de estas soluciones provocó cambios en el pHi de manera semejante a lo reportado en estudios anteriores (Tsai et al., 1995), lo cual fue confirmado por fluorimetría en este estudio (ver adelante). El comportamiento I/V de las corrientes membranales fue monitoreado aplicando un protocolo de pulsos (3 s) que consistió en cambiar el potencial de membrana con pulsos hiperpolarizantes desde -170 mV hasta despolarizantes de +50 mV, en pasos de 20 mV, mientras la preparación fue perfundida con solución K5 (Ringer Normal) o con las soluciones K25 o K25-Ac⁻.

5.6.3. Monitoreo de los cambios de pHi por métodos fluorométricos.

El cambio en el pHi de OLs fue monitoreado usando el indicador pHrodoGreen siguiendo instrucciones del proveedor (P35373; Molecular Probes, Life Technologis Carlsbad, CA, USA). OLs mantenidos en cultivo fueron cargados con 10 μ M de pHrodo Green en solución interna durante 10 min a temperatura ambiente. Los experimentos se realizaron en cámaras de registro perfundidas a flujo contaste (1 ml/min) con solución externa. La cámara fue montada en la plataforma de un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus IX71 equipado con lámpara halógena y un objetivo 40X (Olympus, Tokio, Japan). Las células fueron visualizadas, y se obtuvieron imágenes cada 500 ms durante 150 s con una cámara (Evolution QEi; Media Cybernetics Inc. Silver Spring, MD, USA). Después, las imágenes fueron analizadas usando ImageJ v1.49 (NIH, USA). Para estimar los cambios en el pH citoplasmático, fue construida una curva de calibración en pH 4, 5, 6, 7 y 8 con soluciones externas suplementadas con valinomycina 10 μ M (Sigma, St. Louis, MO, USA) y nigericina 10 μ M (Sigma, St. Louis, MO, USA) para equilibrar el medio intracelular con el pH de la perfusión. Soluciones externas conteniendo acetato, con K⁺ en concentraciones normales y elevadas, fueron las mismas utilizadas en registros electrofisiológicos con control de voltaje.

5.6.4. pHi en ovocitos de *X. laevis* por el método "Ratioocyte".

Tsai y colaboradores (1995) midieron la disminución en el pHi de ovocitos de *X. laevis* al perfundir soluciones conteniendo acetato utilizando microelectrodos sensibles a pH. En este estudio, en colaboración con el Dr. Anselm Zdebik del Departamento de Neurociencias del University College London, monitoreamos los cambios en el pHi inducido por la perfusión de acetato por un método menos invasivo usando el indicador fluorescente 2',7'-Bis(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína (BCECF; SIGMA-ALDRICH®) sensible a H⁺. La fluorescencia emitida a 520 nm, en respuesta a la excitación tanto a 440 nm como a 480 nm, fue monitoreada de manera continua en ovocitos cargados con el colorante por medio de microinyección. Curvas de calibración para la emisión del BCECF en diferentes valores de pHi, fueron hechas cargando las células con el indicador, después de incubarlas por 1 h en solución RN a 17°C, los ovocitos fueron permeabilizados con Digitonina (20 µM; Calbiochem®) durante 100 – 150 s, y entonces perfundidos con soluciones de RN ajustadas en distintos valores de pH (4.5 – 11). El pHi igualó el pH de cada solución de calibración y la fluorescencia en cada punto fue monitoreada, la relación de la fluorescencia (480/440) registrada en cada solución perfundida se ajustó en una curva dosis respuesta, que fue utilizada para estimar los cambios observados cuando fueron perfundidas soluciones conteniendo acetato.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización de la corriente Kir en OLs y su curso temporal de expresión *in vitro*.

Los OLs utilizados en este estudio presentaron un potencial de membrana de -56 ± 6 mV a las 24 h en cultivo (n=39); este valor fue más negativo en días subsiguientes, y alcanzó valores de -72 ± 7 mV a las 72 h en cultivo. Las curvas I/V aplicadas en OLs mantenidos por 24-72 h en cultivo, mostraron que las células presentan la generación de una corriente entrante en potenciales hiperpolarizantes, la cual aumenta conforme la concentración de K^+ en el medio extracelular (Figura 7) fue aumentada. El curso temporal de las corrientes entrantes, también presentó características de las corrientes tipo Kir; por ejemplo, en potenciales más negativos de alrededor de -140 mV, las corrientes entrantes presentan inactivación parcial; ha sido mostrado anteriormente que esta inactivación, en canales tipo Kir, es debida a bloqueo del canal por Na^+ extracelular (Rikke et al., 2009). Además, la corriente entrante registrada fue eliminada por la adición de Ba^{2+} en el medio externo (Figura 7). Aun y cuando varios tipos de canales de K^+ presentan sensibilidad a Ba^{2+} , los canales Kir tienen una sensibilidad alta, en el rango bajo μM para este catión, diferente a otros canales que puede alcanzar valores en el rango mM (Attali et al., 1997, Arellano et al., 2016). Para determinar la potencia del bloqueador sobre las corrientes entrantes en los OLs, realizamos el siguiente protocolo: Las células fueron controladas en un potencial de -80 mV mientras fue perfundida la solución con alto K^+ , la Figura 8A ilustra la perfusión tanto de solución K10 como la solución K25; como se puede observar, la solución de alto K^+ generó una robusta corriente entrante que se mantuvo estable por el tiempo de perfusión de la solución. Esta corriente entrante fue bloqueada por Ba^{2+} , tal y como se muestra en la Figura 8B, en estos experimentos la corriente fue aumentada por la perfusión de K25, una vez alcanzado una amplitud estable fue co-aplicada la solución K25 conteniendo diferentes concentraciones de Ba^{2+} , este catión divalente produjo inhibición de la corriente entrante que fue dependiente de la dosis, la inhibición fue por completo reversible en pocos segundos de lavado en K25. La corriente entrante en

presencia de las diferentes concentraciones de Ba^{2+} fue normalizada con respecto a la corriente en ausencia de Ba^{2+} y la curva D-R resultante fue ajustada a una curva sigmoideal que proporcionó un valor medio de inhibición (IC_{50}) de $11.4 \pm 1.1 \mu M$ (Figura 8C).

El potencial de membrana de los OLs en cultivo mostró una hiperpolarización dependiendo del tiempo en cultivo; se ha sugerido que esta hiperpolarización, es dependiente de la expresión de canales tipo Kir en la membrana del OL durante el proceso de maduración (Neusch et al., 2001, Kalsi et al, 2004). Para confirmar este efecto, fueron medidas las densidades de la corriente entrante provocada por K25 en OLs mantenidos en cultivo de 24 a 72 h, como puede observarse en la Figura 8D, la densidad de la corriente entrante mostró un aumento de más del 100% entre las 24 h y 72 h en cultivo y 95% de esta corriente fue inhibida por la perfusión de $100 \mu M Ba^{2+}$. Esto apoya la idea de que el aumento de la corriente entrante por alto K^+ fue acarreada a través de canales tipo Kir, y que éstos son los principales canales responsables de la hiperpolarización observada en los OLs en cultivo.

En los experimentos subsiguientes, fueron utilizados principalmente los dos protocolos de registro de las corrientes, descritos en esta sección: 1) La aplicación continua de K25 (desde una solución K5) mientras las células fueron mantenidas en $-80 mV$ y 2) La aplicación de protocolos de pulsos, curvas I/V, mientras se mantuvo el potencial en $-50 mV$ y fueron perfundidas las soluciones externas conteniendo K5 o K25. En ambos casos, las propiedades electrofisiológicas de las corrientes y su bloqueo por $100 \mu M Ba^{2+}$, confirmaron la participación principal de canales tipo Kir.

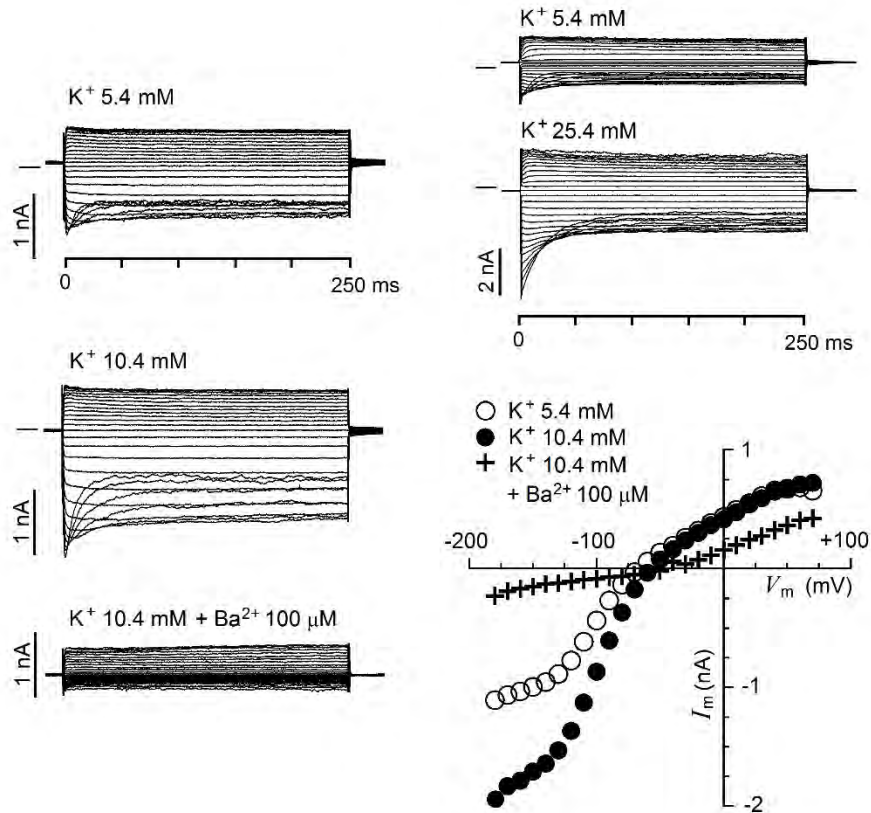


Figura 7. Corriente con características Kir identificada en OLs de nervio óptico mantenidos en cultivo.

Se ilustran trazos superpuestos de corriente membranal en OLs en cultivo y mantenidos en -50 mV usando control de voltaje estándar de célula completa. Protocolos de pulsos (250 ms) fueron aplicados de -180 mV a $+60$ mV (cada 10 mV) en solución externa con $[K^+]$ normal (5.4 mM, K5), o soluciones conteniendo alto K^+ (K10 ó K25), las cuales incrementaron las corrientes entrantes.

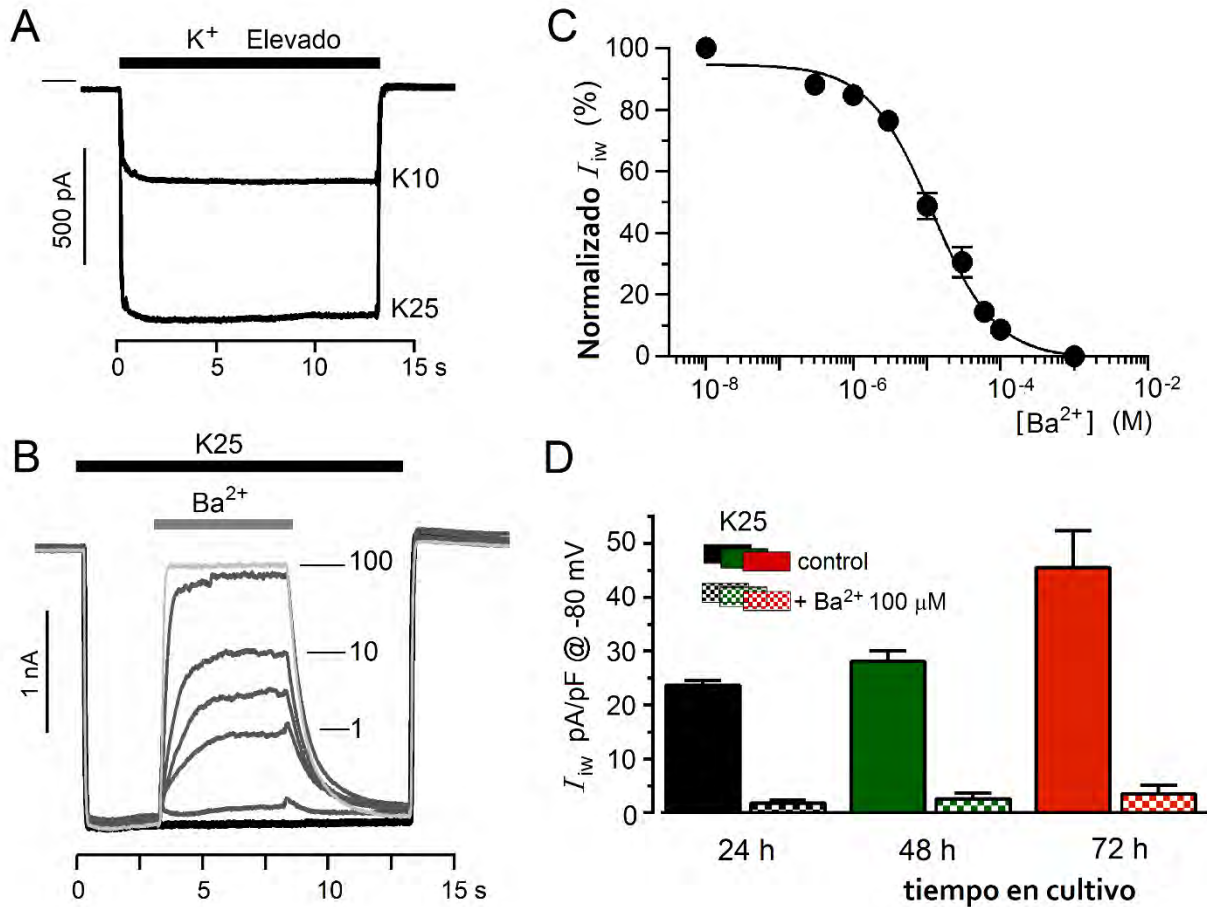


Figura 8. Bloqueo por Ba²⁺ característico de Kir

A. Corriente entrante provocada por las soluciones conteniendo alto K⁺ (indicado por la barra superior) monitoreadas en células controladas en -80 mV y perfundidas con K10 ó K25. **B.** Efecto bloqueador de Ba²⁺ extracelular sobre la corriente entrante; las células fueron controladas a -80 mV mientras la corriente entrante fue monitoreada perfundiendo K25 (barra negra) en la ausencia de Ba²⁺, o en la presencia de este catión divalente en diferentes concentraciones (0.3, 1, 3, 10, 30 ó 100 μ M) (barra de aplicación y trazos en gris). **C.** La gráfica muestra la inhibición de la corriente por Ba²⁺ extracelular en diferentes concentraciones, la curva continua es el mejor ajuste a los puntos experimentales. **D.** Las columnas representan la densidad de corriente entrante provocada por K25 en el periodo de 24 a 72 h en cultivo corriente aumenta con el tiempo en cultivo y fue bloqueada de manera efectiva por Ba²⁺ en todo el periodo de tiempo en cultivo.

6.2. Insensibilidad a H^+ de las corrientes Kir en OLs.

Una vez confirmada la participación principal de canales tipo Kir en la generación de las corrientes entrantes en OLs, y su expresión dependiente del tiempo en cultivo, los siguientes experimentos fueron diseñados para explorar la sensibilidad de las corrientes tipo Kir al pH_i . Como se mencionó en los antecedentes, habíamos mostrado que las corrientes Kir en OLs no son afectadas por la disminución del pH_i a 6.3 (Moctezuma 2014). Aquí, de manera similar a lo observado en las corrientes Kir en astrocitos, los experimentos fueron realizados en OLs monitoreados en el rango de pH_i de 8.0 a 5.0.

La actividad eléctrica de OLs fue monitoreada aplicando los dos protocolos descritos en la Figura 7 y 8. Primero, en -80 mV fue perfundida solución K25, sobre la corriente entrante generada fue probada su sensibilidad a $100 \mu M Ba^{2+}$, esto fue repetido en diferentes OLs ($n \geq 6$ por cada medición de pH , ver Figura 9) mientras las pipetas de registro fueron llenadas con soluciones internas que fueron ajustadas a los siguientes valores de pH (i.e., pH_i): pH 8.0, 7.3, 6.3, 5.5, y 5.0. También, la corriente Kir y su sensibilidad a H^+ fue monitoreada en distintos potenciales al aplicar protocolos de pulsos desde valores hiperpolarizantes (-170 mV) hasta despolarizantes ($+50$ mV) durante breves periodos de tiempo (250 ms) desde un potencial de membrana controlado en -50 mV, estas curvas I/V fueron construidas tanto en la solución K5 como durante la perfusión de K25. El posible efecto de los H^+ sobre la corriente Kir, fue evaluada usando las soluciones internas ajustadas en distintos valores de pH_i , al igual que en los registros anteriores; en la Figura 10, se ilustra la corriente Kir en OLs en los pH 's de 7.3, 6.3 y 5.5. Como puede observarse la densidad de corriente tipo Kir (Figura 9B) no dependió del pH_i y se mantuvo estable en el rango estudiado, además, tampoco las relaciones I/V en los pH analizados mostraron diferencia en el rango de voltaje estudiado (Figura 10).

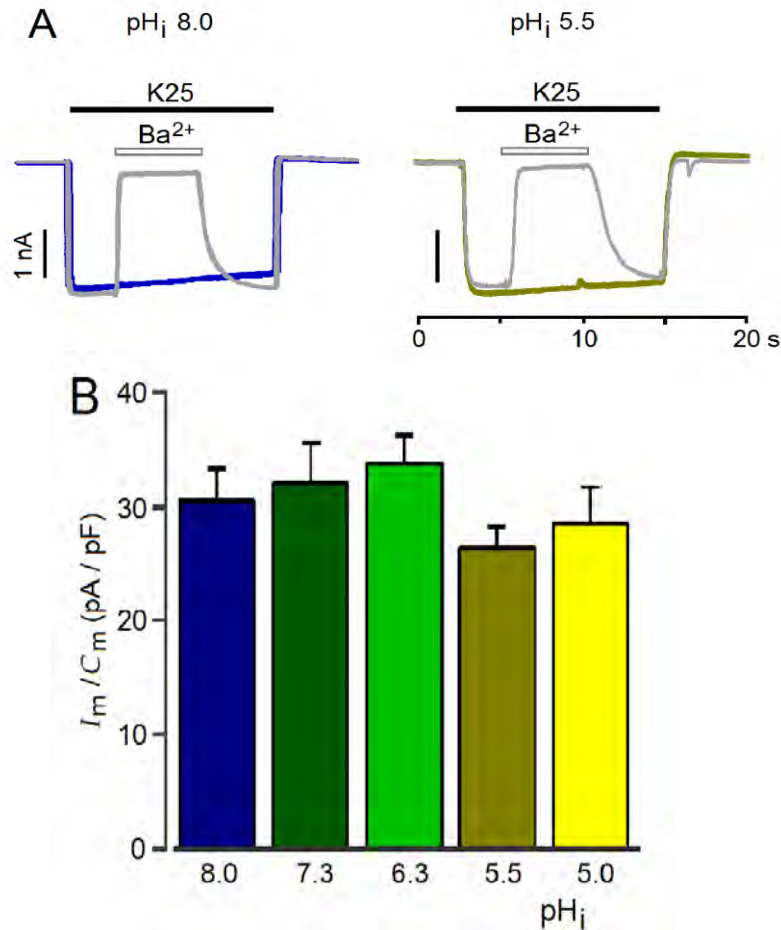


Figura 9. Insensibilidad a H^+ de la corriente Kir en OLs.

A. Registros eléctricos de OLs en cultivo durante la aplicación de K25 en -80 mV, utilizando soluciones internas ajustadas a diferentes valores de pH (i.e., pH_i). Los trazos en azul y mostaza muestran la respuesta eléctrica en pH_i de 8 y 5.5, respectivamente; en cada caso el trazo gris corresponde la corriente en la presencia de Ba^{2+} (100 μM) por el tiempo indicado por la barra gris. **B.** Las barras representan la amplitud de corriente registrada en las mismas condiciones que en A, normalizada con respecto a la capacitancia de la célula registrada, utilizando soluciones internas ajustadas a un pH_i de 8, 7.3, 6.3, 5.5 ó 5.0 (OLs ≥ 6 en cada barra).

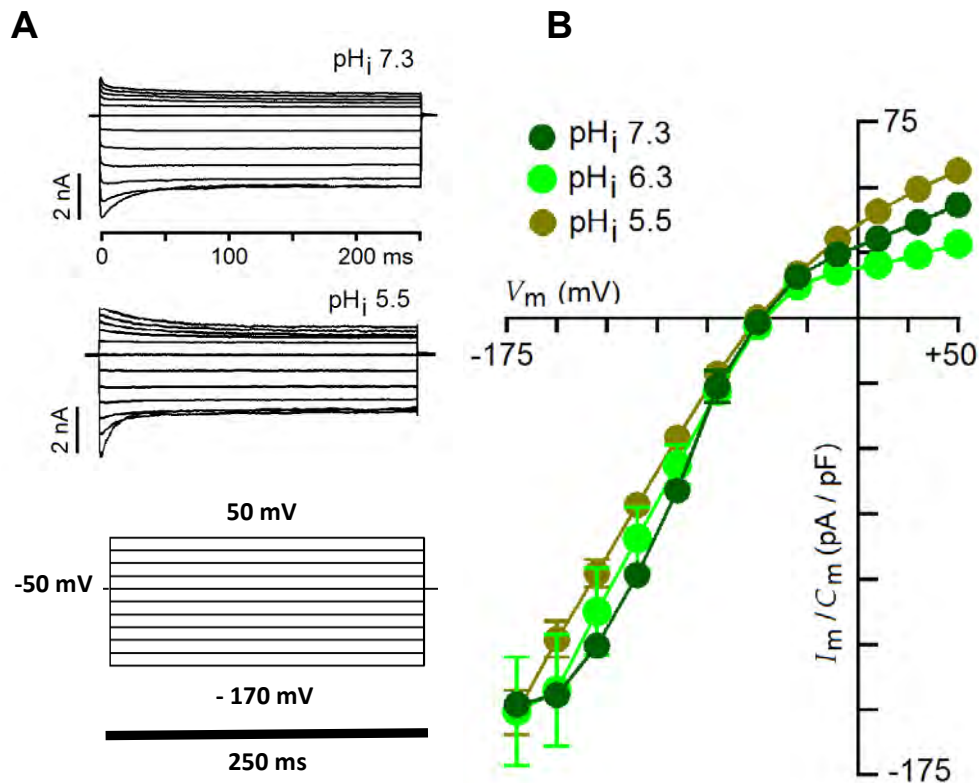


Figura 10. Insensibilidad de la corriente Kir a los cambios en pH_i.

A. Los trazos muestran la corriente transmembranal de dos diferentes OLS registrados bajo control de voltaje a -50 mV, durante la perfusión de K25 y la aplicación del protocolo de pulsos que se muestra en la parte inferior. Los diferentes OLS fueron registrados con soluciones internas ajustadas a pH de 7.3 ó 5.5 como se señala. **B.** La gráfica muestra la relación corriente/voltaje (cada punto representa la media ± ESM de al menos 7 OLS) en OLS registrados con tres diferentes valores de pH_i. La amplitud de corriente instantánea fue normalizada con respecto a la capacitancia de membrana para cada célula.

6.3. Corrientes Kir monitoreadas con la técnica de "parche perforado" y su sensibilidad a la acidificación intracelular en OLs.

Para investigar una posible participación de factores citoplásmicos en los mecanismos de regulación por H^+ de los canales Kir, fueron realizados experimentos donde el citoplasma fue mantenido durante el registro, utilizando el control de voltaje con parche perforado por gramicidina. Esta técnica no permite la acidificación intracelular de manera directa, a diferencia de la modalidad estándar, por lo tanto, fue necesario acidificar indirectamente perfundiendo externamente soluciones con un ácido débil, el acetato, que permea la membrana celular disminuyendo el pH_i al equilibrarse las concentraciones externa e interna (Tsai et al., 1995).

Primero, fue cuantificado el grado de acidificación intracelular que ejerce el acetato perfundido externamente. Para lo cual, OLs en cultivo cargados con el fluoróforo pH Rodo Green, sensible a la concentración de H^+ , fueron perfundidos con $K_5\text{-Ac}^-$ ajustada a $pH\ 7.3$, el cambio en la concentración de H^+ fue estimada por el cambio de intensidad de fluorescencia del indicador. El cambio fue cuantificado por experimentos en los que se realizó una curva D-R de calibración ($n \geq 200$ células), donde el medio intracelular fue equilibrado con soluciones externas a diferentes pH y la adición de los ionóforos nigericina y valinomicina. Estas curvas de calibración indicaron que un cambio de ~ 17 unidades de fluorescencia correspondieron de manera lineal, en un rango de $pH\ 8$ a $pH\ 5$, con una unidad de pH (Figura 11). La aplicación de soluciones de acetato en los cultivos de OLs, ya sea con $K_5\text{-Ac}^-$ o $K_{25}\text{-Ac}^-$, provocó una disminución del pH_i que alcanzó un máximo en pocos segundos (5-8 s) y se mantuvo por alrededor de 15 s, un comportamiento que fue observado de manera consistente en 97% de los OLs registrados (Figura 12). Las curvas de calibración construidas indicaron que al aplicar $K_{25}\text{-Ac}^-$ el cambio máximo en la fluorescencia correspondió a un pH_i de 5.9 ± 0.1 ($n > 200$).

De manera paralela, fue monitoreada la corriente tipo Kir con en la modalidad de "parche perforado". En estas condiciones, las corrientes Kir registradas con esta

técnica, presentaron características similares a las observadas con la técnica estándar, y fueron bloqueadas por $100 \mu\text{M Ba}^{2+}$. En estas condiciones, la aplicación de la solución K25-Ac⁻ en OLs no provocó una disminución importante de la corriente entrante. Aunque, el acetato generó una corriente saliente, ésta no pareció tener relación con la generación de la corriente Kir ya que el efecto del acetato también fue observado en soluciones K5-Ac⁻ (Figura 13). Como los experimentos de medición del pH_i indicaron que el pico de acidificación se alcanzaba alrededor de los 10 s, fueron realizados experimentos en los que la acidificación se llevó a cabo primero con la perfusión por 5 s de K5-Ac⁻, seguido de la perfusión por 5 s de K25-Ac⁻, mostrando que la perfusión de acetato por este tiempo tampoco redujo la corriente Kir de manera significativa (Figura 14).

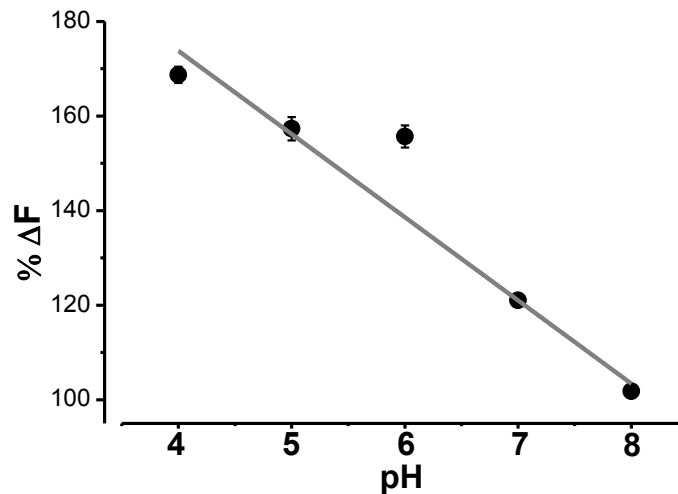


Figura 111. Curva de calibración para el indicador de pH_i "pH Rodo Green".

OLs incubados con el indicador fluorescente pH Rodo Green fueron perfundidos con ionóforos (Valinomicina y Nigericina) para permeabilizar la membrana a H⁺. SEA ajustada a distintos valores de pH (4-8) fueron entonces perfundidas modificando el pH_i de los OLs efecto que fue monitoreado como un cambio en la fluorescencia. La línea es el mejor ajuste a los puntos experimentales ($n \geq 200$ OLs) con parámetros de $R^2 = 0.943$ y pendiente de -17.6 ± 2.1 .

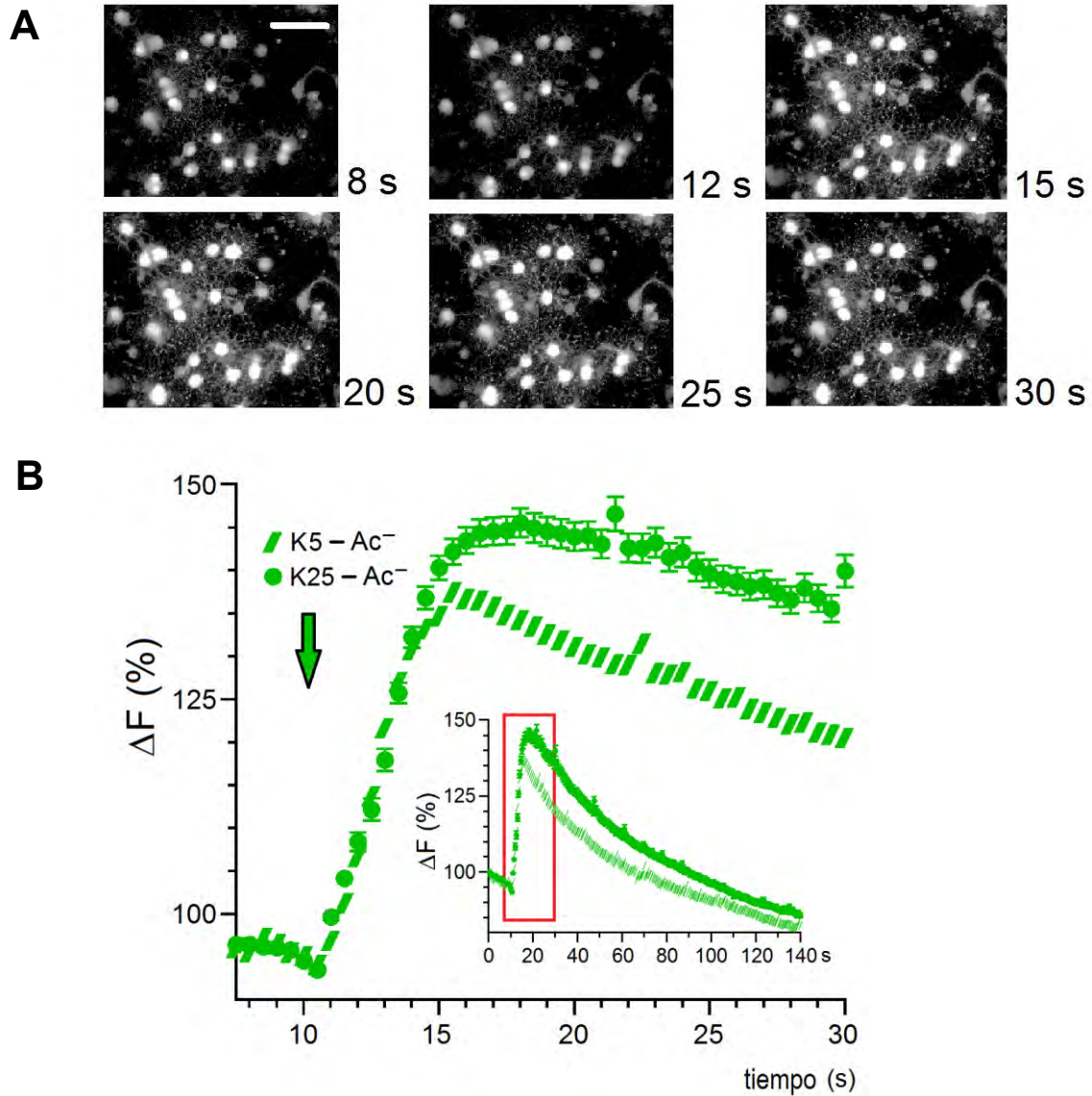


Figura 12. Medición de pHi por fluorometría.

A. Las imágenes ilustran OLs mantenidos en cultivo primario (48-72 h) cargados con pH Rodo Green. Se indica el tiempo de registro de fluorescencia. Al tiempo 10 s aproximadamente, los OLs fueron perfundidos con solución K25-Ac⁻; ésto provocó un aumento de la fluorescencia que permaneció hasta los 30 s. **B.** La gráfica muestra el curso temporal del cambio de fluorescencia provocado por la perfusión de acetato (indicado por la flecha en la gráfica principal), en OLs tratados con K5⁻ o K25-Ac⁻, la gráfica en el inserto muestra el registro completo de 140 s, mientras que la gráfica principal muestra el detalle enmarcado en rojo.

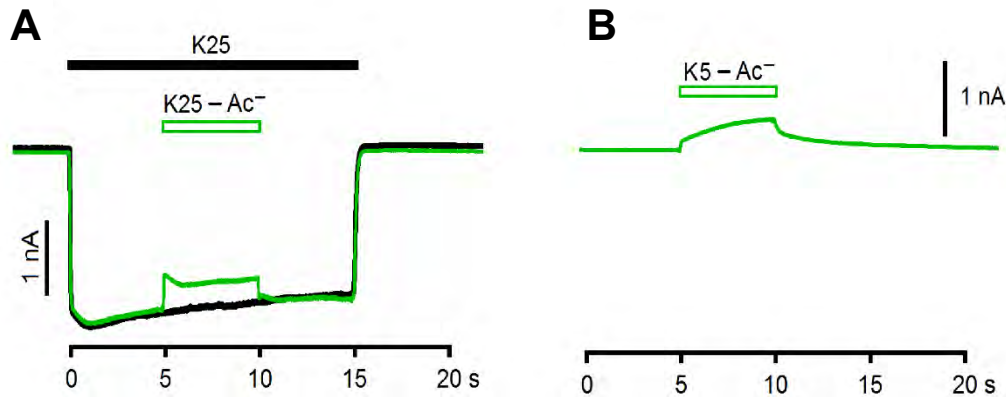


Figura 133. Aplicaciones de acetato durante Kir en OLs registrados con la técnica de “parche perforado”.

Registros representativos bajo la técnica de control de voltaje con “parche perforado” con gramicidina, en OLs a -80 mV mientras fueron perfundidos con soluciones conteniendo acetato (trazos en verde), tanto en K25-Ac⁻ **A** como con solución de K⁺ normal o K5-Ac⁻ **B**. El trazo en negro en A representa un registro control en K25.

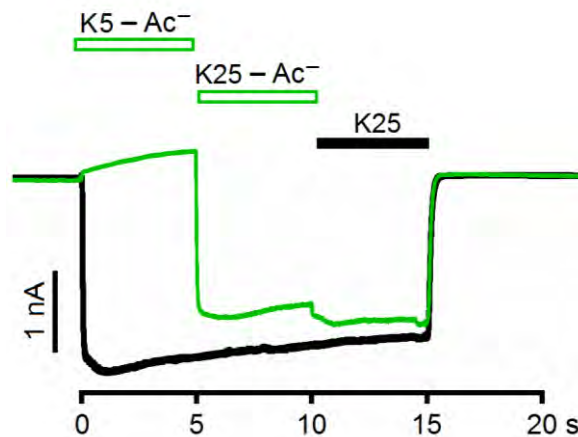


Figura 14. La corriente Kir en OLs fue insensible a la acidificación provocada por aplicaciones prolongadas de acetato.

El trazo en negro muestra un registro control de la corriente Kir (K25) en un OL monitoreada con la técnica de “parche perforado” a -80 mV. Aproximadamente 3 minutos después el mismo OL fue perfundido con la secuencia señalada por las barras superiores (trazo en verde), la perfusión de K5-Ac⁻ por 5 s fue seguida por K25-Ac⁻ por otros 5 s, ésta provocó un aumento rápido de la corriente entrante de manera similar a la aplicación de K25; por último, se retiró el acetato y se perfundió K25 por 5s, para regresar a la solución normal K5.

6.3. Secuencia de las subunidades Kir clonadas de los OLs.

En este punto, fue necesario identificar la posible presencia de mutaciones en las subunidades Kir expresadas por los OLs, como una posible explicación de la insensibilidad mostrada por la corriente tipo Kir a los cambios en el pHi. Para ello, fueron clonadas y secuenciadas las subunidades de Kir 2.1, 4.1 y 5.1 de OLs del nervio óptico, aislados y mantenidos en cultivo por 72 h. La comparación de estas secuencias con las reportadas en las bases de datos (Kcnj2: NM_017296.1, Kcnj10: NM_031602.2, Kcnj16: NM_053314.2) indicó que no existe diferencia entre éstas y las secuencias oligodendrogliales (Figura 15).

```
5.1 -----
4.1 atgacatcagttg-----ccaaggtctattacagccagacg
2.1 atgg-atccatgggcagtggtgctacaaaccgctacagcatcgtctctc----ggagg

5.1 -----
4.1 acgcagacagagagccgg-----ccctagtggctccaggaatacg-----
2.1 aagacggcatgaagctggccaccatggccgtcgccaatggctttgggaatggcaagagta

5.1 -----
4.1 -----tcggaggagggtcctgacaaaagatggccggagcaacg
2.1 aagtccataaccgacaaacagtgccaggagccgctttgtgaagaaagacgggcatgtgcaacg

5.1 -----
4.1 tgagaatggagcatattgctgacaagcgtttcctctacctcaaggatctatggacgacct
2.1 ttcagtttatcaacgtgggagagaaaggacagaggtacctggcggacatctttactacct

5.1 tcatggacatggtcactggcgttaccaggat--tatct-----
4.1 tcattgacatg--cagtgccgtacaagcttctgctcttctcggcaacctttgaggcac
2.1 gtgtggacatc--cgctggcgtggatgctggtaatcttctgcctcgattctgtgctctc

5.1 -----ggtcattgacgagtttgaggtctttaaacgccatcgtcatccgcccttctgc---
4.1 ttggttcctctttggcgt-ggtgtggtatctgctcgtgtggccacgggggacctgttg
2.1 ctggtctgttctttggctg-tgtgttttggttgatagctctgctccacgggatctgg---

5.1 -----tgtcttctgaatagcgcagaagtgggct-----ctcaccgt-g
4.1 agctgggacctcctgccaaccacagccctgtgtggtgcaggtgcacacacttactgggg
2.1 -----atgcttctaaaagagagcaaagcgtgtgtgctgaggtcaacagcttcacggctg

5.1 cctccaccacatggttcggtcggaaagtcacctatgcccacatgaggcaaagcttcccg
4.1 ccttccctctc-----tccctcgaatccc---a-gaccaccattggctatggcttcccg
2.1 ccttccctctc-----tccattgagacc---a-gacaaccatcggtatggtttcagg

5.1 tctctcatgcccgatgagtgcgaaatagctgaagcggatggt-----ctg
4.1 tacatc--agcgaggaatgccctctggccattgtg-cttctcattgacagctcgtgctc
2.1 tgtgtt--acagacgagtgcccgatgtgctgttttc-atgggtggtattccagtcaatcgtg

5.1 ggctcgccttccggggcg-----tcgccatctttgccaaggctgccc---caat
4.1 accaccat-tctggaaatcttcatcaccggaaccttcttgcgaaagattgcccggcctaaa
2.1 ggctgcacat-catcgacgccttcatcattgggtgcagtcagtgccgaagatggcgaagcctaaa

5.1 gatgaaggtgtttatgatgcagctcaggatggactgaaggatgaccgtcagcagggccac
4.1 gaagagggctgag-----acgatccgtttcag-----ccag
2.1 gaagaggaatgag-----actctggtcttcag-----ccac

5.1 agagc-attcttccgtgacacaacggtaaccg-tacccgatggtg-----
4.1 catgcggttgtggcttaccacaacgggaagccttgcctcatgatccgggtggccaacatg
2.1 aacgctgtgattgccatgagggacggcaaacctcgttcatgtgtggagatgggcaacctt
```



```

5.1 -----tttgggtctcaagggagaataaaaacgccgctaaatgaatgca
4.1 cgtaagagtctctcattgggtgccaggtgacaggcaactg---cttca----aaccca
2.1 cgaagagccaccttgtggaagctcatgtc-cgggcaagct---tctca----aatcta

5.1 cgttgtccacgcacgggtga-tgtctggatcg----ct-----taa--taggtctcc
4.1 cca-gacaaaggagggtgagaatattcggctcaaccaggt-----caatgtgactttcc
2.1 ggatcacttcagaagggagtagatcccccttgaccagatagacatcaacggttggttcg

5.1 gtgatga--agggtatgagccaaaatag-----gagccgaatatcancangag
4.1 aagtagacacagcctctgatagcccccttctcattctaccctgactttctacatgtgg
2.1 atagcg-----gaatcgaccgtatatttctagtgtcccaatcactattgtccatgaaa

5.1 agaatgtaagacaaaanaaataattacaacatattggcgcacttggtatccncaag----
4.1 tagatga-gacca-----gccccttgaaagatctcccc---tccgcagcggggagggtg
2.1 tagacga-agaca-----gccccttatatgacttgagtgaagcaggacattgacaatgcag

5.1 -----agtgggaatatacaaccat---gtagctccccattctccaaaatgtg
4.1 acttcgagctcgtgctgatcctaagtggagcgtggagtcac-ca-cgcgccct-g--
2.1 actttgaaatcgttgtcatcctggaagcattggtggagccac-tg-ccatgacaa-c--

5.1 tttaaagtacacgttacagctgcaanctttgtggagnagnncctcctnnctcttttctt
4.1 --tcaagt-----tcgcacttctcat-ctaccggaggagatc-----ct
2.1 --gcaatg-----ccggagttcatat-ctggccaatgagatt-----ct

5.1 ctcggnntatggca-----tgcttctggaagat-annc-----
4.1 ctggggctacgagttcacacc--tgctatctcactgtcagccagtggaatacgtggct
2.1 ctggggctaccgctacgagccggtgctctttgaaagag-aagcattgctata-aagtagac

5.1 ---tgnaatatttgaatnccacnntgaaaanncgnaagctact-tc-----
4.1 gacttcagcctttttgaccaggttgtaagtg---cgtc---cggtggtctccga
2.1 tat-tcaagatt--ccataagacttacgaagtacctaactcccctttgtagtgcaga

5.1 -----cgtnananncanact-----angtgatcn
4.1 ga--tagcaccgtacgttatggagaccagaaaa-----gctca
2.1 gacttagcagagaa-gaaatacatcctctcaaatgcaattcattttgctatgaaaatga

5.1 --ntgnngga-acntttngaangaaatt--aaaatataaccnattnngncnccctanng
4.1 agttggaggagtcattaagagagcaagctgaaaaggaaggcagtg-----cccttagtg
2.1 agttgcc-----ctaacaagcaaagaggaagagg---acagtgagaacggagttccag

5.1 ntcgnattatt-----tcaaan----cnnt
4.1 tgcgcattagtaacgtctgagcggccgcccaccgcatctggttaccactaaa---ccag
2.1 agagcacaagtagcagactcacctcctggcatag--atctc--cacaaccaggcagcgtg

5.1 gtttaanaancccnaccgtggaanncgntngcnt-----tngccctncc-
4.1 cctcaagaacac-ccgaatg--gagctcttaagctacataataccaacttacactttaca
2.1 cctctagagccc-agc-----

```

```

5.1 ---
4.1 aac
2.1 ---

```

Figura 15. Secuencias de Kir clonadas de OLs

Se muestran las secuencias completas de Kir 5.1, Kir 4.1 y Kir 2.1.

6.4. Subunidades Kir de OLs expresadas heterológamente en ovocito de *Xenopus laevis*.

Al comparar las subunidades Kir que expresan los OLs en cultivo contra las secuencias reportadas en la base de datos, resultaron ser idénticas para las subunidades Kir 4.1, 2.1 y 5.1. Para confirmar que estas subunidades se comportan electrofisiológicamente de acuerdo con lo reportado previamente (e.g., Xu et al., 2000), y en especial con respecto a su sensibilidad a H⁺ (Xu et al., 2000, Yang et al., 2000), se realizaron experimentos para monitorear la sensibilidad a H⁺ de estas subunidades expresadas de manera heteróloga en ovocitos de *X. laevis*. Nuestro principal interés en estos experimentos, fue monitorear las características de la corriente generada, así como el posible efecto por la acidificación del medio intracelular, sobre los canales homoméricos, tanto Kir 4.1 como Kir 2.1 (la subunidad Kir5.1 no forma canales funcionales, Yang et al., 2000), y sobre los posibles heterómeros, Kir 4.1/5.1 o Kir 4.1/2.1.

De esta manera, 48 h después de microinyectar el cRNA correspondiente, las corrientes transmembranales fueron monitoreados con la técnica de control de voltaje con dos electrodos. Los protocolos que se siguieron, fueron semejantes a los aplicados en OLs. Los ovocitos fueron controlados a -80 mV mientras fue perfundida la solución de Ringer normal, conteniendo 5 mM KCl (solución K5), o después de un tiempo de registro control, la perfusión de solución conteniendo 25 mM KCl (solución K25). En todos los casos analizados, la perfusión de K25 provocó un aumento robusto de corriente entrante que fue bloqueada de manera potente por la adición de 100 μM Ba²⁺, este efecto fue por completo reversible en pocos segundos al regresar a la solución K25, finalmente, la corriente entrante también disminuye rápidamente al regresar a solución K5 (Figura 16).

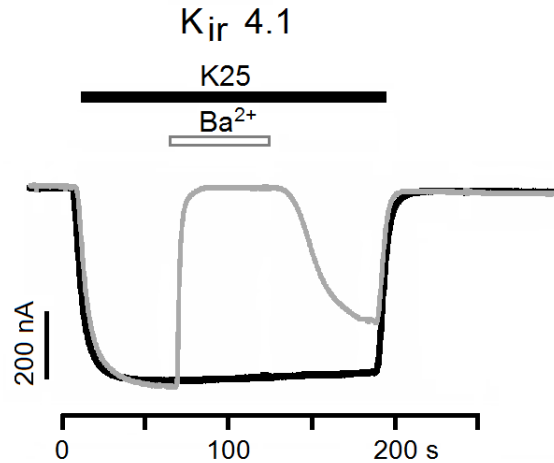


Figura 16. Corriente provocada por la expresión de la subunidad Kir 4.1 en ovocitos de *Xenopus* y su sensibilidad a Ba²⁺.

En negro el registro representativo de la corriente (en -80 mV) tipo Kir en K25, monitoreada por control de voltaje, en un ovocito microinyectado con el cRNA de la subunidad Kir 4.1. En gris se muestra el bloqueo de la corriente en K25 por 100 μ M Ba²⁺. Todas las subunidades Kir que fueron monitoreadas en las distintas conformaciones mostraron sensibilidad semejante a Ba²⁺.

6.6. Cambios en pHi de ovocitos monitoreados por "Ratioocyte".

A continuación, la sensibilidad a H⁺ para cada una de las conformaciones fue evaluada. De manera similar a lo realizado en OLs, fueron utilizadas soluciones externas conteniendo acetato (Ac⁻); según los reportes previos esta solución provoca también en el citoplasma del ovocito una disminución significativa del pH (Choe et al., 1997, Pessia et al., 2001, Casamassima et al., 2003). El grado de acidificación en el ovoplasma, debido a la perfusión de soluciones conteniendo ácidos débiles, depende de varios factores, el más importante es el pH al cual se ajustan las soluciones de perfusión. Para confirmar que nuestras soluciones utilizadas provocaban una disminución del pHi en los rangos esperados, en este trabajo, y en colaboración con el Dr. Anselm Zdebik del University College London llevamos a cabo mediciones radiométricas del pHi en ovocitos de *X. laevis*, utilizando una técnica fluorométrica (Ratioocyte) que permitió monitorear los

cambios en el pHi usando el indicador de pH fluorescente BCECF. Nuestros resultados utilizando esta técnica, mostraron que la aplicación de soluciones conteniendo acetato (55 mM) durante algunos segundos (50-100 s), provocaron una caída robusta del pHi, estimada por el cambio en fluorescencia del indicador BCECF. Tomando en cuenta las curvas de calibración realizadas de manera semejante a lo descrito para el uso de pHrodo® Green en OLS, la perfusión de los ovocitos con solución K25-Ac⁻ ajustadas a pH 6.3 provocó una caída del pHi a valores 5.7 ± 1.2 , mientras que soluciones ajustadas a pH 6.8 provocaron una disminución del pHi a 6.4 ± 0.8 (Figura 17).

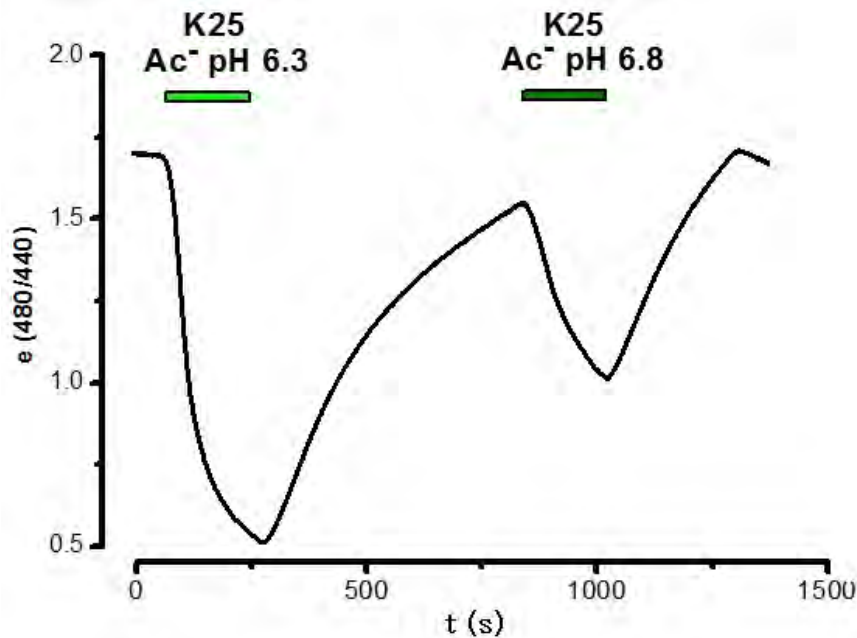


Figura 17. Curso temporal del cambio en pHi provocado por acetato en ovocitos de *Xenopus* monitoreado con el método “Ratioocyte”.

Ovocitos cargados con el indicador BCECF fueron monitoreados para la fluorescencia emitida a 480 y a 440 nm, una menor proporción de emisión de fluorescencia ($e_{480/440}$) entre estos dos valores indica una mayor acidificación del ovoplasma. La gráfica muestra que la aplicación de soluciones conteniendo acetato, señalado por las barras superiores, provocaron una rápida acidificación del ovoplasma tanto para las soluciones externas ajustadas a pH 6.3 como la ajustada a pH 6.8 alcanzando un pHi de 5.7 y de 6.4, respectivamente.

6.7. Sensibilidad a H⁺ de las subunidades Kir provenientes de nervio óptico de rata expresadas en ovocito.

En los experimentos de expresión heteróloga de las subunidades Kir oligodendrogiales fueron evaluadas soluciones externas conteniendo Ac⁻ ajustadas a dos diferentes pHs, a pH 7.0 y pH 6.3 (trazos en verde en la Figura 18). En general el efecto de las soluciones conteniendo Ac⁻ sobre la corriente Kir alcanzaron un valor estable en aproximadamente 50 s, por lo que todos los valores de amplitud de la corriente fueron tomados en este tiempo de perfusión de las soluciones con Ac⁻.

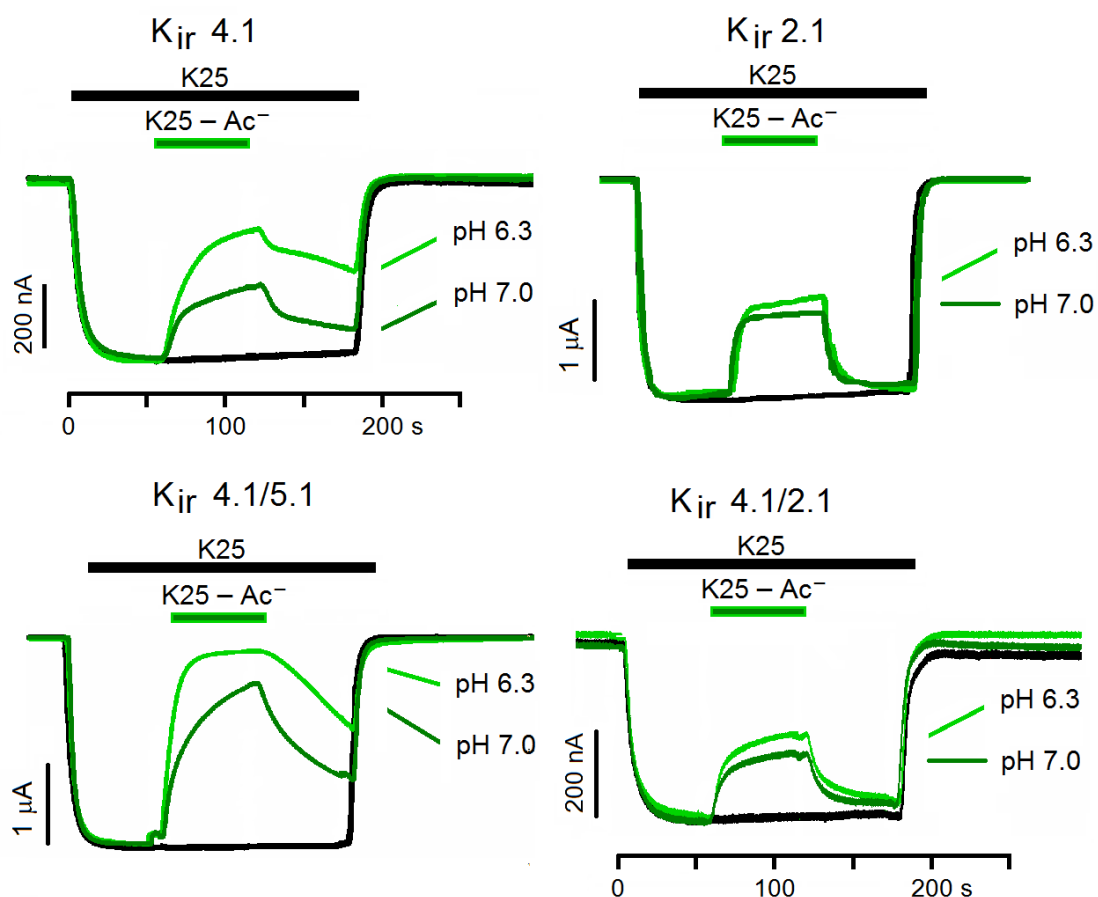


Figura 18. Corriente Kir monitoreada en ovocitos y su sensibilidad a H⁺.

A la izquierda se muestran registros representativos de ovocitos mantenidos en -80 mV y microinyectados con cRNA de Kir 4.1 y Kir 4.1/5.1 al ser perfundidos con K25-Ac- ajustado en pH 6.3 ó 7.0. En las mismas condiciones, a la derecha registros representativos de ovocitos microinyectados con cRNA de Kir 2.1 y Kir 4.1/2.1.

Utilizando este protocolo general, los ovocitos microinyectados con el cRNA de las distintas subunidades, o sus combinaciones, fueron evaluados de la misma manera (Figura 18).

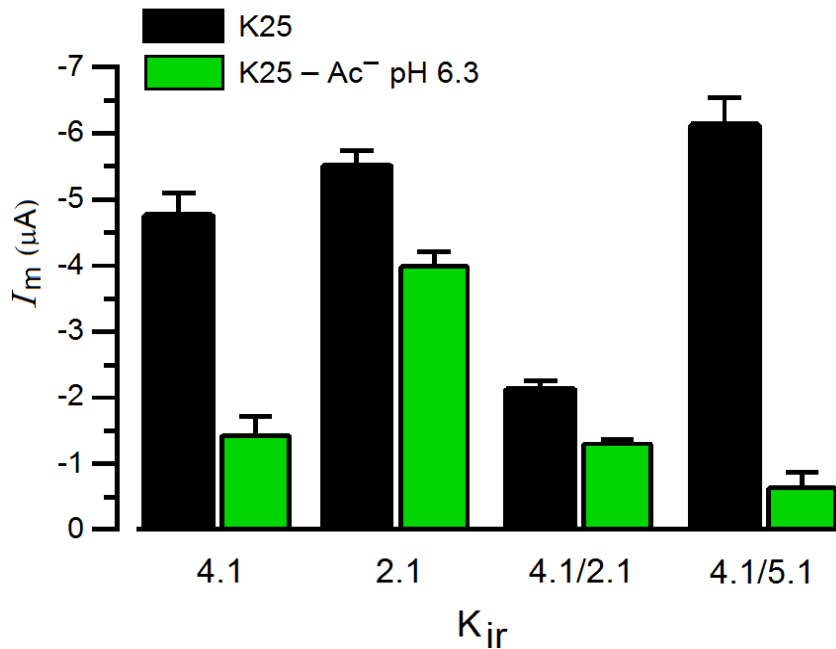


Figura 19. Corrientes Kir provocadas en ovocitos inyectados con las diferentes subunidades del canal y su sensibilidad a H⁺.

Las barras representan la amplitud de la corriente entrante medida en -160 mV durante la perfusión de solución K25 (barras negras) o 60 s después de perfusión con la solución K25-Ac⁻ ajustada en pH 6.3 (barras verdes), para grupos de ovocitos que fueron inyectados con el cRNA de las diferentes subunidades como se indica en el eje de las x (n > 6 OLS en cada caso).

La Figura 19 muestra el resumen de las corrientes registradas en las soluciones K25 o K25-Ac⁻ (pH6.3), para cada uno de los grupos de ovocitos (n ≥ 6 ovocitos en cada caso) inyectados con el cRNA de las subunidades indicados. Como se puede observar, la combinación de las subunidades Kir 4.1/Kir5.1 mostró ser la más sensible a la perfusión con Ac⁻, mientras que la menos sensible fue la corriente generada en ovocitos inyectados con el cRNA de Kir 2.1. Por ejemplo, la combinación Kir 4.1/5.1 registró inhibición del 85.0 ± 4.8% de la corriente, mientras

que la subunidad Kir 2.1 mostró la menor sensibilidad con $15.0 \pm 4.0\%$ de inhibición. Todas las subunidades en conformación tanto homomérica como heteromérica mostraron algún grado de sensibilidad al acetato, es decir al aumento de la concentración intracelular de H^+ .

También, para cada una de las conformaciones analizadas, fue evaluada la relación I/V de las corrientes en la solución K25 o en la solución K25- Ac^- (pH 6.3), las relaciones fueron construidas en el rango de voltaje de -160 mV a +40 mV desde un potencial de mantenimiento de -40 mV, aplicando para esto pulsos de voltaje de 500 ms (en pasos de 20 mV, Figura 20). Estas curvas mostraron que las corrientes entrantes generadas por la expresión de las diferentes subunidades, correspondieron en sus características cinéticas de manera cercana con lo reportado para cada una de ellas (e.g., Xu et al., 2000) y, además, mostraron que la sensibilidad al aumento de H^+ en el medio intracelular ocurrió en el rango completo de voltaje analizado.

De estos análisis se obtuvieron potencias de inhibición de la solución con Ac^- que fueron independientes del pH de esta solución (ya sea pH 7.0 o pH 6.3), aunque su valor de inhibición máximo siempre fue mayor para la solución en pH 6.3. Este orden de potencia de disminución de la corriente Kir correspondió a: Kir 4.1/5.1 > Kir 4.1 > Kir 4.1/ 2.1 > Kir 2.1 (Figuras 19 y 20).

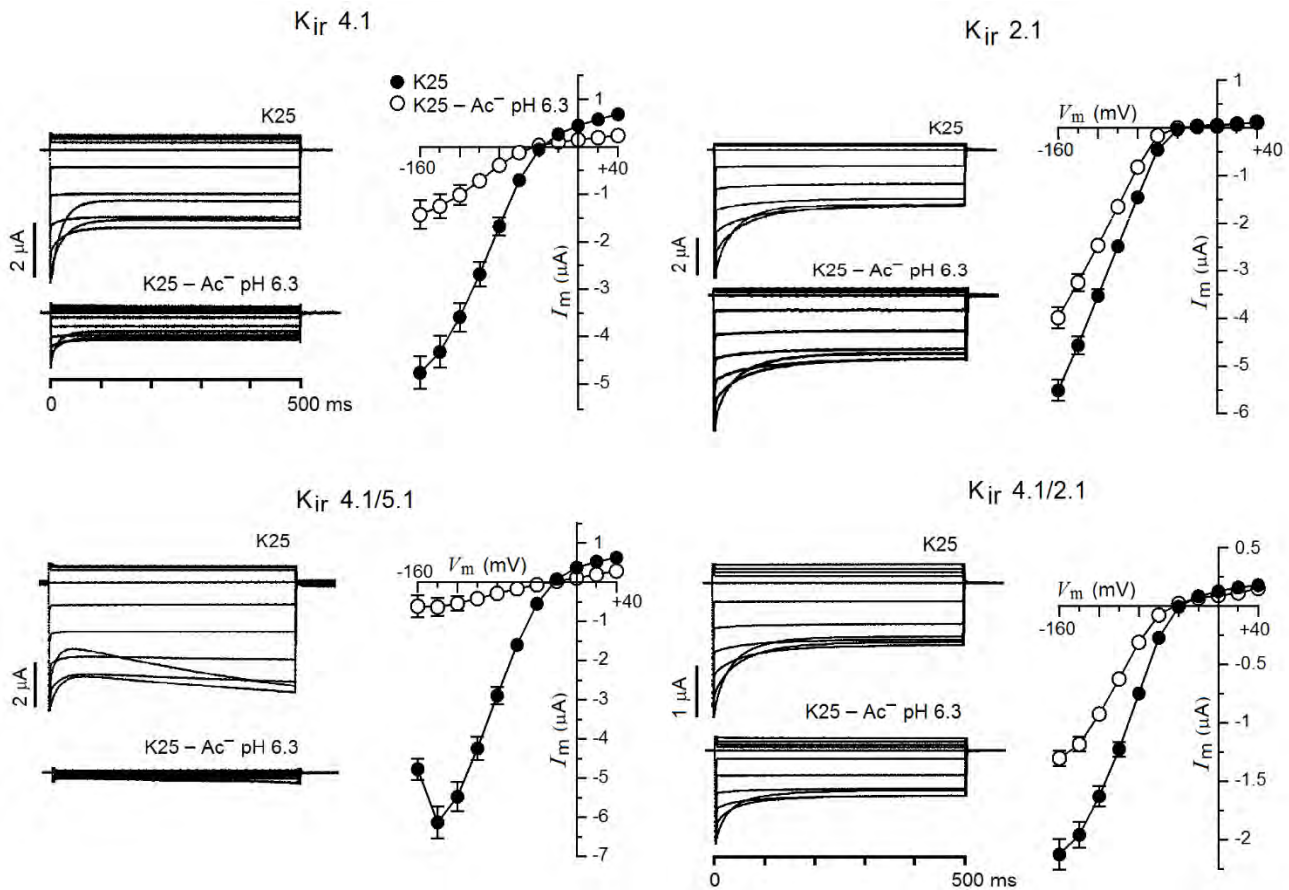


Figura 20. Relación I/V para las corrientes Kir expresadas en los ovocitos de *Xenopus* y su sensibilidad a H^+ .

Los trazos muestran corrientes transmembranales representativas de ovocitos inyectados con el cRNA de las subunidades según se señala, las corrientes fueron obtenidas en un potencial de mantenimiento de -40 mV y pulsando el potencial de -160 mV a $+40$ mV en pasos de 20 mV por 500 ms, mientras fueron perfundidas las soluciones K25 o K25-Ac⁻ ajustada a pH 6.3. Los puntos en las gráficas representan la corriente instantánea promedio en cada potencial para al menos 6 ovocitos en cada caso.

Además, otras dos conformaciones adicionales fueron evaluadas de la misma manera. Las corrientes generadas en ovocitos co-inyectados con el cRNA de Kir 2.1/5.1 mostraron una cinética similar a las mostradas por Kir 2.1, sin embargo, la amplitud máxima registrada en -160 mV fue menor, siendo de -3.5 ± 0.2 μA en K25 (comparado a -5.51 ± 0.63 μA de Kir 2.1); Al perfundir K25 - Ac⁻ en pH 6.3, la amplitud de la corriente Kir 2.1/5.1 se redujo a -2.96 ± 0.30 μA , lo que correspondió con una inhibición del 16 %, un valor similar al observado para Kir 2.1 (15 %).

La segunda conformación fue la co-inyección de los ovocitos, en proporciones iguales, con las tres subunidades Kir. En este caso, se observó que la cinética de la corriente fue semejante a la mostrada por Kir 4.1/5.1 en el rango de potencial evaluado, también su sensibilidad a las soluciones con acetato fue semejante a la mostrada por esta combinación, ya que el valor de inhibición al perfundir K25 – Ac⁻ en pH 6.3 la corriente fue inhibida por 67.5 % (Figura 21).

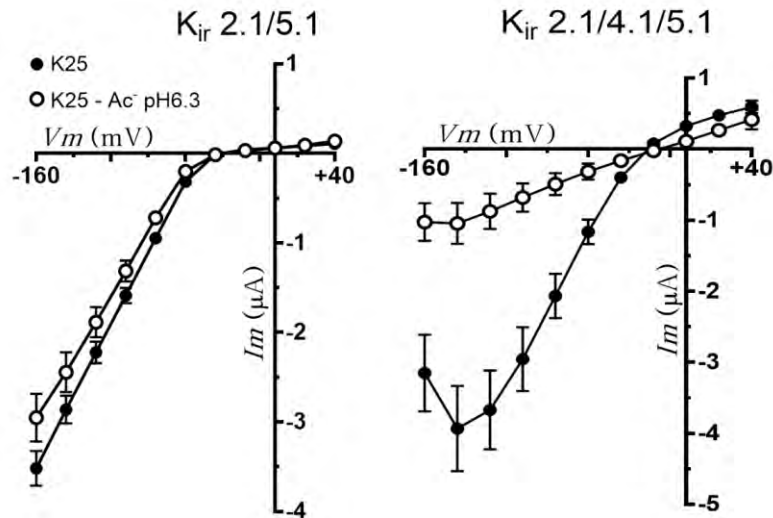


Figura 21. Análisis de las corrientes transmembranales de Kir 2.1/5.1 y Kir 2.1/4.1/5.1.

Relaciones I/V obtenidas, de manera similar a la figura anterior, en ovocitos microinyectados con Kir 2.1/5.1 o con la mezcla de las tres subunidades, tanto durante la perfusión con K25, o la solución K25-Ac⁻ pH 6.3. Los puntos en las gráficas representan la corriente instantánea promedio en cada potencial para al menos 6 ovocitos en cada caso.

6.5. Interacción Kir 4.1/2.1

Un caso especial es la combinación de las subunidades Kir 4.1 y Kir 2.1. Para esta combinación no existen datos previos de su sensibilidad a pHi, y fue entonces necesario explorar si esta combinación podría explicar la insensibilidad mostrada por los canales endógenos en OLS, ya que su co-inyección en proporciones iguales disminuyen la sensibilidad comparada al homomérico de Kir4.1 (Figura 22). Por lo

tanto, fueron realizados experimentos para favorecer la expresión de heterómeros de Kir 4.1/2.1 en ovocitos que fueron inyectados con una mayor proporción del cRNA de Kir 2.1 con respecto al de Kir 4.1.

La amplitud de corriente Kir registrada en ovocitos medida a -160 mV en K25 o K25-Ac⁻ (pH6.3) co-inyectados con Kir 4.1/2.1 en proporción 1:2 fue comparada con la corriente de Kir 4.1/2.1 en proporción 1:1. La proporción 1:2 mostró una mayor amplitud en solución K25, sin embargo, aun fue menor a los valores registrados por homómeros Kir4.1 (-4.7 ± 0.6 μA) o Kir2.1 (-5.5 ± 0.6 μA). La inhibición provocada por acetato en cambio pasó de 38.1 % en la proporción 1:1 a una inhibición del 28.35 % en la 1:2, en tanto la inhibición por acetato disminuyó significativamente, aun en condiciones en las que se favorecieron los heterómeros Kir4.1/2.1 los canales expresados mostraron claramente sensibilidad a H⁺ (Figura 21).

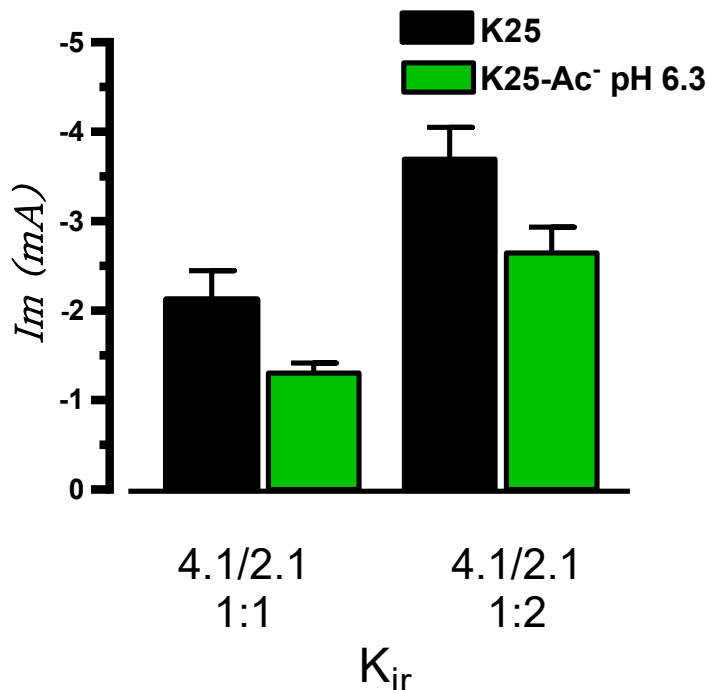


Figura 22. Kir 4.1/2.1 en distintas proporciones

La co-inyección de Kir 4.1/Kir 2.1 fue inyectada en las proporciones de 1:1 y 1:2, y sus propiedades tanto en amplitud como en sensibilidad a H⁺ (acetato) fue analizada utilizando los protocolos anteriores. Las columnas muestran la corriente instantánea promedio a -160 mV tanto en K25 como en K25-Ac⁻ pH 6.3.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo demostramos que los canales tipo Kir expresados en los OLs del nervio óptico son insensibles a la concentración intracelular de H^+ dentro del rango fisiológico de pH 8.0 a pH 5.0. Este hallazgo tiene importantes consecuencias, tanto en la determinación de la identidad molecular de los canales, como también para la comprensión de los mecanismos de regulación de los canales Kir, y la importancia de esta regulación en la fisiología del linaje oligodendroglial. La expresión de los canales tipo Kir en el linaje oligodendroglial tiene una relación fundamental con el proceso de maduración. Esto se ha demostrado a través de diversos estudios, los cuales reportan una correlación directa entre la densidad de la corriente Kir expresada y el grado de maduración de los OLs. Por ejemplo, en animales KO para los canales tipo Kir 4.1 (Neusch et al., 2001), aparentemente la subunidad de mayor expresión en astrocitos y OLs, se demostró que los sujetos presentaban un alto grado de hipomielinización, y que esto es debido principalmente a una disminución en el porcentaje de células oligodendrogliales que maduran a OLs mielinizantes (Greenwood et al., 2005, Butt 2006). Aun y cuando se sabe que la subunidad Kir 4.1 es de expresión fundamental para la conformación de los canales Kir en OLs (Neusch et al., 2001), la comprobación de su participación no es en realidad directa, y se desconoce además si esta conformación puede ser variable entre OLs de diferentes regiones del SNC, o inclusive si varía dependiendo de la edad de los sujetos. Esto es debido, principalmente, al hecho de que los canales Kir son entidades moleculares conformadas por cuatro subunidades, si bien la subunidad Kir 4.1 es capaz de conformar canales Kir homoméricos, es ampliamente reconocido que la expresión de diversos tipos de subunidades ocurre en la macroglía, tanto en astrocitos como en OLs (Nwaobi et al., 2016). Un antecedente directo de nuestro trabajo, mostró que los OLs provenientes del nervio óptico de la rata expresan tanto a nivel del mRNA como de las proteínas respectivas, las subunidades Kir 4.1, Kir 5.1, y Kir 2.1. Es por esta evidencia que resultó necesario cuestionarse la composición de los canales tipo Kir en los OLs, ya que Kir 4.1 es capaz de formar canales heteroméricos tanto con Kir 5.1 como

con Kir 2.1. Al mismo tiempo, fueron publicadas evidencias por inmunocitoquímica, de que al menos las subunidades Kir 4.1 y Kir 5.1 son co-expresadas y co-localizan en el nervio óptico del ratón (Brasko et al. 2016). La estequiometría de los canales es importante, porque de ésta dependen sus características funcionales, y la capacidad de ser regulados por varios factores celulares.

Nuestros resultados previos también demostraron que los canales tipo Kir en OLS no fueron regulados por un cambio del pHi de 7.3 a 6.3. La razón de monitorear la corriente tipo Kir en estas dos condiciones de pHi, fue el hecho de que los homómeros de Kir 4.1 son inhibidos con un pKa de 6.0, mientras que los heterómeros Kir 4.1/Kir 5.1 son aún más sensibles a H⁺ y son inhibidos con un pKa de 7.5 (Kubo et al., 2005, Hibino et al., 2010). Así que, determinando la potencia de una posible inhibición en pHi 6.3, aportaría información sobre la probable participación de las subunidades Kir 5.1, o señalaría un probable homómero de Kir 4.1. Los resultados obtenidos fueron inesperados en el sentido de que las corrientes Kir en los OLS estudiados mostraron insensibilidad en un pHi de 6.3. A partir de este resultado surgieron una serie de preguntas que fueron exploradas y resueltas en el presente trabajo de tesis. Sin embargo, antes de discutir los nuevos hallazgos, será importante detallar lo siguiente: 1) El por qué calificamos de inesperado el resultado anterior, y 2) El reiterar un antecedente directo del presente trabajo, el cual descarta de manera directa un probable artefacto debido a la técnica que se utilizó en los experimentos anteriores.

Primero, los estudios sobre la sensibilidad a H⁺ de canales tipo Kir son amplios y de interés para las funciones que llevan a cabo los canales según su contexto celular; por ejemplo, en células renales la expresión de la subunidad Kir 4.1 y su sensibilidad al pHi influyen en la homeostasis del K⁺, Na⁺ y H⁺. Otras subunidades como la Kir 1.1 y Kir 7 que presentan una alta sensibilidad a los H⁺ son esenciales en la fisiología de riñón, plexo coroideo y retina (Hibino et al., 2010). El hecho de que los canales conformados por estas subunidades son sensibles al pH en rangos fisiológicos, provoca que su estudio resulte de interés en el contexto del tipo celular en el que se expresan, y en su caso ha sido de interés también el definir los

determinantes moleculares que le proporcionan esta sensibilidad a protones (Qu et al., 2000). Sin embargo, se debe de aclarar que actualmente se considera que prácticamente todos los canales tipo Kir presentan sensibilidad a los H⁺ aunque algunos lo son en un rango fuera del que podríamos considerar fisiológico, tal es el caso, por ejemplo, de la subunidad Kir 2.1 que es inhibido con una pKa de alrededor de 4.9 (Qu et al., 2000). Tomando en cuenta estos resultados, que han sido confirmados por varios grupos (Yang et al., 2000; Pessia et al., 2001; Su et al., 2007), el hecho de que las corrientes tipo Kir activadas en OLs no sean inhibidas por la disminución del pHi, resulta en un comportamiento inusual que podría tener un correlato en la estructura del canal y/o una razón extrínseca a la(s) proteína(s) que conforma(n) los canales.

Segundo, sin duda, una posibilidad es que nuestras mediciones hechas con la técnica estándar de control de voltaje en célula completa, que propicia la diálisis del citoplasma, podría producir un artefacto de medición al dializar el contenido del citoplasma, esto podría provocar la pérdida de algún componente necesario para mantener la sensibilidad de los canales Kir en los OLs. Para explorar esta posibilidad, y como control positivo de la técnica utilizada, se realizaron registros en cultivos primarios de astrocitos, que también expresan subunidades Kir 4.1. Los resultados en los astrocitos mostraron que las corrientes Kir registradas eran sensibles a pH 7.3 y 6.3, presentando una disminución en la densidad de la corriente significativa. Este efecto se acentuó aún más a pHi 5.5 ó 5.0, el resultado mostró, primero, que las corrientes Kir en este tipo celular muestran una sensibilidad al pHi típica de canales que contienen a la subunidad Kir 4.1. Sin embargo, también indicó que nuestro rango de pHi debía ser ampliado en los registros de OLs, lo cual fue uno de nuestros primeros experimentos realizados.

La insensibilidad al pHi de parte los canales Kir en los OLs podría ser debida a varias causas, aquí exploramos algunas de ellas, y descartamos las más importantes: 1) La diálisis de componentes del citoplasma, 2) Cambios intrínsecos en las proteínas, y 3) Un efecto producido por la combinación probable entre varias subunidades.

Antes de comenzar este análisis, mostramos que las corrientes registradas en OLs en cultivo corresponden a canales Kir, ya que responden a un incremento del K^+ extracelular recorriendo hacia valores más positivos el potencial de inversión de las corrientes de membrana. También mostramos que las corrientes provocadas en alto K^+ (solución externa K25) son sensibles al Ba^{2+} extracelular en el rango μM (11 μM), que es un valor típico para canales Kir (Kubo et al., 2005). Un dato de importancia adicional fue el hecho de que la corriente entrante inducida con K25, aumenta con el tiempo en cultivo, durante el cuál los OLs continúan madurando hasta alcanzar propiedades mielinizantes. El aumento de esta corriente, fue también a expensas, prácticamente en su totalidad, del aumento en la densidad de canales de K^+ tipo Kir, tal y como lo demuestran sus características biofísicas y su fuerte sensibilidad a Ba^{2+} . Es por ello, que utilizamos en todo el estudio estos dos parámetros, para confirmar la naturaleza Kir de las corrientes entrantes en los OLs y en los ovocitos.

Utilizando la aplicación de solución K25 y bloqueo por 100 μM Ba^{2+} , podemos concluir de los experimentos mostrados en la Figura 9, que los canales Kir de los OLs no mostraron sensibilidad al pH_i en el rango de pH 8.0 a pH 5.0. Tampoco se observaron cambios importantes en la cinética de las corrientes al realizar las curvas I/V, que mostraron, además, que la independencia al pH se mantiene en todo el rango de voltaje analizado.

Si bien, la demostración de que los astrocitos si presentan sensibilidad al pH_i , sugiere que la presencia del citoplasma intacto no es un requisito para la observación del efecto inhibitorio sobre Kir, surge la posibilidad de que de manera específica, el citoplasma de los OLs si contribuya de alguna manera a la sensibilidad de sus corrientes Kir a través de un factor extrínseco. Por esta razón, realizamos un análisis de acidificación intracelular de los OLs perfundiendo un ácido débil, como el acetato de Na^+ , mientras se registraba la corriente Kir utilizando la técnica de control de voltaje con parche perforado por gramicidina. La acidificación del citoplasma en los OLs fue medida en experimentos realizados en paralelo utilizando metodologías fluorométricas, los cuales permitieron medir el curso

temporal del cambio de pHi en OLs cargados con el indicador fluorescente permeable pHRod-AM. Los resultados de estos experimentos muestran que el pHi en los OLs disminuye por hasta 20 s en presencia de la solución con acetato a un pHi de entre 5.5 a 6.5 (Figura 12; desde un pHi basal de 7.4 ± 0.1), este cambio ocurrió de manera homogénea en la mayoría (>95%) de las células estudiadas. Considerando que, en la mayoría de las células tratadas con solución de acetato (K5 o K25), se provocó un importante cambio del pHi durante varios segundos, la manipulación experimental podría ser utilizada para observar efectos sobre las Kir de OLs. Para esto fue utilizada la técnica de parche perforado (Kyzozis & Recling 1995), que propicia el acceso eléctrico y mantiene el citoplasma intacto, pero además no permite el paso del amortiguador de pH de la pipeta al citoplasma, por lo que no afecta el cambio en la concentración de H^+ provocado por el acetato. Los resultados ilustrados en las Figuras 13 y 14, muestran que la perfusión de solución K25- Ac^- en OLs bajo control de voltaje, no muestran una disminución significativa de la corriente Kir generada. Si bien, la aplicación de acetato extracelular provocó una corriente de salida, que es la esperada si hubiera un cierre de canales de K^+ (entre otras posibilidades), esta corriente saliente no fue dependiente de la concentración de K^+ extracelular por lo que su generación no puede ser atribuida a cambios en la conductancia de Kir. Esto sugiere que las corrientes tipo Kir en los OLs, son insensibles a la disminución del pHi aun con el citoplasma intacto, por lo que la posibilidad de que un factor intrínseco sea la razón de esta insensibilidad se vio reforzada.

Los OLs, en nuestras condiciones experimentales de cultivo, expresan tanto el mRNA como la proteína de las subunidades Kir 4.1, Kir 5.1 y Kir 2.1. Estas tres subunidades han mostrado formar heterómeros, principalmente la subunidad Kir 4.1 con alguna de las otras dos. La combinación mejor estudiada es el heterómero Kir 4.1/Kir 5.1, que además ha sido co-localizada en varios tipos celulares incluidos OLs del nervio óptico (Brasko et al., 2017). Las subunidades no habían sido clonadas a partir del mRNA de OLs de rata, por lo que sus propiedades funcionales intrínsecas no habían sido confirmadas, la posibilidad de que propiedades diferentes podrían ser debidos a cambios en su secuencia era entonces un factor

que era necesario mostrar, o descartar. A lo largo de este estudio, en nuestro laboratorio, se obtuvieron las secuencias completas de los genes que codifican para cada una de las subunidades en cuestión (Figura 15). Los resultados indican que las secuencias expresadas en los OLS son idénticas a las descritas en otros tipos celulares de rata. Por lo tanto, la insensibilidad a H^+ podría no ser debida a cambios en la secuencia de las proteínas, aunque sus características funcionales debían ser confirmadas. Para ello, se expresaron las subunidades en un sistema heterólogo, para estudiar sus características electrofisiológicas y de manera especial, para analizar su sensibilidad al pH. Los experimentos fueron realizados utilizando el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de la rana *Xenopus laevis* (Miledi et al., 1985; Matute et al., 1992; Arellano et al., 1995), modelo de gran utilidad en este tipo de estudios. Podría ocurrir que una combinación aun no estudiada, de estas subunidades, presentara insensibilidad al pH, por lo que experimentos de co-expresión fueron diseñados para explorar sus características. En estudios previos, de otros grupos (Yang et al., 2000, Xu et al., 2000), se mostró que la combinación Kir 4.1/Kir 5.1 es más sensible al pH que el homómero de Kir 4.1 (el homómero de Kir 5.1 no forma canales funcionales). El análisis de las corrientes tipo Kir expresadas en la membrana de los ovocitos, fue realizado de manera similar a lo realizado en nuestro estudio en los OLS, en este caso se utilizó la técnica de control de voltaje con dos electrodos que es la técnica estándar para células de mayor tamaño. Una vez inyectado el cRNA correspondiente y transcurrido el tiempo de expresión, la corriente transmembranal de los ovocitos fue monitoreada, mientras que fue aumentada la concentración de K^+ en el medio externo, a una concentración de 25 mM, solución K25. Los ovocitos inyectados con el cRNA de Kir 4.1 o de Kir 2.1, generaron robustas corrientes entrantes que fueron bloqueadas por más del 95% cuando fue agregado 100 μM Ba^{2+} . Tanto los ovocitos nativos como aquellos inyectados con la subunidad Kir5.1 no mostraron un cambio importante en la conductancia de la membrana, y tampoco generaron un aumento de la corriente entrante. Sin embargo, la co-inyección del cRNA de Kir 4.1/Kir 5.1 produjo corrientes entrantes, con características cinéticas diferentes al homómero de Kir 4.1, confirmando reportes previos (Kubo et al., 2005, Hibino et al., 2010). En

general, los cursos temporales de las corrientes en estos tres casos, presentan diferencias claras, que parecen ser una primera sugerencia de diferencias estructurales entre los canales formados. En todos los casos la sensibilidad a $100 \mu\text{M Ba}^{2+}$ fue alta, provocando una inhibición $>95\%$, y confirmó la acción de este catión sobre canales tipo Kir. Una combinación poco estudiada, la conformada por las subunidades Kir 4.1/Kir 2.1, fue también analizada, aún y cuando la cinética de las corrientes Kir expresadas en el ovocito al inyectar ambas secuencias no parece ser diferente a aquella del Kir 2.1 homomérico, cambios en la amplitud de la corriente con respecto a las inyecciones homoméricas hacen suponer algún tipo de interacción. Esto fue explorado con mayor detalle más adelante.

Los siguientes experimentos correspondieron a explorar la sensibilidad a H^+ de los canales Kir clonados de los OLs una vez expresados en ovocitos. Para provocar una acidificación del ovoplasma, los ovocitos fueron perfundidos con soluciones conteniendo acetato (una maniobra igual a la realizada con los OLs) (Choe et al., 1997), el protocolo general fue generar la corriente entrante perfundiendo con solución K25 hasta obtener una corriente estable, alrededor de 50 s, y entonces perfundir la solución K25 conteniendo acetato (K25-Ac⁻), nuevamente hasta obtener una corriente estable, por lo general alrededor de 50 s (Figura 18). Esto fue realizado para una serie de ovocitos inyectados con el cRNA de alguna de las siguientes secuencias: sólo Kir 4.1, o Kir 2.1; o las co-inyecciones Kir 4.1/5.1, Kir 4.1/2.1, Kir 2.1/5.1 o Kir 4.1/Kir 5.1/Kir 2.1. Los resultados muestran que todas las corrientes tipo Kir expresadas por estas secuencias muestran sensibilidad a la aplicación de la solución con acetato, es decir a la disminución del pHi. El orden de la sensibilidad al pH de las corrientes Kir fue la siguiente: Kir 4.1/Kir 5.1 = Kir 4.1/Kir 5.1/Kir 2.1 > Kir 4.1 > Kir 4.1/2.1 > Kir 2.1. Este orden, específicamente, Kir 4.1/Kir 5.1 > Kir 4.1 > Kir 2.1, es idéntica a la reportada anteriormente para las secuencias de las subunidades clonadas de cerebro, y expresadas heterológicamente en ovocitos de *X. laevis* (Xu et al., 2000). Nuestros resultados co-inyectando Kir 4.1 y Kir 2.1 indican una sensibilidad intermedia entre Kir 4.1 y Kir 2.1 homoméricos, esto podría indicar que los canales expresados en el ovocito al inyectar las dos secuencias están formados fundamentalmente de una mezcla de

homómeros de las secuencias, es decir que la eficiencia de formación del heterómero es baja. Sin embargo, al comparar las amplitudes de las corrientes alcanzadas al inyectar las secuencias por separado (Figura 18), contra las que se obtienen con la co-inyección, se observó, de manera consistente, que la combinación provocó una disminución drástica y estadísticamente significativa de la corriente expresada; esto arguye claramente en contra de la formación independiente de homómeros, y apoya la idea de algún tipo de interacción, que se vio reforzada por los experimentos en donde la proporción de Kir 2.1 vs. Kir 4.1 fue aumentada (Figura 22). Esta posible interacción debe seguir siendo explorada, ya que no existen evidencias directas de la heteromerización de estas subunidades, y sus propiedades no han sido estudiadas con detalle. Finalmente, la coinyección de las tres subunidades parece favorecer la formación de heterómeros Kir 4.1/Kir 5.1, ya que sus propiedades cinéticas y sensibilidad al pH son prácticamente iguales (Figura 21).

Los esfuerzos por localizar el sensor de pH en aminoácidos o en dominios dentro de la estructura de los canales Kir sensibles a H^+ coinciden en la posibilidad de que no exista como tal. En estudios de mutagenesis, al cambiar un aminoácido identificado como el sensor de pH, como en la mutación K80M en Kir 1.1 o K67M en Kir 4.1 (Pessia et al., 2001), el canal permanece abierto en pH ácido debido a que la conformación del estado abierto del canal se ve favorecida. Sin embargo, no se pierde en su totalidad la sensibilidad a H^+ comportándose como canales con baja sensibilidad al pH_i como Kir 2.1, por lo que se piensa que continúan existiendo interacciones adicionales que permiten el cierre del canal en pH fuera del rango fisiológico.

La propuesta actual es que los canales Kir presentan un grado de sensibilidad a H^+ intrínseco y que la presencia de aminoácidos que aceptan H^+ , como K67 en Kir 4.1, en sitios de la estructura involucrados directamente en el gaiting, como la hélice de cruce, Figura 3, puede favorecer la conformación del estado cerrado en condiciones de pH ácido. Pero no es el sensor de pH, más bien es pieza clave para que se

mantenga la estabilidad entre el estado abierto y el cerrado del canal (Paynter et al. 2010).

En resumen, el análisis funcional de las secuencias de subunidades Kir oligodendrogiales indica claramente que su insensibilidad a H^+ no depende de factores intrínsecos de su estructura primaria y tampoco es explicable por interacciones entre las principales subunidades señaladas. Esto permite concluir que el efecto observado depende de algún factor extrínseco a los canales Kir, este factor elimina la sensibilidad a los H^+ (en el rango fisiológico); debido a que el factor no parece ser inactivado por la diálisis del citoplasma, es probable que el mecanismo involucrado dependa de interacciones íntimas entre los elementos involucrados. Este tipo de interacciones es en realidad común entre las subunidades Kir (Hibino et al., 2010), las más estudiadas son aquellas que se dan entre subunidades de proteínas G con subunidades Kir 3, en particular con Kir 3.1 y Kir 3.2 (Schreibmayer W et al. 1996, Peleg S et al., 2002), y aquellas con el receptor de sulfonilureas con las subunidades Kir 6.1 y Kir 6.2 (Isomoto et al., 1996; Yamada et al. 1997). Aun y cuando se tratan de asociaciones con casos específicos de subunidades Kir, en general, se sabe que los canales Kir son modulados por una variedad amplia de elementos citoplásmicos y membranales, que deben ser tomados en cuenta para evaluar su posible papel en la insensibilidad al pH_i de los canales Kir en OLs. Uno de estos factores es el PIP2 que al unirse a las subunidades Kir reduce la probabilidad del cierre de los canales estabilizando su estado abierto (Schulze et al., 2003; Du et al., 2004).

Las consecuencias de esta modulación en la fisiología de los OLs y sus repercusiones de su interacción con los axones y otras células del sistema nervioso quedan por ser exploradas, sin embargo, es previsible que la insensibilidad a H^+ podría conferir características especiales a corrientes que son esenciales en la homeostasis iónica, en un complejo celular donde las relaciones entre las concentraciones de Na^+ , K^+ y H^+ que se encuentra en constante dinámica debido al altamente demandante gasto metabólico del nervio óptico.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Los OLs de nervio óptico de rata mantenidos en cultivo durante 2-3 DIV presentan corrientes tipo Kir insensibles a H⁺.
- 2.- La insensibilidad a H⁺ en los OLs no es debida a la dilución de factores intracelulares extrínsecos al canal.
- 3.- La secuencia del mRNA de las subunidades Kir 4.1, Kir 5.1 y Kir 2.1 es idéntica a la observada en otros tipos celulares, por lo que la insensibilidad no puede ser explicada por cambios en su secuencia.
- 4.- Las subunidades Kir clonadas de OLs y expresados heterológamente en ovocitos de *X. laevis* muestran sensibilidad a H⁺ con la potencia: Kir 4.1/5.1 > Kir 4.1 > Kir 4.1/2.1 > Kir 2.1. Por lo que la insensibilidad no puede ser explicada por interacciones entre estas subunidades.
- 5.- Se propone que en OLs los canales Kir interactúan de manera íntima con un factor o factores, membranales y/o citoplásmicos, lo cual produce su insensibilidad a los H⁺.
- 6.- La coinyección Kir 4.1/2.1 expresa una amplitud de corriente y sensibilidad a H⁺ que no corresponden con la mostrada por Kir 4.1 o Kir 2.1 por separado, sugiriendo la formación de heterómeros.

9.REFERENCIAS

- Allen N y Barres B. (2009). Neuroscience: Glia-more than just brain glue. *Nature*; 457: 675-677.
- Arellano RO, Miledi R. (1993). Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *The Journal of General Physiology*; 102: 833-857.
- Arellano RO, Woodward RM, Miledi R. (1995). A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology*; 484(3): 593-604.
- Anumonwo J, Lopatin A. (2010). Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 48(1): 45-77.
- Bhate M, Wylie B, Tian L, McDermott A. (2010). Conformational dynamics in the selectivity filter of KcsA in response to potassium ion concentration. *Journal of Molecular Biology*; 401(2): 155-166.
- Bichet D, Haass F & Jan L. (2003). Merging functional studies with structures of inward rectifier K⁺ channels. *Nature Reviews Neuroscience*; 4: 957-967.
- Brasko C, Hawkins V, Chacon De La Rocha I, Butt A.M. (2017). Expression of Kir4.1 and Kir5.1 inwardly rectifying potassium channels in oligodendrocytes, the myelinating cells of the CNS. *Brain Structure and Function*; 222 (1): 41-59.
- Butt A, Kalsi A. (2006). Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*; 10 (1): 33-44.
- Casamassima M, D'Adamo M, Pessia M, Tucker S. (2003). Identification of a heteromeric interaction that influences the rectification, gating, and pH sensitivity of Kir4.1/5.1 potassium channels. *The Journal of Biological Chemistry*; 278 (44): 43533-43540.
- Coetzee W, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Morena H, Nadal M, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, De Miera E, Rudy B. (2006). Molecular diversity of K⁺ channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 868: 233-255.

- Choe H, Zhou H, Palmer L, Sackin H. (1997). A conserved cytoplasmic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance, and gating. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* Published; 273 (4): 516-529.
- Czopka T, Frrecn-Constant C, Lyons D. (2013). Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths *in vivo*. *Developmental Cell*; 25: 599-601.
- Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rochacs T and Logothetis D. (2004). Characteristic Interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of Kir channels by diverse modulators. *The Journal of Biological Chemistry*; 279: 37271-37281.
- Fakler B, Bond CT, Adelman JP, and Ruppersberg JP. (1996). Heterooligomeric assembly of inward-rectifier K⁺ channels from subunits of different subfamilies: Kir2.1 (IRK1) and Kir4.1 (BIR10). *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*; 433: 77–83.
- Faivre-Sarrailh C, Jérôme J. Devaux. (2013). Neuro-glia interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*; 7:1-13.
- Florez J, Armijo J, Mediavilla Á. (1997). *Farmacología humana*. 3ª edición. MASSON, S.A. Barcelona.
- Fowler P, Tai K, Sansom M. (2008). The selectivity of K⁺ ion channels: Testing the hypothesis. *Biophysical Journal*; 95(11): 5062-5064.
- Fujiwara Y, Kubo Y. (2002). Ser165 in the second transmembrane region of the Kir2.1 channel determines its susceptibility to blockade by intracellular Mg²⁺. *The Journal of General Physiology*; 120(5): 677-693.
- Greenwood K, Bolton S, But AM. (2005). Evidence of a role for the inwardly rectifying potassium channel (Kir) 4.1 in oligodendrocyte development. *Journal of Anatomy*; 206(5): 493-494.
- Hansen S, Tao X, Mackinnon R. (2011). Structural basis of PIP₂ activation of the classical inward rectifier K⁺ channel Kir 2.2. *Nature*; 477(7365): 495-498.
- Hille B. (1970) Ionic channels in nerve membranes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*; 21:1-32.

- Hille B. (1984). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates. Washington; 66-68.
- Hille B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3a. edition. Sinauer Associates. Washington.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: Their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews*; 90: 291-366.
- Ho K, Nichols G, Lederer W, Lytton J, Vassilev M, Kanazirska M, Hebert S. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channels. *Nature*; 362: 31-38.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, and Kurachi Y. (1996). A novel sulphonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry*; 271:24321–24324
- Jahn O, Tenzer S, Werner H. (2009). Myelin proteomics: Molecular anatomy of an insulating sheath. *Molecular Neurobiology*; 40: 55-59.
- Kalsi A, Greenwood K, Wilkin G, Butt A. (2004). Kir 4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *Journal of Anatomy*; 204(6): 475-485.
- Kettenmann H. & Ransom B. (2013). *Neuroglia*. USA: Oxford University Press
- Kettenmann H. & Verkhratsky A. (2008). Neuroglia: 150 years after. *Trends in Neurosciences*; 31(12): 653-659.
- Khurana A, Shao E, Kim R, Vilin Y, Huang X, Yang R, Kurata H. (2011). Forced gating motions by a substituted titratable side chain at the bundle crossing of a potassium channel. *Journal of Biological Chemistry*; 286(42): 36686-26693.
- Kubo Y, Baldwin J, Jan Y, Jan L. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*; 362: 127-133.
- Kubo Y, John P. Adelman, David E. Clapham, Lily Y. Jan, Andreas Karschin, Yoshihisa Kurachi, Michel Lazdunski, Colin G. Nichols, Susumu Seino, & Carol A. Vandenberg. (2005). *International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and*

- molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacological Reviews*; 57(4): 509–526.
- Kyrozis A, Reichling DB. (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. *Journal of Neuroscience Methods*; 57 (1): 27-35.
- Lee Y, Morrison B, Li Y, Lengacher S, Farah M. (2012). Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*; 487: 443-444.
- Maljevic S, Lerche H. (2012). Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. *Journal of Neurology*; 260(9):2201-2211.
- McCoy J, Nimigean C. (2012). Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1818(2): 272-285.
- Miller DJ, Duka T, Stimpson CD, Schapiro SJ, Baze WB, McArthur MJ, Fobbs AJ, Sousa AMM, Sestan N, Wildman DE. (2012). Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proceedings of National Academy of Science*; 109 (41): 16480–16485.
- Miledi R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society London Biological Science*; 215 (1201): 491-497.
- Moctezuma J.P. (2014). Identidad Molecular de los Canales de K⁺ tipo Kir en Oligodendrocitos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Neusch C, Rozengurt N, Jaconbs R, Lester H, Kofuji P. (2001). Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and *in vivo* myelination. *The Journal of Neuroscience*; 21(5): 5429-5438.
- Nichols C, Lopatin N. (1997). Inward rectifier potassium channels. *Physiology*; 59: 171-191.
- Nimigean C, Allen T. (2011). Origin of ion selectivity in potassium channels from the perspective of channel block. *The Journal of General Physiology*; 137(5):405-413.
- Nishida M, MacKinnon R. 2002. Structural basis of inward rectification: Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8Å resolution. *Cell*; 111(7): 957-965.

- Nwaobi S, Cuddapah V, Patterson K, Randolph A, Olsen M. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathologica*; 132(1):1-21.
- Olsen M, Higashimori H., Campbell S.L., Hablitz J.J. Sontheimer H. (2006). Functional Expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia*; 53 (5): 516-528
- Olsen M, Sontheimer H. (2008). Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: for K⁺ buffering to cell differentiation. *Journal of Neurochemistry*;107(3): 589-601.
- Parpura V, Verkhratsky A. (2012). Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signaling: evolution of the concept. *American Society for Neurochemistry Neuro*; 4(4): 201-205.
- Parpura V, Heneka M, Montana V, Oliet S, Schousboe, Haydon P, Stout Jr R, Spray D, Reichenbach, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A. (2012). Glia cells in (patho) physiology. *Journal of Neurochemistry*; 121(1): 4-27.
- Pattnaik B, Asuma M, Spott R, Pillers D. (2012). Genetic defects in the hotspot of inwardly rectifying K⁺ (Kir) channels and their metabolic consequences: A review. *Molecular Genetics and Metabolism*; 105 (1): 64-72.
- Paynter J, Shang L, Bollepalli M, Baukowitz, Tucker S. (2010). Random mutagenesis screening indicates the absence of a separate H⁺-sensor in the pH-sensitive Kir channels. *Channels*; 4 (5): 390-397.
- Peleg S, Varon D, Ivanina T, Dessauer C, Dascal N. (2002). G α_i controls the gating of the G protein-activated K⁺ channel, GIRK. *Cell Press*; 33 (1): 87-99.
- Pérez-Samartin A, Garay E, Moctezuma J.P, Cisneros-Mejorado A, Sánchez-Gómez M. V, Martel-Gallegos G, Robles-Martínez L, Canedo-Antelo M, Matute C & Arellano. 2017. Inwardly rectifying K⁺ currents in cultured oligodendrocytes from rat optic nerve are insensitive to pH. *Neurochemical Research*.
- Pessia M, Imbrici P, D'Adamo M, Salvatore L, Tucker S. (2001). Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. *The Journal of Physiology*; 532 (2): 359-367.

Qu Z, Yang Z, Cui N, Zhu G, Liu C, Xu H, Chanchevalap S, Shen W, Wu J, Li Y, Jiang C. (2000). Gating of inward rectifier K⁺ channels by proton-mediated interactions of N- and C- terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*; 275(41): 31573-31580.

Raff M, Miller R, Noble M. (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*; 303(2): 390–396.

Rapedius M, Fowler W, Shang L, Sansom M, Tucker S, Baukrowitz T. (2007). H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels. *Neuron*; 55 (4): 602-612.

Reichold M, Zdebik AA, Lieberer E, Rapedius M, Schmidt K, Bandulik S, Sterner C, Tegtmeier I, Penton D, Baukrowitz T, Hulton SA, Witzgall R. (2010). KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*; 107 (32): 14490-14495.

Schreibmayer W, Dessauert C, Vorobiov D, Gilman A, Lester H, Davidson N, Dascal N. (1993). Inhibition of an inward rectifying K⁺ channel by G-protein α -subunits. *Nature*; 380: 624-627.

Schulze D, Krauter T, Fritzenschaft H, Soom M, Baukrowitz T. (2003) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. *The Journal of Biological Chemistry*; 278 (12): 10500-10505.

Seidl AH. 2013. Regulation of conduction time along axons. *Neuroscience*; 47: 2-5.

Seifert G, Henneber C, Steinhäuser C. (2016). Diversity of astrocyte potassium channels: An update. *Brain Research Bulletin*.

Sontheimer H, Trotter J, Schachner M, Kettenman H. (1989). Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron*; 2(2): 1135-1145.

Somjen G.(1988). *Nervenkitt: Notes on the history of the concept of neuroglia*. *Glia*; 1(1): 2-9.

- Su J, Yang L, Zhang X, Rojas A, Shi Y, Jiang C. (2007). High CO₂ chemosensitivity versus wide sensing spectrum: a paradoxical problem and its solutions in cultured brainstem neurons. *The Journal of Physiology*; 578(3):831-841.
- Suh B, Hille B. (2008). PIP₂ is a necessary cofactor for ion channel function: How and why? *Annual Reviews of Biophysics*; 37: 175-195.
- Susuki K. (2013). Node of Ranvier disruption as a cause of neurological diseases. *American Society for Neurochemistry*; 5(3): 209-219.
- Tsai T, Shuck E, Thompson D, Bienkowski M, Lee S. (1995). Intracellular H⁺ inhibits a cloned rat kidney outer medulla K⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *American Journal of Physiology Cell Physiology*; 268(5): c1173-c1178.
- Tsantoulas C, McMahon S. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends in Neurosciences*; 37(3): 146-158.
- Verkhatsky A. (2010). Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochemistry International*. 57(4): 332-343.
- Wang J, Huang Y, Ning Q. (2011). Review on regulation of inwardly rectifying potassium channels. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*; 21(4): 3030-311.
- Waskielewicz A, Gunia A, Szkaradek N, Slocznska K, Krupinska S, Marona H. (2013). Ion channels as drug targets in central nervous system disorders. *Current Medical Chemistry*; 20(10): 1241-1285.
- Xu H, Ningren C, Yang Z, Qu Z, Jiang C. (2000). Modulation of Kir4.1 and Kir5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis. *Journal of Physiology*; 524 (3):725-235.
- Yang Z, Xu H, Cui N, Qu Z, Chanchevalap S, Shen W, Jiang C. (2000). Biophysical and molecular mechanisms underlying the modulation of heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by CO₂ and pH. *Journal of General Physiology*; 116(1): 33–45.
- Zalc B, Goujet D, Colman D. (2008). The origin of the myelination program in vertebrates. *Current Biology*; 18(12): 286-294.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DEL AXÓN MIELINIZADO.	9
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE CANALES DE K^+ (K_{csA}) DE STREPTOMYCES LIVIDANS.	12
FIGURA 3. COMPONENTES ESTRUCTURALES DEL CANAL K_{IR} .	15
FIGURA 4. ANÁLISIS POR RT-PCR.	17
FIGURA 5. RELACIÓN I/V DE LAS CORRIENTES K_{IR} EN OLS E INSENSIBILIDAD DE LA CORRIENTE EN pH 6.3.	17
FIGURA 6. CORRIENTES K_{IR} EN ASTROCITO MONITOREADAS EN DIFERENTES VALORES DE pH_i .	19
FIGURA 7. CORRIENTE CON CARACTERÍSTICAS K_{IR} IDENTIFICADA EN OLS DE NERVIO ÓPTICO MANTENIDOS EN CULTIVO.	32
FIGURA 8. BLOQUEO POR Ba^{2+} CARACTERÍSTICO DE K_{IR} .	33
FIGURA 9. INSENSIBILIDAD A H^+ DE LA CORRIENTE K_{IR} EN OLS.	35
FIGURA 10. INSENSIBILIDAD DE LA CORRIENTE K_{IR} A I/V.	36
FIGURA 11. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA EL INDICADOR DE pH_i "pH RODO GREEN".	38
FIGURA 12. MEDICIÓN DE pH_i POR FLUOROMETRÍA.	39
FIGURA 13. APLICACIONES DE ACETATO DURANTE K_{IR} EN OLS REGISTRADOS CON LA TÉCNICA DE "PARCHE PERFORADO".	40
FIGURA 14. LA CORRIENTE K_{IR} EN OLS FUE INSENSIBLE A LA ACIDIFICACIÓN PROVOCADA POR APLICACIONES PROLONGADAS DE ACETATO.	40
FIGURA 15. SECUENCIAS DE K_{IR} CLONADAS DE OLS.	42
FIGURA 16. CORRIENTE PROVOCADA POR LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD K_{IR} 4.1 EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS</i> Y SU SENSIBILIDAD A Ba^{2+} .	44
FIGURA 17. CURSO TEMPORAL DEL CAMBIO EN pH_i PROVOCADO POR ACETATO EN OVOCITOS DE <i>XENOPUS</i> MONITOREADO CON EL MÉTODO "RATIOOCYTE".	45
FIGURA 18. CORRIENTE K_{IR} MONITOREADA EN OVOCITOS Y SU SENSIBILIDAD A H^+ .	46
FIGURA 19. CORRIENTES K_{IR} PROVOCADAS EN OVOCITOS INYECTADOS CON LAS DIFERENTES SUBUNIDADES DEL CANAL Y SU SENSIBILIDAD A H^+ .	47
FIGURA 20. RELACIÓN I/V PARA LAS CORRIENTES K_{IR} EXPRESADAS EN LOS OVOCITOS DE <i>XENOPUS</i> Y SU SENSIBILIDAD A H^+ .	49
FIGURA 21. ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES TRANSMEMBRANALES DE K_{IR} 2.1 / 5.1 Y K_{IR} 2.1 / 4.1 / 5.1.	50
FIGURA 22. K_{IR} 4.1 / 2.1 EN DISTINTAS PROPORCIONES.	51

APÉNDICE

Artículo Publicado:

Pérez-Samartin A, Garay E, Moctezuma J.P, Cisneros-Mejorado A, Sánchez-Gómez M. V, Martel-Gallegos G, Robles-Martínez L, Canedo-Antelo M, Matute C & Arellano. 2017. Inwardly Rectifying K⁺ Currents in Cultured Oligodendrocytes from Rat Optic Nerve are Insensitive to pH. *Neurochemical Research*. doi: 10.1007/s11064-017-2242-8

Inwardly Rectifying K⁺ Currents in Cultured Oligodendrocytes from Rat Optic Nerve are Insensitive to pH

Alberto Pérez-Samartín¹ · Edith Garay² · Juan Pablo H. Moctezuma² · Abraham Cisneros-Mejorado² · María Victoria Sánchez-Gómez¹ · Guadalupe Martel-Gallegos² · Leticia Robles-Martínez² · Manuel Canedo-Antelo¹ · Carlos Matute¹ · Rogelio O. Arellano² 

Received: 29 December 2016 / Revised: 14 March 2017 / Accepted: 17 March 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Inwardly rectifying K⁺ (Kir) channel expression signals at an advanced stage of maturation during oligodendroglial differentiation. Knocking down their expression halts the generation of myelin and produces severe abnormalities in the central nervous system. Kir4.1 is the main subunit involved in the tetrameric structure of Kir channels in glial cells; however, the precise composition of Kir channels expressed in oligodendrocytes (OLs) remains partially unknown, as participation of other subunits has been proposed. Kir channels are sensitive to H⁺; thus, intracellular acidification produces Kir current inhibition. Since Kir subunits have differential sensitivity to H⁺, we studied the effect of intracellular acidification on Kir currents expressed in cultured OLs derived from optic nerves of 12-day-old rats. Unexpectedly, Kir currents in OLs (2–4 DIV) did not change within the pH range of 8.0–5.0, as observed when using standard whole-cell voltage-clamp recording or when preserving cytoplasmic components with the perforated patch-clamp technique. In contrast, low pH inhibited astrocyte Kir currents, which

was consistent with the involvement of the Kir4.1 subunit. The H⁺-insensitivity expressed in OL Kir channels was not intrinsic because Kir cloning showed no difference in the sequence reported for the Kir4.1, Kir2.1, or Kir5.1 subunits. Moreover, when Kir channels were heterologously expressed in *Xenopus* oocytes they behaved as expected in their general properties and sensitivity to H⁺. It is therefore concluded that Kir channel H⁺-sensitivity in OLs is modulated through an extrinsic mechanism, probably by association with a modulatory component or by posttranslational modifications.

Keywords Inwardly rectifying K⁺ channel · Oligodendrocyte · pH sensitivity · Kir4.1

Introduction

Oligodendrocytes (OLs), the myelinating cells of the central nervous system, express a wide variety of ion channels and membrane receptors throughout their maturation from precursor cells (OPCs) to myelinating OLs. Among these molecules, they present a broad diversity of K⁺ channels [1–4], which show a differential expression at different stages of development. Thus, expression of voltage-dependent K⁺ channels in OPCs is robust [5, 6] and appears to correlate with their role in proliferation control; after the mitotic stage ends, expression of these channels is downregulated. On the other hand, a significant increase in the expression of inwardly rectifying channels (Kir) and a negative shift in resting potential are associated with OL maturation, myelination, and their functions in the mature stage [5, 7, 8]. Although the overall role of Kir channels in controlling the resting membrane potential and buffering spatial potassium [7, 9–11] is well known, their specific

Alberto Pérez-Samartín and Edith Garay have contributed equally to this work.

✉ Carlos Matute
carlos.matute@ehu.eus

✉ Rogelio O. Arellano
arellano.ostoa@comunidad.unam.mx

¹ Achucarro Basque Center for Neuroscience, Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas, Departamento de Neurociencias, Universidad del País Vasco, 48940 Leioa, Vizcaya, Spain

² Laboratorio de Neurofisiología Celular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla 76230, Querétaro, Mexico

role in OL physiology remains obscure. Moreover, the molecular entity or entities that make up the Kir channels in OLs remains unknown, as well as their possible diversity in different nervous system regions [12, 13], as shown in other glial cells [14], and even in distinct oligodendroglial populations [15].

Kir channels are tetrameric and display homomeric or heteromeric conformations of 15 gene products which are classified into families named Kir1 to Kir7 [16]. The different subunits give the channels distinctive functional characteristics and modulatory capabilities through a variety of messengers and cell regulators such as ATP, H⁺, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), among many others [16, 17]. However, it is well known that the Kir4.1 subunit, a member of the transport-type channels of the Kir superfamily, is abundantly expressed in glial cells, mainly OLs and astrocytes [18–20], although it is not exclusive to these cells. It has also been shown that Kir4.1 in KO mice presents a significant decrease in the degree of myelination, mainly due to lack of OL maturation [8]. Also, it is important to mention that patients with multiple sclerosis, a demyelinating disease, express antibodies against Kir4.1, which suggests a possible role of this channel in the development of this disorder [21, 22].

It has recently been shown that Kir5.1 channels are present in optic nerve OLs from mouse [19]. Given that Kir5.1 subunits alone do not express functional channels [23], their presence suggests a possible heteromeric composition of glial Kir channels (e.g., Kir4.1/Kir5.1 channels) in addition to Kir4.1 homomers. Kir4.1 channels are sensitive to intracellular pH [24] within the physiological range, as reported for subunits Kir1 [25] and Kir7 [26]. In these cases, an increase in intracellular H⁺ concentration generates a current decrease through Kir channels. Moreover, heteromers Kir4.1/Kir5.1 have a higher sensitivity to H⁺, thus the homomeric channel is inhibited with a pK_a of approximately 6.0 and the heteromeric channel is inhibited with a pK_a close to 7.4 [24, 27, 28]. Identification of Kir channel composition in OLs would provide information that might allow their genetic control in order to affect their expression and evaluate their functions. Taking advantage of this differential sensitivity to H⁺, when Kir4.1 and Kir5.1 subunits are expressed, in this study we analyzed the effect of acidification on Kir currents in cultured OLs from the optic nerve. Unexpectedly, we found that myelinating OLs showed insensitivity to H⁺ in a wide physiological concentration range. Therefore, we cloned the subunits of interest expressed in the OLs and analyzed their characteristics by heterologously expressing them in *Xenopus* oocytes. This analysis confirmed that cloned Kir subunits behave similarly to those reported previously in other cells. The results suggest that Kir subunits in OLs from the optic nerve undergo

posttranslational modifications, or are closely associated with an auxiliary molecule, that makes them insensitive to H⁺.

Materials and Methods

Cell Culture, Oligodendrocytes and Astrocytes

Primary cultures of OLs were derived from optic nerves of 12-day-old Sprague–Dawley rats, as previously described [29]. Briefly, optic nerves were devoid of meninges and chiasma to be minced and incubated at 37 °C for 40 min in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA) containing collagenase (1.25 mg/ml), DNAase (0.004%), and trypsin (0.25%) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Then, DMEM with 10% BSA was added to stop enzymatic reaction and the tissue was triturated sequentially with 23G, 25G and 27G needles, then filtered (using a 41 µm pore filter) to yield a single-cell suspension. Cells were seeded on 24-well plates bearing 12-mm round coverslips coated with poly-D-lysine (10 µg/ml) at a density of 10⁴ cells per well. Cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in a chemically defined medium (Sato medium; [29]) consisting of DMEM supplemented (per ml) with 100 µg transferrin, 60 ng progesterone, 40 ng sodium selenite, 5 µg insulin, 16 µg putrescine, 100 µg bovine serum albumin, 30 ng triiodothyronine, and 40 ng thyroxine.

Primary astrocyte cultures were established from the cerebral cortex of newborn Sprague–Dawley rats, as previously described [30]. Cultures were grown in Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FBS, 50 U/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin. Briefly, meningeal tissue was removed, and the neocortex was minced and incubated at 37 °C for 15 min in Ca²⁺-free Hank's solution containing trypsin (0.5%) and 1 mg/ml DNase. The trypsin reaction was stopped; tissue was immersed in DMEM medium supplemented with 10% FBS (Gibco, Grand Island, NY, USA) and triturated using consecutive passes with a pipette tip (100 µl) and then with two different sized needles (21G and 23G). The dissociated cells were centrifuged and the pellet was resuspended in IMDM medium supplemented with 10% FBS. It was then seeded onto poly-L-lysine-coated plates or glass coverslips at 1.5 × 10⁵ cells per well. The medium was replaced 24 h later by IMDM medium and 10% FBS (Hyclone, Grand Island, NY, USA). Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂/95% air atmosphere at nearly 100% relative humidity.

Electrophysiology

Whole-Cell Patch-Clamp

For recording of membrane current properties, cells (OLs or astrocytes) plated in coverslips were transferred to a recording chamber attached to a conventional inverted microscope (Olympus IX71, Tokio, Japan). They were continuously superfused and maintained at 25 °C. The standard external solution was similar to the one described by Attali [6]; it was adjusted to pH 7.3 and it contained (in mM) 140 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, and 10 HEPES. High potassium solution was prepared by rising the K⁺ concentration from 5.4 to either 10.4 (K10 solution) or 25.4 mM (K25 solution) and equimolarly reducing Na⁺. Rapid drug application was achieved by an RSC-200 Rapid Solution Exchanger (BioLogic, Seyssinet-Pariset, France) controlled by a computer. Electrophysiology experiments were performed with a Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using either the standard whole-cell configuration or the gramicidin-perforated whole-cell method. Recordings were digitized with a Digidata 1440 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and visualized and analyzed with pClamp software (v.10; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Regular pipettes for standard whole-cell configuration were filled with an internal solution containing (in mM): 140 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA, 2 Na-ATP, and 0.2 GTP, adjusted to pH 7.3 with KOH. To study the sensitivity of currents to acidification or alkalization, fresh solutions with different intracellular pH were prepared (pH 5, 5.5, 6.3, 7.3, and 8) and used in standard whole-cell configuration. Perforated whole-cell recording was performed using 5 µg/ml gramicidin (Sigma, St. Louis, MO, USA) added to the internal solution (without EGTA, Na-ATP, and GTP) from a fresh gramicidin stock solution prepared in dimethylsulfoxide [31]. The external solutions containing sodium acetate were prepared by replacing 50 mM NaCl from either the normal external solution or the K25 solution with Na⁺-acetate (K5-Ac⁻ solution or K25-Ac⁻ solution, respectively). These solutions were then used in cells under “perforated” whole-cell patch-clamp configuration.

Two-Electrode Voltage-Clamp

Follicles of *Xenopus laevis* were dissected from ovarian lobules taken from anesthetized frogs, and they were maintained in normal Barth's solution (containing in mM: 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, and 5 HEPES; pH 7.4; supplemented with 70 µg/ml gentamicin). Isolated follicles were injected with 50 nl of solution containing any of the cloned cRNA sequences (5 ng per follicle) (see below),

with a pair of them in 1:1 proportion, or with H₂O as a control, and then the cells were incubated (18 °C) in normal Barth's solution. After 36 h, oocytes were defolliculated with 0.5 mg/ml collagenase type 1 A (Sigma, St. Louis, MO, USA) in normal Ringer's solution (NR, containing in mM: 115 NaCl, 5 KCl, 1.8 CaCl₂, and 5 HEPES; pH 7.0) for 30 min. Membrane currents were recorded using a conventional two-electrode voltage-clamp over 3- to 4-day periods after injection [32]. Recordings were made in oocytes held at -80 mV and superfused at 10 ml/min with NR or the K25 solution (containing 25 mM KCl), which was prepared by replacing NaCl in the NR solution; 100 µM Ba²⁺ was added to this solution to monitor the Ba²⁺-sensitive current. Acetate-containing solutions were prepared replacing equimolarly 50 mM NaCl by Na-acetate in NR (named K5-Ac⁻), or in K25 solution (K25-Ac⁻ solution), that were adjusted to different pHs of 7.3, 7.0, 6.3, or 5.5 with HCl. Current-voltage (I/V) relationships were obtained by applying 3-s pulses in 20 mV steps, from -170 to +50 mV, in oocytes held at -50 mV, during the application of either K5, K25 or K25-Ac⁻ solution.

Intracellular pH Measurement in OLs

Intracellular pH change in OLs was determined by using the pHrodo Green indicator according to the manufacturer's instructions (P35373; Molecular Probes, Life Technologies Carlsbad, CA, USA). OLs on cover slides were loaded with 10 µM pHrodo Green in external solution for 10 min at room temperature, and then washed for 3 min at room temperature. Experiments were performed in a coverslip chamber continuously perfused with external solution at constant flow (1 ml/min). The perfusion chamber was mounted on the stage of an Olympus IX71 inverted epifluorescence microscope equipped with a halogen lamp and a 40X objective (Olympus, Tokio, Japan). Cells were visualized, and images were obtained every 500 ms during 150 s with a camera (Evolution QEi; Media Cybernetics Inc. Silver Spring, MD, USA) and Image-Pro Plus Software (Media Cybernetics Inc, Rockville, MD, USA). Then the images were analyzed using ImageJ v1.49 (NIH, USA). To estimate changes in cytosolic pH, a calibration curve at pH 4, 5, 6, 7, and 8 were performed in normal external solution supplemented with 10 µM valinomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 10 µM nigericin ionophores (Sigma, St. Louis, MO, USA) to equilibrate intracellular and bath pH. Acetate-containing external solutions, with normal and high K⁺, were the same as those used for electrophysiological patch-clamp recording.

Western Blotting

For immunodetection, total protein from OLs or astrocytes was obtained at DIV2–4. Cells were washed with cold PBS and then collected by mechanical scraping with 50 μ l of RIPA buffer, supplemented with HaltTM protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Spain). Lysates were boiled in sample buffer for 5 min, separated by electrophoresis using Criterion TGX Precast 12% gels, and transferred to Trans-Blot Turbo Midi PVDF Transfer Packs (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked with 5% skimmed milk and 5% serum in TBST for 1 h. After electroblotting onto PVDF membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), these were blocked in 5% skimmed milk, 5% serum in TBST for 1 h. The blots were probed with primary antibodies in 5% BSA in TBST. The rabbit anti-Kir 2.1 and anti-Kir 4.1 (1:1000; Alomone, Jerusalem, Israel), rabbit anti-Kir 5.1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and mouse anti-GAPDH (1:5000; Sigma, St. Louis, MO, USA) were used overnight at 4°C. The blots were washed and then developed by using HRP-conjugated anti-IgG (1:5000) and an enhanced chemiluminescence detection kit according to the manufacturer's instructions (Supersignal; Thermo Fisher Scientific, Spain). Images were acquired with a ChemiDoc MP system (BioRad, Hercules, CA, USA).

RT-PCR and Cloning of Kir Subunits from OLs

To verify the expression of Kir channels, cDNA was prepared from isolated OLs and used in PCR assays. PCR products were amplified with the primers Kir2.1, forward, 5'-CTCTCCTGGCTGTTCTTTGG-3', and reverse, 5'-ATC GGGCACTCGTCTGTAAC-3'; Kir4.1, forward, 5'-CAA AGAAGAGGGCTGAGACG-3', and reverse, 5'-TTGAGC CGAATATCCTCACC-3'; Kir5.1, forward, 5'-CGCTTC AGCTATTTTCGCA-3', and reverse, 5'-GGATGTCCAGT AGAGTCA-3'. GAPDH amplification was used as a control with the oligonucleotide GAPDH, forward, 5'-TCC CTCAAGATTGTCAGCAA-3', and reverse, 5'-AGATCC ACAACGGATACATT-3'. The amplification conditions were: an initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 55–60°C for 30 s, 72°C for 30 s, and finally 72°C for 5 min.

The cDNA encoding Kir2.1, Kir4.1, and Kir5.1 were also obtained from OLs by PCR using the following primers: Kir2.1, forward, 5'-ATGGGCAGTGTGCGTACA A-3' and reverse, 5'-TCATATCTCCGATTCTCGCCT-3'; Kir4.1, forward, 5'-ATGACATCAGTTGCCAAGGT-3' and reverse, 5'-TCAGACGTTACGCAC-3'; Kir5.1, forward, 5'-ATGAGCTATTACGGAAGTAGC-3' and reverse, 5'-CTACATCTGGGATTCCATGG-3'. The PCR conditions were: an initial denaturation at 95°C for 3 min

followed by 35 cycles at 95°C for 30 s, 55–60°C for 30 s, 72°C for 1:10 min, and finally 72°C for 5 min. The amplified sequences were cloned into pXENEX vectors [33] at NcoI or SpeI and NotI sites. The corresponding cRNA was synthesized in vitro using T7 polymerase with the mMMESSAGE mMACHINE kit (Ambion, Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Oocytes were injected with 5 ng of the different RNAs and incubated for 48–72 h.

Immunocytochemistry

Oligodendrocytes derived from optic nerves were seeded onto coverslips and maintained 3DIV at 37°C and 5% CO₂ in a SATO medium. Then, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, permeabilized in 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS), and processed for immunofluorescence with specific antibodies anti-Kir 2.1, anti-Kir 4.1 (1:100; Alomone, Jerusalem, Israel), or anti-Kir 5.1 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). MBP or MAG proteins were detected using specific antibodies anti-MBP (1:100; Covance Inc., Princeton, NJ, USA), or anti-MAG (1:200; Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Primary antibodies were detected after incubation with anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor-488 secondary antibody (1:200; Invitrogen, Grand Island, NY, USA) for 2 h at room temperature. Cells were washed three times in PBS, mounted on slides with Glycergel (Dako, Glostrup, Denmark), and visualized with a laser scanning confocal microscope (Olympus Fluoview FV500) in the Analytic and High Resolution Microscopy Facility at the University of the Basque Country. No staining was detected in control samples run in parallel without primary antibodies.

Data Analysis

Results were expressed as mean \pm SEM with the number of experiments indicated in each figure. Statistical analysis was performed using Origin 7.0 (Northampton, MA, USA) software. Comparisons between the means of two groups were carried out using a Student's *t*-test or, when appropriate, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test. Differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

Results

Inwardly Rectifying Currents in OLs from the Optic Nerve

Electrophysiological recordings were made in cultured OLs (1–3DIV) using the patch-clamp technique in whole-cell

standard configuration. 1DIV OLs ($n=39$) had a resting membrane potential of -56 ± 6 mV that became more negative with time in culture reaching -72 ± 7 mV in 3DIV ($n=57$). OLs monitored in normal external solution regularly expressed inward currents that increased when cells were superfused in solution with higher K^+ concentration (Fig. 1a). High K^+ external solution mainly increased inward currents that were greatly sensitive to external Ba^{2+} . The I/V relationship of this response had typical characteristics of inwardly rectifying currents (Fig. 1a). For example, inward currents in solutions containing either 10.4 or 25.4 mM K^+ (herein referred to as K10 or K25 solution) presented partial inactivation at potentials more negative to around -150 mV (Fig. 1a). This inactivation was dependent upon the presence of Na^+ in the external solution (not shown), an effect demonstrated in other cell types [34]. Cells monitored at -80 mV with standard internal (pH 7.3) solution and external solution (K10 or K25) developed inward currents that remained stable for several seconds (Fig. 1b) and were generated repeatedly without decay for up to 30 min. A dose response for the effect of Ba^{2+} on K25-generated inward currents indicated an IC_{50} of 11.4 ± 1 μ M (Fig. 1c, d), in accordance with the idea that currents were mainly due to inwardly rectifying K^+

channels (Kir currents). Currents in following experiments were generated by using regular K25 external solution and confirmed to be mainly Kir type by applying 100 μ M Ba^{2+} that blocked more than 95%. As it has been shown [6, 31], inward current responses to K25 increased in density with time in culture. These responses were inhibited by 100 μ M Ba^{2+} (Fig. 1d) during DIV1 to DIV3 in the same proportion, indicating that the increase was mainly due to an enhancement of Kir channel expression in the membrane. More than 94% of OLs tested during DIV2-4 were positive for MBP and MAG expression (not shown).

OLs Express Kir Currents Insensitive to Acidification Under Standard Whole-Cell Recording

OLs were monitored using internal solutions adjusted to different pH values within the 8–5 range (8.0, 7.3, 6.3, 5.5, or 5.0). OLs 2–4 DIV were recorded at -80 mV and tested with K25 external solution. Inward current amplitudes were monitored and their blockage was confirmed by 100 μ M Ba^{2+} (Fig. 2a, first row). I/V relationships (cells held at -50 mV with steps from -170 to $+50$ mV) were also built in most cells (Fig. 2a, bottom row). Several cells were then monitored using solutions adjusted to different pHs, and

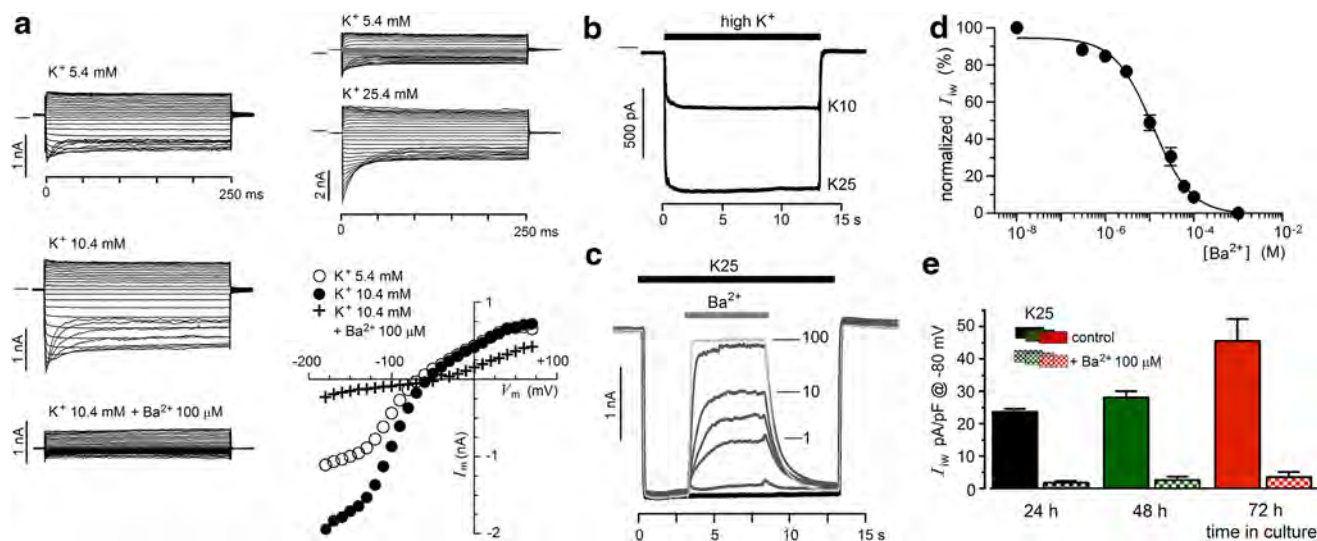


Fig. 1 Inwardly rectifying currents in OLs from the optic nerve. **a** Superimposed traces illustrate membrane current in OLs maintained in culture and held at -50 mV under standard whole-cell voltage-clamp. Voltage steps from -180 to $+60$ mV (in 10 mV steps) were applied under three different conditions (first column) in normal extracellular K^+ concentration (5.4 mM, K5), in a solution containing 10.4 mM K^+ (K10), which mainly increased inward currents, and a solution with 100 μ M Ba^{2+} added later, which abolished inward currents. A further increase in K^+ concentration to 25.4 mM (K25, second column) produced a robust enhancement of inwardly rectifying currents. I/V relationship illustrates that K^+ concentration increased and Ba^{2+} affected mainly inward going currents. **b** OLs held at -80 mV were treated with either K10 or K25 (time indicated

by the *top bar*); both concentrations elicited inward currents (Kir) that remained still as long as the superfusion lasted in high K^+ solution. **c** Superimposed Kir currents generated by K25 and inhibition by Ba^{2+} applied at different concentrations (0.3, 1, 3, 10, 60 or 100 μ M). **d** Dose-response relationship for Ba^{2+} blocking effect on Kir generated by K25 superfusion. Inward current responses were monitored at -80 mV. Currents were normalized with respect to the peak amplitude in the absence of Ba^{2+} ($n=10$), curve is the best fit to data points and gave an $IC_{50}=11.4 \pm 1.1$ μ M. **e** Kir current amplitude (in K25) at -80 mV increased with time in culture (24, 48, and 72 h); peak current was expressed with respect to membrane capacitance, for each cell recorded, in the absence or the presence of 100 μ M Ba^{2+} ($n=10$ OLs in each case)

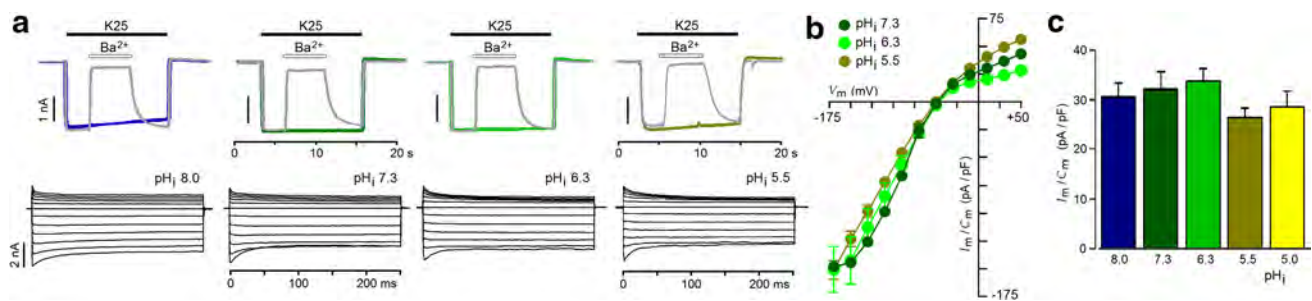


Fig. 2 Insensitivity of Kir currents to acidification in OLS. **a** Upper traces illustrate inward current responses elicited by K25 in OLS under standard whole-cell (held at -80 mV) using different internal solutions adjusted to pH values of 8.0, 7.3, 6.3, or 5.5. Kir currents were blocked in all cases by $100 \mu\text{M}$ Ba^{2+} added to K25 (gray trace in each case). Bottom traces show membrane current in each pH_i tested

from -170 to $+50$ mV (in -20 mV steps) and cells held at -50 mV. **b** I/V relationship for normalized Kir current recorded in different pH_i, obtained from the peak current monitored using the step protocol in (a) and the respective C_m ($n=7$ OLS in each case). **c** Kir current density at -80 mV of OLS monitored in pH_i of 8.0, 7.3, 6.3, 5.5, and 5.0 ($n=6-10$ in each pH)

their characteristics were compared. Kir amplitude current density was independent of intracellular pH, as it remained the same even in recordings that lasted for several minutes (15–25 min). As shown in Fig. 2a–c, cells recorded with internal solutions that were adjusted to low pH did not produce changes in Kir current density. Moreover, I/V relationships were not significantly affected by changes in pH_i (Fig. 2b). Nevertheless, OLS ($n=6$) recorded in pH 5.0 or less became unstable and lost membrane resistance in a few minutes (3–5 min).

Kir Currents in OLS are pH Insensitive Under Perforated Patch-Clamp Configuration

H⁺ insensitivity of Kir currents in OLS is unexpected due to the evidence that glial cells, mainly OLS and astrocytes, robustly express the Kir4.1 subunit, which is inhibited by intracellular H⁺. Therefore, we tested whether H⁺ insensitivity was produced as an artifact effect due to cytoplasmic dialysis. To do this we acidified the intracellular medium by externally applying sodium acetate [25, 26], which permeates the membrane and produces a decrease in pH_i. Additionally, we monitored Kir currents using the gramicidin-perforated patch-clamp configuration to record whole-cell membrane currents maintaining cytoplasmic components. Before this, we tested the degree of acidification produced by the acetate solution applied to OLS by quantifying the change in intracellular H⁺ concentration with the pHrodo Green fluorescent indicator and with fluorometric microscopy. As shown in Fig. 3a, b, application of the acetate-containing external solution with either normal or high K⁺ (K25-Ac⁻) produced a strong cytoplasmic acidification that lasted for several seconds (10–15 s) in 97% of the cells. It was estimated from calibration curves that basal pH_i (within 8.0

to 4.0 pH range, Fig. 3a) in OLS was of 7.38 ± 0.08 (in agreement with previous measurements; e.g., [35]), while the peak acidification in the normal K⁺ acetate or K25 solution was of 5.94 ± 0.1 ($n=215$ cells). Assuming that cells under patch-clamp configuration suffered a similar acidification, given that pH buffer did not diffuse to the cytoplasm in the “perforated” patch (e.g., [36]), OLS were superfused with acetate-containing solution, and Kir current was measured after applying the K25 solution. As shown in Fig. 3c, inward current generated by K25 was slightly reduced by the K25-Ac⁻ solution, which generated an outward current. However, similar outward current by acetate was also generated in the K5 solution (Fig. 3d). This indicated that small outward currents caused by acetate-containing solutions were not dependent upon external K⁺ concentration or Kir current amplitude. Also, similar to the blockage shown in standard whole-cell recording, in “perforated” patch-clamp most of the current recorded in K25 solution was blocked by $100 \mu\text{M}$ Ba^{2+} (Fig. 3e), indicating typical Kir currents. Although pH_i decrease occurred during the first few seconds of acetate superfusion, we tested whether superfusion of acetate for 10 or 15 s affected the Kir component. Figure 3f illustrates where the OL was first superfused with K5-Ac⁻ solution for 5 s and then superfused with K25-Ac⁻ solution. In any case tested under similar conditions (12 OLS) the generated Kir current was different compared with control recordings. Figure 3g summarizes the results obtained from 16 OLS recorded in different external solutions containing acetate and compared with external K25 solution. No difference was found between the peak inward currents generated in the K25 solutions (with and without acetate). Moreover, outward currents generated by acetate were not dependent on K⁺ concentration.

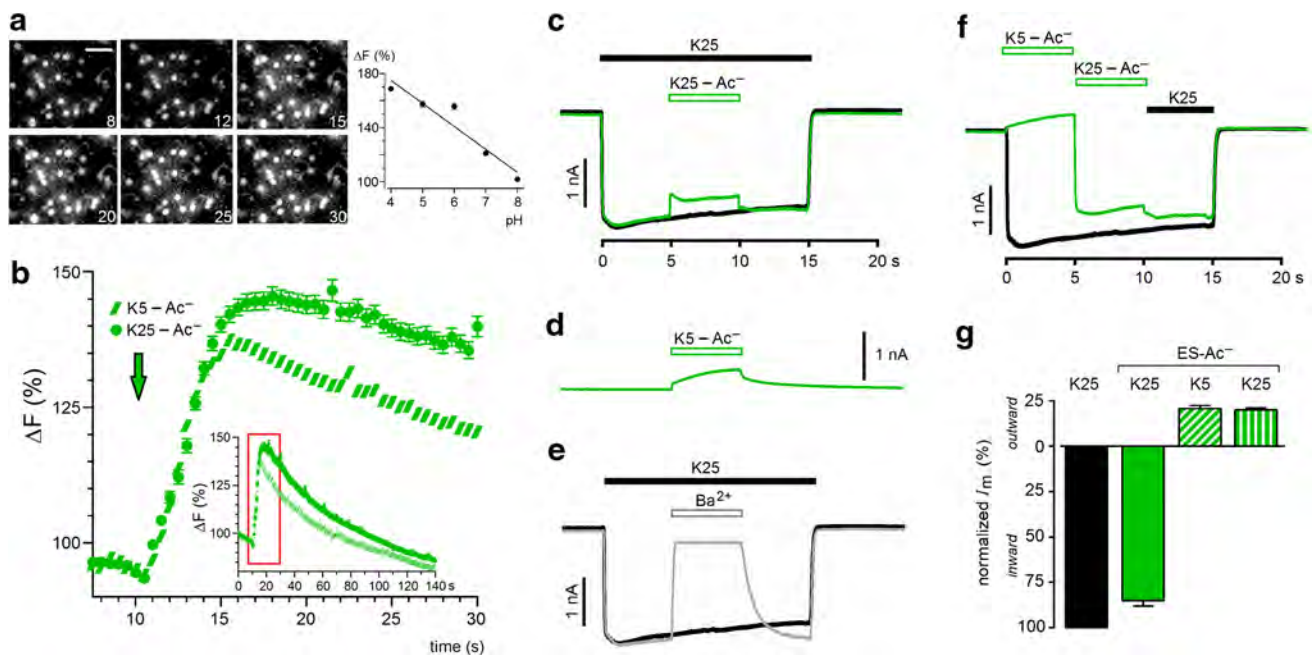


Fig. 3 Cytoplasmic acidification by extracellular sodium acetate and Kir currents monitored using perforated patch-clamp configuration. **a** Images illustrate fluorometric microscopy in pHrodo Green-loaded OLS to quantify $[H^+]_i$ before (8 s) or after addition of 50 mM sodium acetate (Ac^-) at different times, as indicated (bar 50 μm). Graph illustrates typical calibration curve of fluorescence change as a percentage from basal level monitored in solutions adjusted to different pHs. **b** Time-course of fluorescence change as a percentage from basal level, in pHrodo Green-loaded OLS, during superfusion of Ac^- -containing solution in normal (K5- Ac^-) or high (K25- Ac^-) K^+ concentration. Inset shows complete 140-s recording. Data in red box for the first 20 s in Ac^- containing solution was detailed in the main graph. **c** Traces illustrate membrane current monitored using per-

forated whole-cell patch-clamp. Inward current generated by K25 in the absence (*black*) or presence of Ac^- (*green*, K25- Ac^-). Note the small outward current during K25- Ac^- application. **d** Similar outward current was elicited by K5- Ac^- . **e** Similar to Kir current monitored with the standard configuration, inward currents by K25 (*black* trace) using perforated patch-clamp were potentially blocked by 100 μM Ba^{2+} (*gray*). **f** Previous K5- Ac^- application followed by K25- Ac^- (*green* trace) did not have a significant effect on Kir current amplitude as compared with control K25 superfusion (*black* trace). **g** Normalized current amplitude with respect to peak current in K25, in cells treated with Ac^- in normal or high K^+ , for either inward or outward currents elicited in Ac^- -containing external solution (ES- Ac^-) ($n=7-15$ in each case). (Color figure online)

Astrocytes Display H^+ -Sensitive Kir Currents

As a positive control, we measured the Kir currents generated in astrocytes, a glial cell type that expresses the Kir4.1 subunit that is sensitive to pHi [18, 37]. Astrocyte experiments were conducted under the same conditions as OL experiments (Fig. 2). As illustrated in Fig. 4a, we first monitored the increase in Kir current by K25 superfusion recording astrocytes in whole-cell standard configuration, and we confirmed the Ba^{2+} blocking effect. Then we monitored the K25-generated inward currents using the internal solutions adjusted to different pHs as shown in Fig. 4b. In this condition, acidification of internal solution showed a decrease in Kir current density, confirming a clear dependence of astroglial Kir current on pHi (Fig. 4c). Internal solutions with different pHs used in these experiments were tested in parallel on OL Kir currents (pH 7.3 vs. pH 5.5; 7 OLS in each condition), confirming the lack of effect by low pHi .

Expression of Kir Subunits in OLS

Kir4.1 is the main type of Kir subunit expressed in OLS and astrocytes [8, 37–39], and homomeric Kir4.1 channels are sensitive to H^+ [24, 28]. A possible explanation for H^+ insensitivity in OLS from the optic nerve is a probable change in the Kir4.1 sequence or an heteromerization with some other Kir subunit. Different Kir subunits have been shown to co-express with Kir4.1 in OLS and other cell types (e.g., [19, 37]), and their heteromerization with Kir4.1 has been also proposed and tested, mainly with Kir5.1 but also with Kir2.1. These three subunits were detected by Western blot analysis at the protein level in both OLS and astrocytes. As shown in Fig. 5a, the specific antibodies used for each case identified bands of the molecular weight (MW) expected for subunits Kir2.1 (MW 43 kDa), Kir4.1 (MW 40 kDa), and Kir5.1 (MW 55 kDa). In OLS, the main subunits were Kir2.1 and Kir4.1, while Kir5.1 was expressed in low level. Astrocytes also expressed the three subunits, and

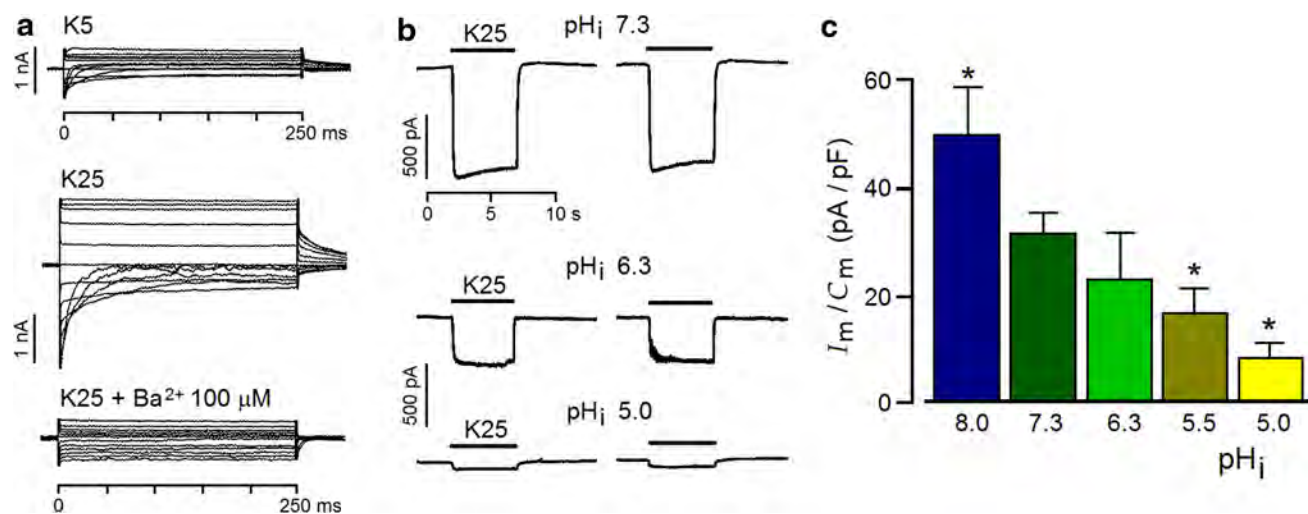


Fig. 4 Kir current sensitivity to intracellular acidification in astrocytes. **a** Traces illustrate membrane current (from -170 to $+50$ mV, cells held at -50 mV) in astrocytes monitored in standard whole-cell configuration, in either K5, K25, or K25 with $100 \mu\text{M}$ Ba^{2+} . **b** Inward current responses elicited by K25 in astrocytes held at -80 mV and

using different internal solutions adjusted to pH values of 7.3, 6.3, or 5.0. A second K25 application was made after 5–10 min under whole-cell configuration. **c** Average Kir current density in astrocytes (-80 mV) monitored in pH_i of 8.0, 7.3, 6.3, 5.5, and 5.0 ($n=13, 25, 24, 7$ and 16 , respectively; $*p<0.05$)

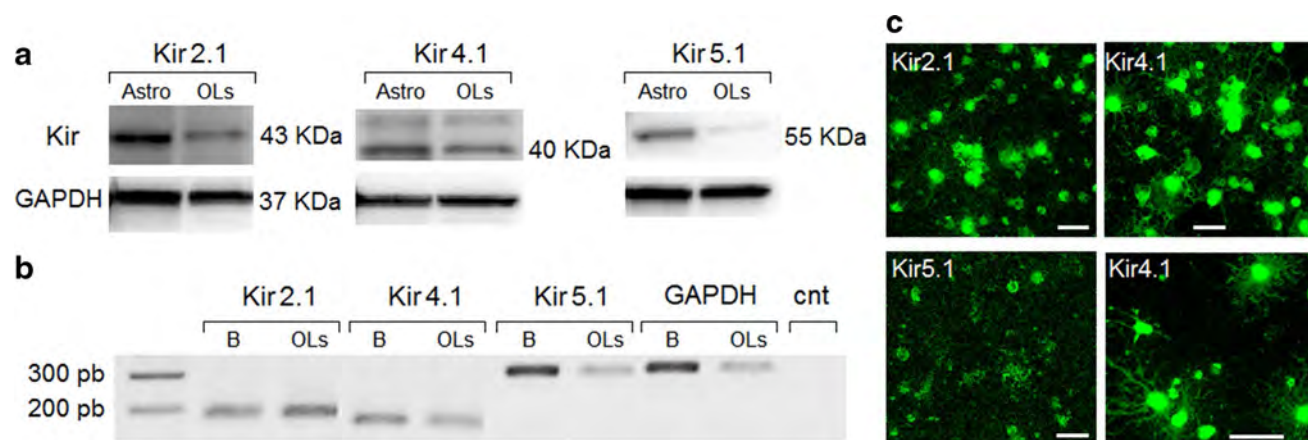


Fig. 5 Expression of Kir subunits in OLS and astrocytes in culture. **a** Immunodetection of Kir2.1, Kir4.1 and Kir5.1 subunits obtained from OLS and astrocytes by Western blotting. These subunits were immunoblotted with anti-Kir2.1, Kir4.1, or Kir5.1 polyclonal antibodies. Cells extracts from OLS and astrocytes were obtained from cultures of 2–3 and 12–15 DIV, respectively. GAPDH was used as a loading control. **b** RT-PCR identification of Kir 2.1, Kir 4.1 and Kir 5.1 subunits from the mRNA from whole brain (B) or OLS from the

optic nerve after 48–72 in culture. Control (cnt) is the reaction from OLS mRNA without RT. **c** Images illustrate the expression of all three Kir subunits analyzed by immunocytochemistry in OLS maintained in culture (3DIV). In general, the pattern for the degree in expression of Kir subunits was in agreement with the detected by Western blot, with a notable presence of Kir2.1 and Kir4.1 in all cultured OLS and a lower level of Kir5.1 expression. (bars $20 \mu\text{m}$)

they all seemed to be present in a similar degree. Immunoblotting results from both OL and astrocyte preparations showed two bands for the Kir4.1 subunit: one at the expected MW (40 kDa) and the other at a higher MW (46 kDa). A variant for this subunit seems to be expressed in both glial cell types.

An RT-PCR analysis (Fig. 5b) was performed to search for possible variants at mRNA level. The mRNA sequences

for the three Kir subunits in OLS isolated from the optic nerve (P12) were amplified. The complete gene sequences were cloned and compared with sequences reported in other cell types (Kir2.1, NM_017296.1; Kir4.1, NM_031602.2; Kir5.1, NM_053314.2). The sequences obtained in OLS were identical to those reported in other cells, and a sequence that might indicate a variant for Kir4.1 at this level was not detected. Finally, and to confirm the presence

of Kir subunits in OLs, an immunocytochemical analysis was performed to detect the expression of Kir 2.1, Kir 4.1, and Kir 5.1 subunits in OLs cultured in vitro for 3 days. As shown in Fig. 5c, the Kir2.1 and Kir4.1 subunits were highly expressed in OLs, whereas the Kir5.1 subunit expression was lower and restricted to the membrane of several cells.

Sensitivity to H⁺ of Kir Subunits from OLs Expressed Heterologously in *Xenopus* oocytes

To confirm that Kir subunits from OLs behave similarly to those reported in other cell types, especially with respect to H⁺ sensitivity, we have heterologously expressed the different subunits in *Xenopus* oocytes by injecting the cRNA for each subunit alone, or by co-injecting Kir4.1 with either Kir2.1 or Kir5.1 in a 1:1 ratio. Kir subunits expressed in the oocytes were then monitored electrophysiologically. Oocytes were held at -80 mV and tested with K25 Ringer's external solution. Inward currents were then confirmed to be blocked by 100 μ M Ba²⁺, in a similar manner to those recorded in OLs (Fig. 6a). For intracellular acidification, oocytes were superfused with solutions containing sodium acetate, as shown in previous studies [25]. This external

solution was adjusted to distinct pH values in a range of 7.4–6.3. It has been shown that the cytoplasmic acidification in the oocyte decreases from 6.8 to 6.1 depending on the solution's pH value [40]. First, inward current was generated by K25, then a brief (60 s) application of K25-Ac⁻ solution, adjusted to pH 7.0 or 6.3 (reported pHi values: 6.5 and 6.1, respectively [40]), produced a reduction of K25-generated inward current. For example, in oocytes injected with Kir4.1 mRNA Kir currents generated by K25 were reduced by 36.5 ± 3.7 and $64.6 \pm 2.4\%$ in K25-Ac⁻ solutions adjusted to pH 7.0 and 6.3, respectively (Fig. 6a, c), while reductions in oocytes co-injected with Kir4.1/Kir5.1 mRNA were of 55 ± 8.3 and $85 \pm 4.8\%$ for the same solutions. The lowest sensitivity to acetate-containing solutions was observed in oocytes injected with Kir2.1 alone, but co-injection Kir4.1/Kir2.1 also showed lower sensitivity compared to that of Kir4.1 alone, resulting in Kir current decrease by 9.8 ± 3.1 and $33.9 \pm 3\%$ in K25-Ac⁻ pH 7.0 and pH 6.3, respectively. Nevertheless, all combinations tested expressing Kir currents were sensitive in some degree to acidification by acetate-containing solution. The same external solutions had no effect on membrane current in control non-injected oocytes, or they produced small inward currents in oocytes expressing any Kir

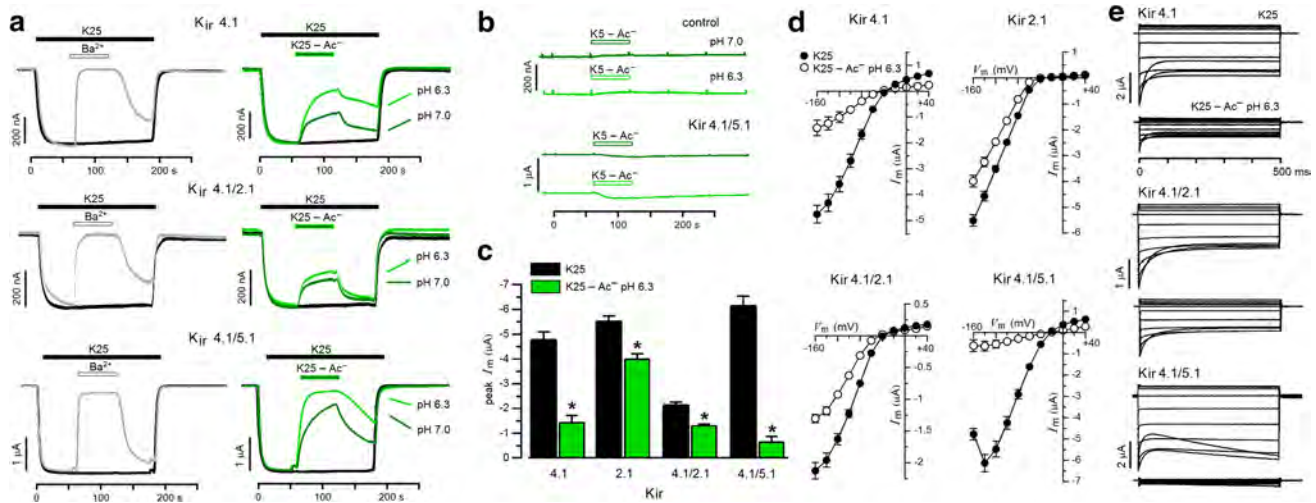


Fig. 6 Kir subunits from OLs expressed heterologously in *Xenopus* oocytes and their sensitivity to intracellular acidification. **a** Oocytes were administered a single or combined injection to express Kir2.1, Kir4.1, or Kir5.1 subunits, and they were monitored using voltage-clamp at -80 mV. Three expression conditions are illustrated as indicated in each panel. Inward currents (Kir) were generated by K25 superfusion (black traces) and confirmed the blockage by 100 μ M Ba²⁺ (gray trace). During a subsequent application of K25 the K25-Ac⁻ solution was applied, adjusted either pH 7.0 or 6.3 (green traces), to test the effect of cytoplasm acidification on Kir currents. **b** Control recordings were made under similar conditions to test the effect of the Ac⁻-containing solution (K5) on native oocytes or on oocytes expressing Kir subunits; the example illustrates co-injection of Kir4.1/5.1. **c** Graph resumes the effect that K25-Ac⁻ adjusted to pH

6.3 had on oocytes expressing Kir subunits. Each column represents the mean (\pm SEM) of the peak inward current in K25 (black bars) or in Ac⁻-containing solution (green bars) ($n=3$ oocytes in each case) for every condition of injection (* $p < 0.05$, versus the respective control). **d** I/V relationships in K25 (solid circles) or K25-Ac⁻ pH 6.3 (empty circles) within oocytes injected with cRNA as indicated. Each data point represents the average of instant current recorded by applying the voltage-step protocol illustrated in d ($n=4$ oocytes in each case). **e** Traces illustrate the time-course of Kir currents monitored in cRNA-injected oocytes under the indicated conditions, applying voltage steps from -160 to +40 mV (in 20 mV steps), in oocytes held at -40 mV during superfusion with K25 or K25-Ac⁻ pH 6.3 as indicated for Kir4.1. (Color figure online)

subunit but tested with the K5-Ac⁻ solution (Fig. 6b), an effect consistent with the inhibition of basal Kir currents commonly observed in normal Ringer solution in oocytes held at -80 mV. This strongly suggested that solutions containing acetate reduced the Kir current through cytoplasmic acidification. Moreover, the inhibition potency of K25-Ac⁻ solutions was of Kir4.1/Kir5.1 \gg Kir4.1 \gg Kir4.1/Kir2.1 $>$ Kir2.1, a sequence identical to that shown in other cell models (e.g., [24]). It was also commonly observed that the acetate-containing solution effect was washed more rapidly in oocytes expressing Kir2.1 alone or in co-injection with Kir4.1. The co-injection of Kir4.1/Kir2.1 mRNA showed a decrease in peak current as compared to oocytes injected only with Kir4.1 or Kir2.1 mRNA (Fig. 6c). This result seems to indicate interaction between these two subunits [41]. Also, as it has been shown, injection with Kir5.1 mRNA alone did not express functional Kir channels, but co-injection with Kir4.1 mRNA increased Kir current sensitivity to acetate (i.e., to acidification; [24, 28]). It was confirmed that the effects of K25-Ac⁻ solutions were maintained within the whole voltage range of -160 to +40 mV (Fig. 6d). A time-course analysis of Kir currents during the voltage steps to different amplitudes showed that decay parameters, mainly with respect to inactivation during hyperpolarizing potentials, did not present differences between control currents in K25 solution and Kir currents in K25-Ac⁻ pH6.3 (Fig. 6e).

Discussion

In here we provide evidence that Kir currents expressed in cultured OLs from the rat optic nerve are insensitive to H⁺, opposite to that observed in Kir currents expressed in astrocytes in vitro.

The appearance of Kir channels in OLs is associated to their maturation stage, although the precise relationship between both phenomena is not completely understood. Once in the mature myelinating stage, Kir currents seem to be important in maintaining a proper resting membrane potential and in contributing to buffer extracellular K⁺ concentration, as it has been proposed in several systems [13, 18, 42, 43]. For example, a strong negative membrane potential would be important as a set point for the function of voltage-dependent Ca²⁺ channels that are involved in myelination [44, 45], as well as to maintain the driving force for Ca²⁺ influx through various conductive pathways.

Despite its apparent importance for OL physiology, the molecular identity of Kir channels remains unknown, although ample evidence has shown that the Kir4.1 subunit is mainly involved in their conformation. Expression of both Kir4.1 mRNA and protein has been detected using different methods and preparations, from extensive genomics

to immunofluorescence in distinct nervous system regions [4, 37, 46]. Moreover, elimination of Kir currents and hypomyelination are clear functional and phenotypical consequences in Kir4.1 KO mice [8]. Kir4.1 is highly expressed in astrocytes, a phenomenon that has undergone thorough research given the central role of Kir4.1 in buffering extracellular K⁺ concentration [47], similar to the role in adult oligodendrocyte precursor cells of the barrel cortex, which express inwardly rectifying channels that are mainly due to expression of Kir4.1 subunit [48] and function as sensors of K⁺ efflux during neuronal physiological activity.

We assume that Kir channels made up of Kir4.1 subunits are sensitive to H⁺ in their cytoplasmic domain and that studying this sensitivity will provide insight as to their possible composition as either homomeric or heteromeric channels. It is known that Kir4.1 homomers are inhibited by intracellular H⁺ with a pKa close to 6.0 in distinct cell models. Their sensitivity increases greatly when Kir4.1 heteromerizes with Kir5.1, in which case pKa increases to around 7.3. Thus, acidification of the intracellular medium would confirm Kir4.1 involvement and a possible association with other subunits. We showed that inwardly rectifying currents in cultured OLs isolated from the optic nerve increase with time, as it has been previously demonstrated [6, 31], and observed that this was concurrent with the expression increase of specific myelinating proteins (MBP and MAG), results that were also in concordance with previous studies made recording OLs from rat optic nerve in situ [49]. The general characteristics of inwardly rectifying currents in OLs, and their strong blockage by μ M Ba²⁺ concentration, indicate a main role for Kir channels throughout the whole recording period in culture. However, when OLs were monitored using intracellular solutions adjusted to one of several pH values in the range of 8.0 to 5.0, the Kir current density did not show dependency on pH. This result was unexpected and we have discarded some possibilities that might to explain this lack of sensitivity to H⁺.

Since Kir channel sensitivity to H⁺ might be modulated by some other intracellular molecules, such as cAMP [49] or PIP2 [50], we made experiments to produce acidification by superfusing an acetate-containing external solutions, and we recorded Kir currents using gramicidin-perforated patch-clamp. The results confirm that Kir channels in OLs were not sensitive to a decrease in the intracellular pH by acetate superfusion. Although [H⁺]_i monitoring via the fluorometric method and current recording were not done simultaneously, it is important to note that a decrease in pH, as quantified by pHrodo-Green, was observed in more than 97% of the cells. Nevertheless, acetate superfusion produced small outward currents that were not dependent on the extracellular K⁺ concentration, and therefore were not

mediated by Kir channels. In contrast, Kir currents in astrocytes were indeed affected by intracellular acidification, as expected for Kir channels where Kir4.1 was involved. This indicated that insensitivity in OLs was cell-type specific.

Qualitative and quantitative changes to DNA encoding Kir subunits in OLs and/or in their subunit composition might result in changes to H⁺ sensitivity. In this study, we explored whether the mRNA expressed in OLs had changes that might explain the insensitivity of Kir to pH. The results (using Western blot, RT-PCR, and immunocytochemistry) showed robust expression of protein for Kir4.1, Kir2.1 and, to a lesser extent, Kir5.1. These three subunits were cloned from OL mRNA, and we found that the sequence for all of them was identical to the one reported before in several cell types. Finally, we confirmed that heterologous expression of Kir subunits cloned from OLs were sensitive to acidification using the *Xenopus* oocyte model. Similar to experiments on OLs, oocytes expressing Kir channels were intracellularly acidified by superfusing them with sodium acetate-containing solution. The potency of inhibition was of Kir4.1/Kir5.1 \gg Kir4.1 \gg Kir4.1/Kir2.1 $>$ Kir2.1, regardless of the external solution's pH in the range from 7.4–6 to 6.0. This order of sensitivity to acidification was expected for the heteromeric Kir4.1/5.1 channel, and the Kir4.1 and Kir2.1 homomers, as previously demonstrated (e.g., [24]). Nevertheless, it is important to note that we consistently observed a decrease in Kir current when Kir4.1/2.1 mRNAs were co-injected, as compared to single subunit expression. We also observed that all the combinations of recombinant Kir channels expressed in oocytes were sensitive to acidification in contrast to their native counterparts in OLs.

Together, these results strongly suggest that the major Kir subunits present in OLs are identical to those previously cloned including their sensitivity to acidification when were heterologously expressed. Therefore, we favor the hypothesis that pH sensitivity is modulated through some other cytoplasmic and/or membrane mechanism in the cultured myelinating OLs.

Kir channel sensitivity to H⁺ has been extensively studied, and efforts have been made to identify the H⁺ sensor in the channel structure. Early studies [41, 51, 52] signaled the contribution of the residues R41, K80, and R311 in human Kir1.1 (R29, K67, and R297 in Kir4.1) as an essential domain for H⁺ sensing. However, recent evidence supports the idea that these residues are part of the gating mechanism, and are not properly H⁺ sensors [53–56]. Moreover, a random mutagenesis screening assay made on Kir1.1 and chimeras of Kir1.1/Kir4.1, expressed in *S. cerevisiae*, showed that it is not possible to identify a unique set of titratable residues that confer H⁺ sensitivity [57]. Instead, it has been proposed that a series of salt-bridges, intersubunits and/or intrasubunit,

accounts for the intrinsic H⁺ sensitivity of Kir channels; the result of protonation would be a destabilization of the open channel state, thus decreasing channel activity [57]. The behavior of Kir channel activity in OLs seems to be singular since several Kir channel subtypes are sensitive to H⁺ concentration [16]; however, some of them react to lower pH (e.g., Kir2.1 subunit), and we cannot exclude the possibility that Kir channels in OLs might close at pH below 5.0. In any case, and opposite to the effect of protonation, Kir channels in OLs seemed to be in a condition where open state was stabilized. Evidence from other cell types have demonstrated that sensitivity to H⁺ is modified by PIP2 binding to Kir subunits, for example, PIP2 binding to Kir4.1/Kir5.1 heteromeric channels reduces their sensitivity to H⁺ [24, 53] (see also, [58]). Evidence for a possible modulatory role of PIP2, or other modulators, in OL Kir channels will require further analysis. Alternatively, Kir channels in OLs may be closely associated with a modulatory protein(s), a type of regulation which is indeed common within the Kir channel superfamily.

It is also important to note here that whatever the mechanism of suppression of sensitivity to pH_i, it is specific to the Kir currents in OLs, since astrocytes presented a typical inhibition by low pH. Intriguingly, Kir currents carried through Kir4.1 subunit-containing channels in OL precursor cells in the adult brain [48] have H⁺ sensitivity, as expected for their respective homomers. Thus, it might be that this feature is actually modulated throughout development, and is expressed differently among OL lineages or regions in the nervous system. We cannot exclude that insensitivity to H⁺ demonstrated here might be a feature of myelinating OLs maintained in vitro, and further analysis using in situ preparations will be necessary to explore this possibility. In addition, it will be of interest to analyze species differences, especially with human OLs, information that might be of interest to understand Kir currents role in pathological conditions.

H⁺ sensitivity regulation in Kir channels may provide OLs with a pathway to control diverse membrane proteins that depend on the resting membrane potential to function. The optic nerve, like many tracts in the nervous system, has a large energy demand, and the metabolic pathways that help to maintain a proper source of energy involve strong interactions between neurons and glial cells (e.g., [59]). Homeostasis of K⁺ and H⁺ is fundamental for this purpose either under normal conditions or during intense neuronal activity. A mechanism to control Kir channel sensitivity to H⁺ in the range demonstrated here may ensure the stability of the membrane resting potential and of the ionic gradients necessary for many functions that might be unbalanced during intense axonal activity, such as K⁺, H⁺ and Na⁺ concentrations in both sides of the OL plasma membrane.

Acknowledgements We thank Saioa Marcos, Horacio Leyva, and Leonor Casanova for technical assistance, and Jessica González Norris for editing the manuscript. This work is supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA-UNAM [Grant IN205615] and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México [Grant 252121] to R.O.A.; and Ministerio de Economía y Competitividad/Fondos Europeos de Desarrollo Regional [Grants SAF2016-75292-R and SAF2013-45084-R] and the Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas [Grant PRY-15-404] to C.M.

References

- Sontheimer H, Kettenmann H (1988) Heterogeneity of potassium currents in cultured oligodendrocytes. *Glia* 1:415–420
- Sontheimer H (1994) Voltage-dependent ion channels in glial cells. *Glia* 11:156–172
- Barres BA, Koroshetz WJ, Swartz KJ, Chun LLY, Corey DP (1990) Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron* 4:507–524
- Larson VA, Zhang Y, Bergles DE (2016) Electrophysiological properties of NG2⁺ cells: matching physiological studies with gene expression profiles. *Brain Res* 2016(1638):138–160
- Sontheimer H, Trotter J, Schachner M, Kettenmann H (1989) Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron* 2:1135–1145
- Attali B, Wang N, Kolot A, Sobko A, Cherepanov V, Soliven B (1997) Characterization of delayed rectifier Kv channels in oligodendrocytes and progenitor cells. *J Neurosci* 17:8234–8245
- Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H (1991) Developmental changes in the membrane current pattern, K⁺ buffer capacity, and morphology of glial cells in the corpus callosum slice. *J Neurosci* 1:3008–3024
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P (2001) Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci* 21:5429–5438
- Orkand RK (1980) Extracellular potassium accumulation in the nervous system. *Fed Proc* 39(5):1515–1518
- Hoppe D, Chvatal A, Kettenmann H, Orkand RK, Ransom BR (1991) Characteristics of activity-dependent potassium accumulation in mammalian peripheral nerve in vitro. *Brain Res* 552:106–112
- Ransom CB, Sontheimer H (1995) Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K⁺ currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol* 73(1): 333–346.
- Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, Foran PG, Dolly JO, Ghiani CA, Gallo V, Wilkin GP (2000) Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30(4):362–372
- Kalsi AS, Greenwood K, Wilkin G, Butt AM (2004) Kir4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *J Anat* 204:475–485
- Hibino H, Fujita A, Iwai K, Yamada M, Kurachi Y (2004) Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J Biol Chem* 279(42):44065–44073
- Marques S, Zeisel A, Codeluppi S, van Bruggen D, Falcão AM, Xiao L, Li H, Häring M, Hochgerner H, Romanov RA, Gyllborg D, Muñoz-Manchado AB, La Manno G, Lönnnerberg P, Floriddia EM, Rezayee F, Ernfors P, Arenas E, Hjerling-Leffler J, Harkany T, Richardson WD, Linnarsson S, Castelo-Branco G (2016) Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science* 352(6291):1326–1329
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90(1):291–366
- Gamper N, Rohacs T (2012) Phosphoinositide sensitivity of ion channels, a functional perspective. In: Balla et al. (eds) *Phosphoinositides II: the diverse biological functions*. Springer, The Netherlands, p 289–333
- Olsen ML, Sontheimer H (2008) Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *J Neurochem* 107:589–601
- Brasko C, Hawkins V, De La Rocha IC, Butt AM (2016) Expression of Kir4.1 and Kir5.1 inwardly rectifying potassium channels in oligodendrocytes, the myelinating cells of the CNS. *Brain Struct Funct* 1:19
- Moroni RF, Inverardi F, Regondi MC, Pennacchio P, Frassoni C (2015) Developmental expression of Kir4.1 in astrocytes and oligodendrocytes of rat somatosensory cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 47:198–205
- Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B, Rothhammer V, Chan A, Gold R, Berthele A, Bennett JL, Korn T, Hemmer B (2012) Potassium channel Kir4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 367(2):115–123
- Kraus V, Srivastava R, Kalluri SR, Seidel U, Schuelke M, Schimmel M, Rostasy K, Leiz S, Hosie S, Grummel V, Hemmer B (2014) Potassium channel KIR4.1-specific antibodies in children with acquired demyelinating CNS disease. *Neurology* 82:470–473
- Lagrutta AA, Bond CT, Xia XM, Pessia M, Tucker S, Adelman JP (1996) Inward rectifier potassium channels. Cloning, expression and structure-function studies. *Jpn Heart J* 37(5):651–660
- Yang Z, Xu H, Cui N, Qu Z, Chanchevalap S, Shen W, Jiang C (2000) Biophysical and molecular mechanisms underlying the modulation of heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by CO₂ and pH. *J Gen Physiol* 116:33–45
- Tsai TD, Shuck ME, Thompson DP, Bienkowski MJ, Lee KS (1995) Intracellular H⁺ inhibits a cloned rat kidney outer medulla K⁺ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 268(5):C1173–C1178
- Yuan Y, Shimura M, Hughes BA (2003) Regulation of inwardly rectifying K⁺ channels in retinal pigment epithelial cells by intracellular pH. *J Physiol* 549(2):429–438. doi:10.1113/jphysiol.2003.042341
- Xu H, Yang Z, Cui N, Giwa LR, Abdulkadir L, Patel M, Sharma P, Shan G, Shen W, Jiang C (2000) Molecular determinants for the distinct pH sensitivity of Kir1.1 and Kir4.1 channels. *Am J Physiol* 279(5):C1464–C1471
- Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y (2000) In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* 525(3):587–592
- Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70(1):31–46
- Soria FN, Zabala A, Pampliega O, Palomino A, Miguelez C, Ugedo L, Sato H, Matute C, Domercq M (2016) Cystine/glutamate antiporter blockage induces myelin degeneration. *Glia* 64:1381–1395
- Arellano RO, Sánchez-Gómez MV, Alberdi E, Canedo-Antelo M, Chara JC, Palomino A, Pérez-Samartín A, Matute C (2016) Axon-to-glia interaction regulates GABA_A receptor expression in oligodendrocytes. *Mol Pharmacol* 89(1):63–74

32. Matute C, Arellano RO, Conde-Guerri B, Miledi R (1992) mRNA coding for neurotransmitter receptors in a human astrocytoma. *PNAS* 89(8):3399–3403
33. Jeziorski MC, Greenberg RM, Clark KS, Anderson PA (1998) Cloning and functional expression of a voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunit from jellyfish. *J Biol Chem* 273(35):22792–22799
34. S e R, Andreassen M, Klaerke DA (2009) Modulation of Kir4.1 and Kir4.1-Kir5.1 channels by extracellular cations. *Biochim Biophys Acta* 1788(9):1706–1713. doi:10.1016/j.bbame.2009.07.002
35. Kettenmann H, Schlue WR (1988) Intracellular pH regulation in cultured mouse oligodendrocytes. *J Physiol* 406(1):147–162
36. Morihata H, Kawawaki J, Okina M, Sakai H, Notomi T, Sawada M, Kuno M (2008) Early and late activation of the voltage-gated proton channel during lactic acidosis through pH-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Arch* 455(5):829–838
37. Olsen ML, Higashimori H, Campbell SL, Hablitz JJ, Sontheimer H (2006) Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes. *Glia* 53(5):516–528
38. Neusch C, Papadopoulos N, M ller M, Maletzki I, Winter SM, Hirrlinger J, Handschuh M, Ba hr M, Richter DW, Kirchhoff F, H lsmann S (2006) Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K^+ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K^+ regulation. *J Neurophysiol* 95(3):1843–1852
39. Kucheryavykh YV, Kucheryavykh LY, Nichols CG, Maldonado HM, Baksi K, Reichenbach A, Skatchkov SN, Eaton MJ (2007) Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia* 55(3):274–281
40. Choe H, Zhou H, Palmer LG and Sackin H (1997) A conserved cytoplasmic region of ROMK modulates pH sensitivity, conductance, and gating. *Am J Physiol* 273(4):F516–F529
41. Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppersberg JP (1996) Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *The EMBO J* 15(16):4093
42. Connors BW, Ransom BR, Kunis DM, Gutnick MJ (1982) Activity-dependent K^+ accumulation in the developing rat optic nerve. *Science* 216:1341–1343
43. Butt AM, Kalsi A (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* 10:33–44
44. Chen S, Ren YQ, Bing R, Hillman DE (2000) Alpha 1E subunit of the R-type calcium channel is associated with myelinogenesis. *J Neurocytol* 29:719–728
45. Cheli VT, Santiago González DA, Spreuer V, Paez PM (2015) Voltage-gated Ca^{2+} entry promotes oligodendrocyte progenitor cell maturation and myelination in vitro. *Exp Neurol* 265:69–83
46. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28(1):264–278. doi:10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008
47. Ransom BR (1992) Glial modulation of neural excitability mediated by extracellular pH: a hypothesis. *Prog Brain Res* 94:37–46
48. Maldonado PP, Vélez-Fort M, Levavasseur F, Angulo MC (2013) Oligodendrocyte precursor cells are accurate sensors of local K^+ in mature gray matter. *J Neurosci* 33:2432–2442
49. Bolton S, Butt AM (2006) Cyclic AMP-mediated regulation of the resting membrane potential in myelin-forming oligodendrocytes in the isolated intact rat optic nerve. *Exp Neurol* 202:36–43
50. Du X, Zhang H, Lopes C, Mirshahi T, Rohacs T, Logothetis DE (2004) Characteristic interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate determine regulation of Kir channels by diverse modulators. *J Biol Chem* 279(36):37271–37281
51. Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppersberg JP, Flakler B, Ludwig J (1999) pH gating of ROMK (Kir1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *PNAS* 96(26):15298–15303
52. Wang R, Su J, Wang X, Piao H, Zhang X, Adams CY, Cui N, Jiang C (2005) Subunit stoichiometry of the Kir1.1 channel in proton-dependent gating. *J Biol Chem* 280(14):13433–13441
53. Leng Q, MacGregor GG, Dong K, Giebisch G, Hebert SC (2006) Subunit–subunit interactions are critical for proton sensitivity of ROMK: evidence in support of an intermolecular gating mechanism. *PNAS* 103(6):1982–1987
54. Rapedius M, Paynter JJ, Fowler P, Shang L, Sansom M, Tucker SJ, Baukowitz T (2007) Control of pH and PIP₂ gating in heteromeric Kir4.1/Kir5.1 channels by H⁺-Bonding at the helix-bundle crossing. *Channels (Austin)* 1(5):327–330
55. Rapedius M, Haider S, Browne KF, Shang L, Sansom MS, Baukowitz T, Tucker SJ (2006) Structural and functional analysis of the putative pH sensor in the Kir1.1 (ROMK) potassium channel. *EMBO Rep* 7(6):611–616
56. Sepúlveda FV, Cid LP, Teulon J, Niemeyer MI (2015) Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K₂P and Kir K⁺-transport channels. *Physiol Rev* 95(1):179–217
57. Paynter JJ, Shang L, Bollepalli MK, Baukowitz T, Tucker SJ (2010) Random mutagenesis screening indicates the absence of a separate H⁺-sensor in the pH-sensitive Kir channels. *Channels (Austin)* 4(5):390–397
58. Leung YM, Zeng WZ, Liou HH, Solaro CR, Huang CL (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and intracellular pH regulate the ROMK1 potassium channel via separate but interrelated mechanisms. *J Biol Chem* 275(14):10182–10189
59. Brown AM, Ransom BR (2015) Astrocyte glycogen as an emergency fuel under conditions of glucose deprivation or intense neural activity. *Metab Brain Dis* 30(1):233–239