

Facultad de Medicina



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad de Medicina

Caracterización de la modulación de la función del dominio sensor de voltaje por protones en el canal de potasio *Shaker*.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

Licenciada en Investigación Biomédica Básica

**PRESENTA:**

María Eugenia Orozco Contreras

**TUTOR:**

Dr. León David Islas Suárez

Ciudad Universitaria, CDMX.

2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Agradecimientos

Ha sido un largo camino, el cual no habría recorrido sin tantas personas que me apoyaron y me empujaron a seguir adelante.

## Agradecimientos formales

Agradezco a mi tutor, el Dr. León David Islas Suárez por la dirección, asesoría y corrección de tesis de este proyecto.

A la Dra. Gisela Edith Rangel Yescas por su dirección y sus grandes aportaciones durante los experimentos de biología molecular, en especial durante el diseño de primers mutagénicos, PCR y validación de las mutantes. Gracias por enseñarme todo lo necesario.

A Esteban Suárez Delgado, estudiante de doctorado del laboratorio. Gracias por proporcionar los datos del canal hHv1 usados en esta tesis.

Gracias también los doctores Marcia Hiriart Urdanivia, Froylán Miguel Gómez Lagunas, Fredy Roberto Cifuentes Navarro y María Chávez Canales por ser mi comité sinodal, por dedicar parte de su tiempo para leer este trabajo y darme sus valiosas opiniones y correcciones.

Gracias a la Lic. Lucía Brito Ocampo y a Janet Díaz Luna por el apoyo bibliográfico brindado.

## Agradecimientos personales

Agradezco a mis padres, Saúl Orozco y Estela Contreras y a mi hermana Ana Luisa, quienes a pesar de las dificultades que se presentaron, el tiempo o la distancia estuvieron apoyándome durante toda mi vida. Este agradecimiento se extiende al resto de mi familia, gracias por su apoyo y sus cuidados durante todo este tiempo.

Agradezco al Dr. Zentella, por su amistad y en especial su apoyo al principio de este camino, sin el cual no habría sobrevivido a la crisis existencial por la que pasé al convertirme en una estudiante de la LIBB. Agradezco al equipo del Dr. Zentella, en el

cual encontré amigos inolvidables, gracias a Ernesto y a Alberto, por llevarme de la mano en mis primeros experimentos del laboratorio, por su amistad y sus consejos.

Gracias al Dr. León, por su paciencia y sus sutiles regaños llenos de sarcasmo, por inspirarme a seguir aprendiendo sobre diversas cosas para desarrollar nuevas herramientas. Gracias por las clases de mejoramiento de equipo de laboratorio, fueron experimentos divertidos.

Gracias a la Dra. Gisela, por sus enseñanzas y su amistad. Vales mil.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio de Biofísica de Canales Iónicos, Mike, Teriws, Ceci, Miriam, Aymé, Bety, nuestra invitada Andrea Medina y a Don Esteban, por los momentos que hemos pasado juntos, por las enseñanzas y consejos que me han dado, por ayudarme a mantener vivas y felices a las ranas y por su apoyo durante este tiempo.

Gracias a la Dra. Carolina Barriga y al Dr. Isra Chávez, por su apoyo y amistad. Gracias por ayudarme a mantenerme cuerda en estos meses de encierro.

A mis amigos de Morelia, Mane, Kenzukito y Gerardo, por escucharme, por su amistad y apoyo, por esperarme hasta las vacaciones para pasar tiempo juntos. Gracias por soportarme en mis peores momentos y por todos los momentos que hemos pasado.

A mis amigos y compañeros de la LIBB. Majo, Mariana, Emmanuel, Karla y en especial a Damián, por hacer todo más ameno. No habría sido lo mismo sin ustedes.

Esta tesis fue realizada con ayuda de una Beca de Terminación de Estudios, financiada por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico – Programa de Apoyos a Proyectos de Innovación e Investigación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) correspondiente al proyecto IN-203318, el cual fue asignado al Dr. León David Islas Suárez.

# Índice

|  |    |
|--|----|
| Índice de abreviaturas   | 1  |
| Índice de tablas y figuras                                     | 2  |
| Resumen  | 4  |
| 1. Introducción  | 6  |
| 1.1 Membrana celular   | 6  |
| 1.2 Canales iónicos  | 8  |
| a. Potencial de membrana y potenciales de acción               | 10 |
| 1.3 Canales iónicos activados por voltaje                      | 12 |
| a. Acoplamiento electromecánico                                | 14 |
| b. Corrientes de compuerta                                     | 15 |
| c. Medición de corrientes de compuerta                         | 17 |
| 1.4 El canal permeable a protones Hv1                          | 17 |
| a. Mecanismos propuestos para la permeación de protones        | 19 |
| b. Interacciones electrostáticas en el VSD de Hv1              | 22 |
| c. Hv1 está modulado por el gradiente de protones              | 23 |
| 1.5 Shaker es un K <sub>v</sub> canónico                       | 26 |
| a. Shaker es un buen modelo para medir corrientes de compuerta | 28 |
| Planteamiento del problema                                     | 30 |
| Hipótesis  | 32 |
| Objetivo general   | 32 |
| Objetivos específicos  | 32 |
| 2. Metodología   | 33 |
| 2.1 Biología Molecular   | 33 |
| 2.2 Expresión heteróloga                                       | 35 |
| 2.3 Electrofisiología  | 36 |
| 2.4 Adquisición y análisis de datos                            | 38 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| a.        | Sustracción de componentes lineales   | 38        |
| b.        | Curvas carga contra voltaje   | 40        |
| c.        | Análisis de cinética  | 41        |
| <b>3.</b> | <b>Resultados</b>   | <b>43</b> |
| 3.1       | Caracterización del movimiento de carga de Shaker en diferentes $\Delta\text{pH}$ | 44        |
| a.        | Comparación del comportamiento de Shaker WT contra algunas mutantes de S3         | 49        |
| b.        | Shaker Y282S  | 53        |
| c.        | Shaker L286E  | 56        |
| 3.2       | Análisis de cinética  | 61        |
| a.        | Shaker WT   | 62        |
| b.        | Shaker Y282S  | 63        |
| c.        | Shaker L286E  | 64        |
|           | <b>Discusión</b>  | <b>66</b> |
|           | <b>Conclusiones</b>   | <b>71</b> |
|           | <b>Tablas anexas</b>  | <b>72</b> |
|           | <b>Bibliografía</b>   | <b>75</b> |

# Índice de abreviaturas

|                   |   |
|-------------------|---|
| Å                 | Ángstrom  |
| ATP               | Trifosfato de adenosina   |
| $\Delta\text{pH}$ | Gradiente de protones ( $\text{pH}_{\text{externo}} - \text{pH}_{\text{interno}}$ ) |
| EAG               | Subfamilia de canales de potasio “éther-a-go-go”                                    |
| F                 | Constante de Faraday  |
| GHK               | Ecuación de Goldman-Hodking-Katz  |
| Hv1               | Canal permeable a protones  |
| KcsA              | Canal de potasio de <i>Streptomyces</i>   |
| KCN               | Canales de potasio  |
| K <sub>F</sub>    | Canales de potasio de activación rápida   |
| K <sup>+</sup>    | Ion potasio   |
| K <sub>B</sub>    | Contante de Boltzmann   |
| K <sub>v</sub>    | Canal de potasio activado por voltaje   |
| Nav               | Canal de sodio activado por voltaje   |
| nnR               | Motivo de dos aminoácidos neutros seguidos por arginina                             |
| QV                | Curva carga contra voltaje  |
| PA                | Potencial de acción   |
| PVP               | Motivo de Prolina-Valina-Prolina  |
| R                 | Arginina  |
| rmsd              | Desviación de la media de raíz cuadrada de las posiciones atómicas                  |
| $\tau$ -V         | Curva tau contra voltaje  |
| V <sub>0.5</sub>  | Potencial medio de activación calculado por ecuación de Boltzmann                   |
| VGC               | Canales activados por voltaje   |
| V <sub>eq</sub>   | Potencial de equilibrio de un ion   |
| V <sub>m</sub>    | Potencial medio de activación (calculado por interpolación)                         |
| V <sub>mem</sub>  | Potencial de membrana   |
| VSD               | Dominio sensor de voltaje   |

# Índice de tablas y figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1 Modelo tridimensional de la membrana celular.   | 7  |
| Figura 1.2. Anatomía de un canal iónico.   | 9  |
| Tabla 1.1 Concentraciones iónicas del medio interno celular y externo en células del músculo esquelético de mamíferos. | 10 |
| Figura 1.3. Potencial de acción.   | 12 |
| Figura 1.4. Topología de VGCs.   | 13 |
| Figura 1.5. Acoplamiento electromecánico en canales activados por voltaje.   | 15 |
| Figura 1.6. Corriente iónica vs corriente de compuerta.  | 16 |
| Figura 1.7. Corriente de compuerta (Q) y conductancia (G) normalizadas y graficadas contra su respectivo voltaje.      | 17 |
| Figura 1.8. Hv1 vs VGCs canónicos.   | 18 |
| Figura 1.9. Mecanismo de Grotthus para movimiento de protones en solución acuosa.                                      | 20 |
| Figura 1.10. Filtro de selectividad de Hv1.  | 22 |
| Figura 1.11. Interacciones electrostáticas en Hv1.   | 23 |
| Figura 1.12. Modulación de Hv1 por $\Delta\text{pH}$ .   | 24 |
| Figura 1.13. Modelo de modulación por $\Delta\text{pH}$ en Hv1.  | 26 |
| Figura 1.14. Filtro de selectividad de Kv.   | 27 |
| Figura 1.15. Estructura de Kv 1.2.   | 28 |
| Figura 1.16. Corrientes de compuerta de Shaker W434F-R377H.  | 29 |
| Figura 1.17. Alineamiento estructural de Shaker y Hv1.   | 31 |
| Tabla 2.1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para mutar a Shaker.  | 34 |
| Tabla 2.2. Soluciones para procesamiento e incubación de ovocitos.   | 35 |
| Figura 2.1. Fijación de voltaje de dos electrodos.   | 37 |
| Figura 2.2. Sustracción de componentes lineales de la corriente.   | 39 |
| Figura 3.1. Modelo de la estructura tridimensional de Shaker.  | 43 |
| Figura 3.2. Corrientes de compuerta de Shaker W434F.   | 45 |
| Figura 3.3. Curvas QV de Shaker WT.  | 46 |
| Figura 3.4. $V_m$ vs $\Delta\text{pH}$ de Shaker WT y hHv1.  | 48 |
|  | 2  |

|   |    |
|---|----|
| Figura 3.5. Curvas QV de Shaker WT, L286E y Y282S vs. $\Delta pH = 0$ .               | 49 |
| Figura 3.6. Curvas de Shaker WT, L286E y Y282S QV vs. $\Delta pH = -2$ .              | 50 |
| Figura 3.7. Curvas QV de Shaker WT y Y282S vs. $\Delta pH = 2$ .                      | 51 |
| Figura 3.8. Curvas QV de Shaker WT y Y282S vs. $\Delta pH = 3$ .                      | 52 |
| Figura 3.9. Curvas QV de Shaker WT y L286E vs. $\Delta pH$ s positivos.               | 52 |
| Figura 3.10. Curvas QV de Shaker Y282S.   | 53 |
| Figura 3.11. Corrientes de compuerta de Shaker Y282S.                                 | 54 |
| Figura 3.12. $V_m$ vs $\Delta pH$ de Shaker WT y Y282S.                               | 55 |
| Figura 3.13. Corrientes de compuerta de Shaker L286E.                                 | 57 |
| Figura 3.14. Curvas QV de Shaker L286E.   | 58 |
| Figura 3.15. $V_m$ vs $\Delta pH$ de Shaker WT y L286E.                               | 59 |
| Figura 3.16. $V_m$ vs $\Delta pH$ de Shaker WT, Y282S y L286E.                        | 60 |
| Figura 3.17 Ajustes de ecuación exponencial a una familia de corrientes de compuerta. | 61 |
| Figura 3.18. Curvas $\tau$ -V a $\Delta pH = 0$ de Shaker WT, Y282S y L286E.          | 62 |
| Figura 3.19. Curvas $\tau$ -V de Shaker WT.   | 63 |
| Figura 3.20. Curvas $\tau$ -V de Shaker Y282S.  | 64 |
| Figura 3.21. Curvas $\tau$ -V de Shaker L286E.  | 65 |
| Tabla Anexa A. $V_{0.5}$ calculadas con base en ajustes de la ecuación de Boltzmann.  | 72 |
| Tabla Anexa B. $z$ calculadas con base en ajustes de la ecuación de Boltzmann.        | 73 |
| Tabla Anexa C. $V_m$ calculadas por interpolación.                                    | 74 |

# Resumen

Hv1 es un canal permeable a protones, cuya estructura consiste en un dominio sensor de voltaje (VSD) y carece de dominio de poro. Esto significa que Hv1 permea protones a través del VSD. Otra característica distintiva de este canal es que presenta modulación por el gradiente de protones. Dependiendo de este gradiente o  $\Delta\text{pH}$  ( $\text{pH}_{\text{externo}} - \text{pH}_{\text{interno}}$ ), el voltaje de activación del canal cambia ( $40\text{mV}/\Delta\text{pH}$ ). Entonces, en la estructura del VSD de Hv1 están además el poro y el sensor de pH. El mecanismo molecular de modulación por  $\Delta\text{pH}$  todavía no está claro, lo ideal sería medir corrientes de compuerta para entender el comportamiento del VSD en diferentes  $\Delta\text{pH}$ , pero por la convergencia de tantas funciones en el VSD no es factible. De esto surge la necesidad de encontrar un modelo donde se puedan medir corrientes de compuerta para estudiar la modulación por  $\Delta\text{pH}$ . Dado que el VSD del canal de potasio *Shaker* tiene conservación de secuencia y de estructura con el VSD de Hv1, y que además se conoce una mutación en su dominio del poro (W434F) que permite medir corrientes de compuerta, sería bueno estudiar la modulación por  $\Delta\text{pH}$  en el VSD de Shaker.

Este trabajo se enfocó en validar a Shaker-W434F como modelo para estudiar la modulación por  $\Delta\text{pH}$ . Se midieron corrientes de compuerta en diferentes  $\Delta\text{pH}$ . Los resultados mostraron dos cosas, la primera es que Shaker sí es un buen modelo porque presenta modulación por  $\Delta\text{pH}$  en sus corrientes de compuerta. La segunda es que, dada la conservación entre los VSD de los canales, probablemente otros canales están sujetos en algún grado a modulación por  $\Delta\text{pH}$  y no solo Hv1.

Además, una investigación previa sugiere una serie de residuos protonables que podrían estar participando en el sensor de pH de Hv1. Se hicieron un par de sustituciones individuales en el VSD de Shaker-W434F y se midieron corrientes de compuerta en varios  $\Delta\text{pH}$ . Ya que ambas mutaciones están en el VSD, la voltaje-dependencia del canal cambió ligeramente. Además, cambió el comportamiento del VSD en varios  $\Delta\text{pH}$  comparados con Shaker-W434F. Esto apoya a otros trabajos que han sugerido que el sensor de pH de Hv1 está conformado por varios aminoácidos protonables, formando un sitio de unión difuso para los protones.

Este trabajo permite ampliar la visión de que los VSD detectan solamente voltaje, ya ahora se deberían considerar las implicaciones de este fenómeno de modulación por  $\Delta\text{pH}$  desde el punto de vista fisiológico. Hay diversos procesos biológicos en los que se conjuntan las funciones de los canales iónicos activados por voltaje en un ambiente con  $\Delta\text{pH}$  1 a 1.5, como cáncer o isquemia.

Finalmente, este trabajo permite sentar un precedente para considerar que el estudio de mecanismo de modulación por  $\Delta\text{pH}$  de Hv1 usando a Shaker como modelo es una buena alternativa para descifrar este fenómeno y se podría comprender con un poco más de detalle este fascinante fenómeno.

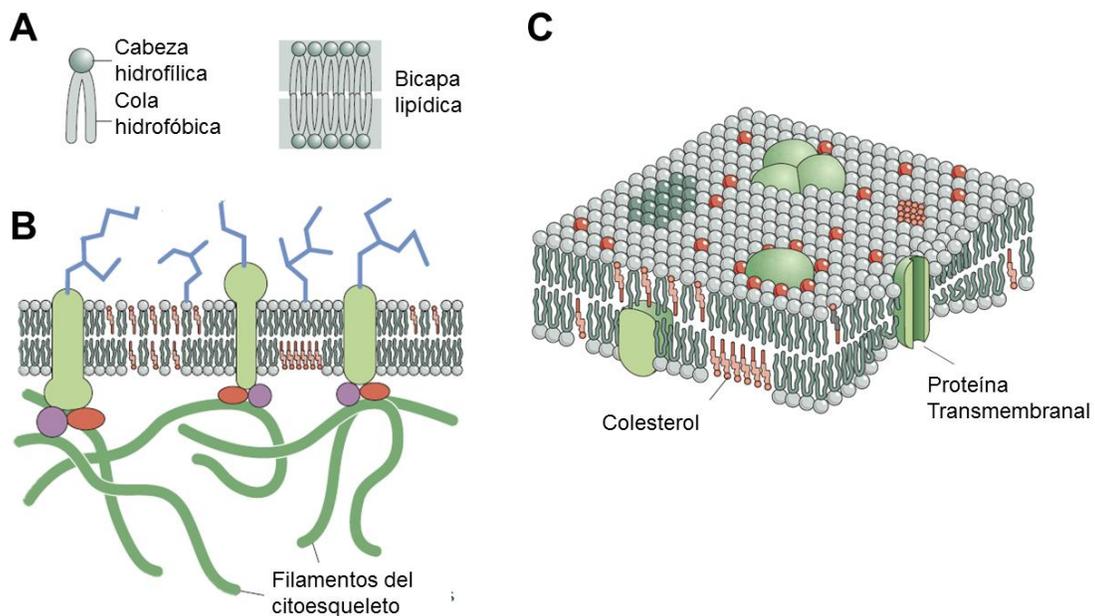
# 1. Introducción

Las células separan su medio interno del resto del universo mediante la membrana plasmática, una estructura de aproximadamente 30 Å de espesor, compuesta por fosfolípidos, proteínas y colesterol. El carácter anfipático de los fosfolípidos le da a la membrana una permeabilidad selectiva. Por un lado, permite el paso libre de moléculas pequeñas y no cargadas, tales como el agua, el oxígeno o el dióxido de carbono. Por otro lado, dada la hidrofobicidad de los fosfolípidos, se impide la interacción y con ello el flujo de las moléculas con carga como los iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ , etc.). Sin embargo, para funcionar correctamente las células necesitan transportar dichos iones y diversas moléculas de diferentes cargas y tamaños a través de la membrana. El paso de estas moléculas se lleva a cabo gracias a proteínas insertadas en la membrana plasmática. Estas proteínas se clasifican como transportadores o como canales de acuerdo con mecanismo de funcionamiento. Los transportadores, por lo general, mueven moléculas en contra del gradiente de concentración del ion a mover, necesitan energía proveniente de ATP y permiten establecer diferentes condiciones entre el lado intracelular y el extracelular, por ejemplo, el potencial de membrana. El segundo grupo, conformado por los canales iónicos se caracteriza por permitir el paso de iones, a favor de gradiente y a altas velocidades (Alberts et al., 2017). Dos de dichos canales son el tema principal de esta tesis.

## 1.1 Membrana celular

Los glicerofosfolípidos tienen una estructura en la cual un glicerol tiene esterificados un grupo fosfato con alcohol y dos ácidos grasos, uno en cada carbono. El fosfato, al tener carga neta, le permite interactuar con moléculas de agua, mientras que los ácidos grasos son hidrofóbicos. Las características físicas de los fosfolípidos en una solución acuosa inducen una organización en bicapa de las membranas celulares, es decir, con las colas hidrofóbicas interactuando entre sí y con las cabezas viendo hacia la fase acuosa.

Existe una gran diversidad de fosfolípidos ya que hay variaciones tanto en el alcohol esterificado como en las cadenas de ácidos grasos, que pueden tener diferentes longitudes e insaturaciones. Esta diversidad de estructuras le permite a la membrana tener un cierto grado de variación en el grosor, la fluidez y la forma, dependiendo de la temperatura, la cantidad del colesterol y las proteínas asociadas del citoesqueleto (Alberts et al., 2017; Sezgin et al., 2017). En la **Figura 1.1** se muestra un modelo de membrana celular.



**Figura 1.1 Modelo tridimensional de la membrana celular.** **A.** Modelo de un fosfolípido y ensamblaje de una bicapa lipídica en solución acuosa. **B.** Corte transversal de una membrana celular. Se incluyen las proteínas de membrana con sus respectivas moléculas asociadas. El colesterol se indica con estructuras de color rojo. **C.** Se muestra un modelo de mosaico fluido de la membrana celular. Las esferas de colores representan las cabezas de diferentes fosfolípidos. Modificado de (Phillips R., Kondev J. Theriot J. García H., 2013)

Las células no están completamente aisladas del exterior no solo porque su membrana es semipermeable, sino también gracias a proteínas que están embebidas parcial o totalmente en la membrana. Éstas se clasifican de acuerdo con su función, que puede ser, entre otras, adhesión, reconocimiento entre células, para la transducción de señales o para el transporte de algunos solutos (Alberts et al., 2017; Sezgin et al., 2017).

Como ya se mencionó, ya que las cadenas de ácido graso son hidrofóbicas, no interactúan con moléculas parcial o totalmente cargadas, por ejemplo, aminoácidos o iones. Justamente este tipo de moléculas requieren proteínas de membrana para ser transportadas (Alberts et al., 2017; Boron F., 2012)

## 1.2 Canales iónicos

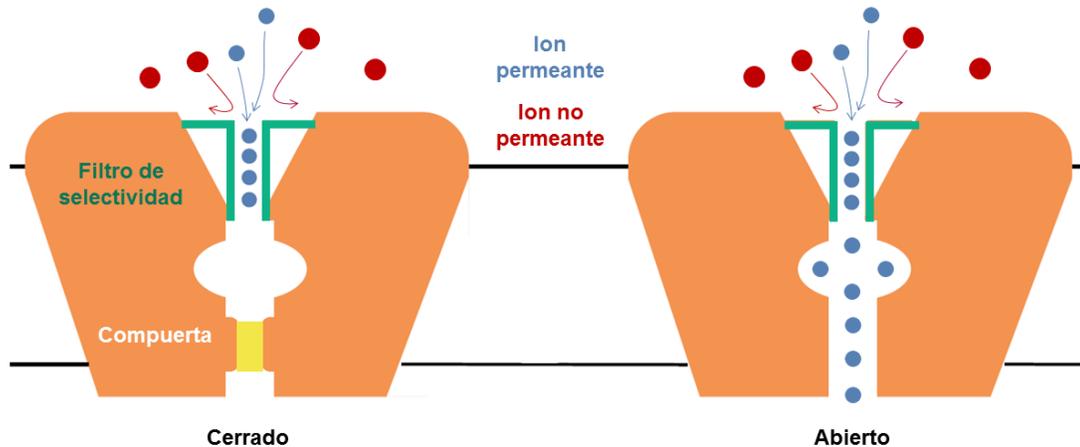
Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana, casi siempre, organizadas en multímeros. Su función es permitir el paso de iones de manera selectiva a favor del gradiente de concentración del ion que mueven. Para ello, los canales iónicos tienen un filtro de selectividad que permite discriminar entre diferentes iones (Boron F., 2012).

Los filtros de selectividad se caracterizan por tener una secuencia firma de aminoácidos, que permite al canal interactuar con el ion permeante. Por ejemplo, los canales selectivos a potasio tienen una secuencia firma TVGYG (Rudy et al., 2009). Los canales suelen interactuar con los iones a través de interacciones electrostáticas o dipolares, por lo que su selectividad depende de la carga y el tamaño del ion.

Además del filtro de selectividad, los canales tienen una compuerta de activación, que presenta cambios conformacionales que permite el estado abierto o cerrado del canal. En la **Figura 1.2** se muestra un modelo de un canal iónico en estado cerrado o abierto con los cambios en su compuerta. Adicionalmente, los canales iónicos pueden presentar un tercer estado, el inactivo, que se refiere a la oclusión del poro en el estado abierto del canal (Hille, 2001). Este estado inactivo puede funcionar como un mecanismo regulador, y ya que esta tesis no se enfocará en estados inactivados, no se profundizará en este tema.

Como ya se mencionó, los canales iónicos no necesitan hidrolizar ATP como otras proteínas transportadoras de iones, e.g. la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. El movimiento de iones proviene del establecimiento de un gradiente electroquímico. Esto quiere decir que cuando los canales están en estado abierto los iones se mueven desde una concentración alta a una baja, es decir, a favor del gradiente de concentración (Alberts et al., 2017; Boron F., 2012; Hille, 2001). Otra característica importante de los canales, es que no se consideran saturables en condiciones fisiológicas, como sí lo son los

transportadores -ya que estos últimos requieren translocar de un lado a otro de la membrana plasmática los iones (Alberts et al., 2017). La energía que los canales necesitan para pasar de un estado cerrado a abierto proviene del estímulo que activa a los canales (Zhang et al., 2018).



**Figura 1.2. Anatomía de un canal iónico.** El filtro de selectividad (verde), interactúa con iones permeantes (azul) y discrimina a los iones que no permea (rojo). Cuando la compuerta (amarillo) está cerrada no hay paso de iones. Modificado de (Zhang et al., 2018).

A grandes rasgos, se puede clasificar a los canales iónicos de acuerdo con su mecanismo de activación (Alberts et al., 2017):

- 1) Activados por ligando, que tienen dominios de unión intra o extracelular. Entre los ligandos extracelulares están los neurotransmisores como la acetilcolina, mientras que, en el lado intracelular, hay interacciones con nucleótidos, muchas veces resultado de una cascada de señalización previa.
- 2) Activados por estímulos mecánicos, principalmente ubicados en terminales sensoriales, responden a deformaciones en la membrana plasmática. Estos son necesarios en el sentido del tacto, por ejemplo, cuando una extremidad toca algo, se deforma la membrana y eso desencadena la apertura del canal.
- 3) Los activados por voltaje (VGC), que se abren ante un cambio de potencial de membrana. Y son el tema de estudio de esta tesis.

a. Potencial de membrana y potenciales de acción

Como consecuencia de la acción conjunta de transportadores que generan gradientes, y de canales iónicos, que ayudan a mantener esos gradientes o en otros casos, los disipan, se establecen condiciones iónicas asimétricas entre el medio interno celular y el exterior. El resultado final es que se establece un gradiente electroquímico. En la **Tabla 1.1** se muestran las concentraciones de los principales iones dentro y fuera de una célula muscular de mamífero (Alberts et al., 2017; Boron F., 2012).

| Ion (X)                 | [X] <sub>externa</sub> (mM) | [X] <sub>interna</sub> (mM) |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>K<sup>+</sup></b>    | 4.5                         | 155                         |
| <b>Na<sup>+</sup></b>   | 145                         | 12                          |
| <b>Cl<sup>-</sup></b>   | 116                         | 4.2                         |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>  | 1.0                         | 1x10 <sup>-4</sup>          |
| <b>HCO<sup>-3</sup></b> | 24                          | 12                          |

**Tabla 1.1 Concentraciones iónicas del medio interno celular y externo en células del músculo esquelético de mamíferos.** Tomado de (Boron F., 2012).

Desde el punto de vista energético, al observar la **Tabla 1.1** es evidente que para cada ion hay una cantidad de energía potencial con dos componentes, químico y eléctrico. El componente químico corresponde a la diferencia de concentración entre ambos lados de la membrana, mientras que el eléctrico depende de la carga de cada ion.

Si se toman en cuenta ambos componentes, desde el punto de vista cuantitativo se tiene el potencial de equilibrio de cada ion, como lo indica la **Ecuación 1.1**, mejor conocida como la ecuación de Nernst (Alberts et al., 2017; Boron F., 2012; Hille, 2001).

$$V_{eq} = \frac{RT}{ZF} \left( \ln \frac{[X]_{ext}}{[X]_{int}} \right) \quad \text{Ecuación 1.1}$$

En donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, Z es la valencia del ion y F es la constante de Faraday.  $V_{eq}$ , mejor conocido como potencial de equilibrio es la función resultante de la diferencia de concentración del ion en cada lado de la membrana, con respecto al exterior. Asimismo, si en una célula se manipula el  $V_{eq}$ , la distribución del ion cambiará (Alberts et al., 2017; Boron F., 2012; Hille, 2001).

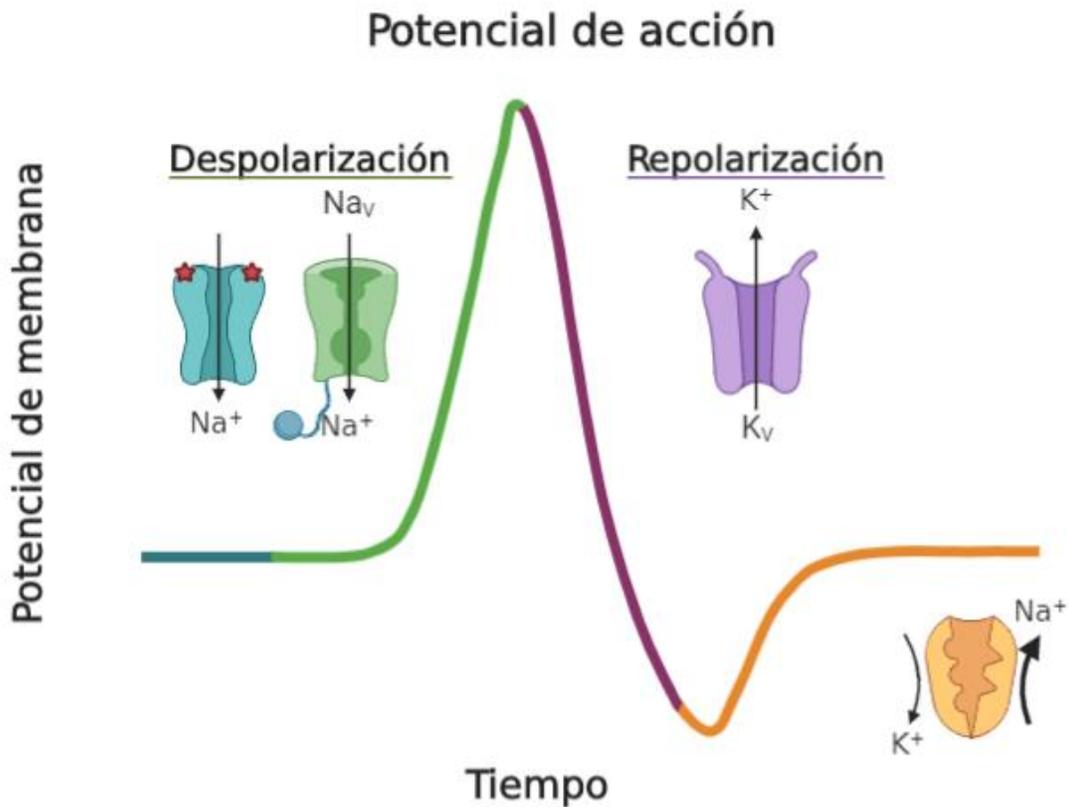
Ahora, tomando en cuenta que en las células hay más de un ion permeante, el potencial resultante de la distribución de iones es el potencial de membrana o  $V_{mem}$ , que se describe por la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) en la **Ecuación 1.2** (Alberts et al., 2017; Hille, 2001).

$$V_{mem} = \frac{RT}{zF} \left( \ln \frac{P_K[K]_{ext} + P_{Na}[Na]_{ext} + P_{Cl}[Cl]_{int}}{P_K[K]_{int} + P_{Na}[Na]_{int} + P_{Cl}[Cl]_{ext}} \right) \quad \text{Ecuación 1.2}$$

En la ecuación GHK, las constantes son las mismas que en las de la ecuación de Nernst, pero también se toma en cuenta la permeabilidad de cada ion ( $P$ ). Esto significa que entre más permeable sea un ion, más contribución tendrá para el  $V_{mem}$ . (Alberts et al., 2017; Boron F., 2012).

Normalmente, las células tienen un potencial de reposo aproximado de  $-70$  mV; cuando esta célula es excitable (neurona, miocito, etc.), presentan potenciales de acción.

El potencial de acción (PA) consiste en una despolarización, que puede llegar a potenciales de membrana de hasta  $+60$  mV. Durante el PA, así como el regreso al potencial de reposo, varios tipos de canales iónicos activados por voltaje ejercen su función. Por ejemplo, al inicio de un PA, se requiere la entrada de  $Na^+$ , que altera muy poco la concentración en cada lado de la membrana, pero lo suficiente como para cambiar el valor de  $V_{mem}$ , este paso depende de canales de sodio activados por voltaje ( $Na_v$ ), además, durante el regreso al potencial de reposo, son imprescindibles ciertos tipos de canales de potasio ( $K_v$ ). Como ya se había mencionado anteriormente, la energía necesaria para abrir un canal iónico es generada por el estímulo y en el caso de los VGC, esta proviene de la despolarización de la membrana (Alberts et al., 2017; Boron F., 2012; Hille, 2001). En la **Figura 1.3** se muestra un esquema de PA con los canales más importantes en cada fase.

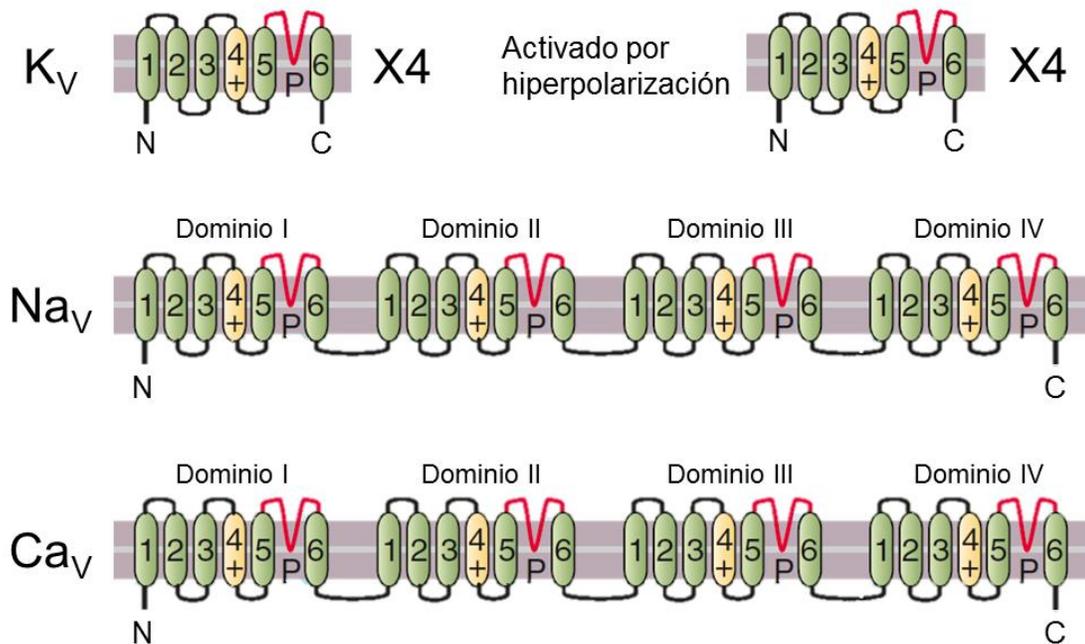


**Figura 1.3. Potencial de acción.** Se muestra un esquema del potencial de membrana de una célula excitable a lo largo del tiempo. En potencial de reposo (azul), de aproximadamente -70 mV hay canales de sodio activados por ligando que desencadenan la activación de otros canales, entre ellos canales  $\text{Na}_v$  (verde). Los  $\text{Na}_v$  hacen el potencial positivo, llegando alrededor de +60 mV. Al llegar a un pico máximo, los  $\text{K}_v$  (morado) se activan para ayudar a restituir el potencial de membrana en reposo hiperpolarizando la célula. Estos canales se cierran y finalmente transportadores como la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa ayudan a restaurar y mantener el potencial de reposo hasta la llegada de un nuevo estímulo. Figura generada en el sitio web Biorender ®.

### 1.3 Canales iónicos activados por voltaje

Dado que el papel de los canales iónicos activados por voltaje es determinante para la generación del PA, se puede decir que su función, desde el punto de vista fisiológico es transmitir información entre las células excitables, como las del sistema nervioso (Alberts et al., 2017; Boron F., 2012).

Como se muestra en la **Figura 1.4**, los  $K_V$  y algunos canales activados por hiperpolarización son monómeros que se asocian en la membrana, mientras que los canales de sodio y de calcio son un solo polipéptido que tiene 4 dominios. Cada dominio es equivalente al monómero de los  $K_V$ , pero están unidos por asas intracelulares. (Bezanilla, 2000, 2008; Catterall, 2010).



**Figura 1.4. Topología de VGCs.** Se muestran modelos de la organización estructural de VGCs. Cada pase transmembranal está enumerado, el asa reentrante del poro se muestra en rojo mientras que el S4 en amarillo. El signo (+) indica conservación de aminoácidos positivos. Modificado de (Boron F., 2012). Muchos de los canales iónicos activados por voltaje presentan una arquitectura similar. Suelen ser tetrámeros. La mayoría, que a partir de ahora se llamarán canónicos, tienen seis pases transmembranales (S1-S6) por cada monómero y tienen funciones compartimentalizadas. Los extremos amino y carboxilo terminales se encuentran en el citosol.

En cuanto a los dominios funcionales, el dominio sensor de voltaje (VSD) se conforma por los pases S1 a S4 mientras que el dominio de poro se conforma por S5, S6 y el asa reentrante de poro que está intermedia entre los dos últimos. Dependiendo de cada canal, los extremos terminales pueden servir como sitios de unión para subunidades regulatorias. Los VGC forman tetrámeros que se organizan con los

cuatro dominios de poro al centro de la proteína, mientras que los VSD se encuentran en la periferia, e interactúan con la fase lipídica de la membrana celular (Bezanilla, 2000, 2008; Catterall, 2010).

a. Acoplamiento electromecánico

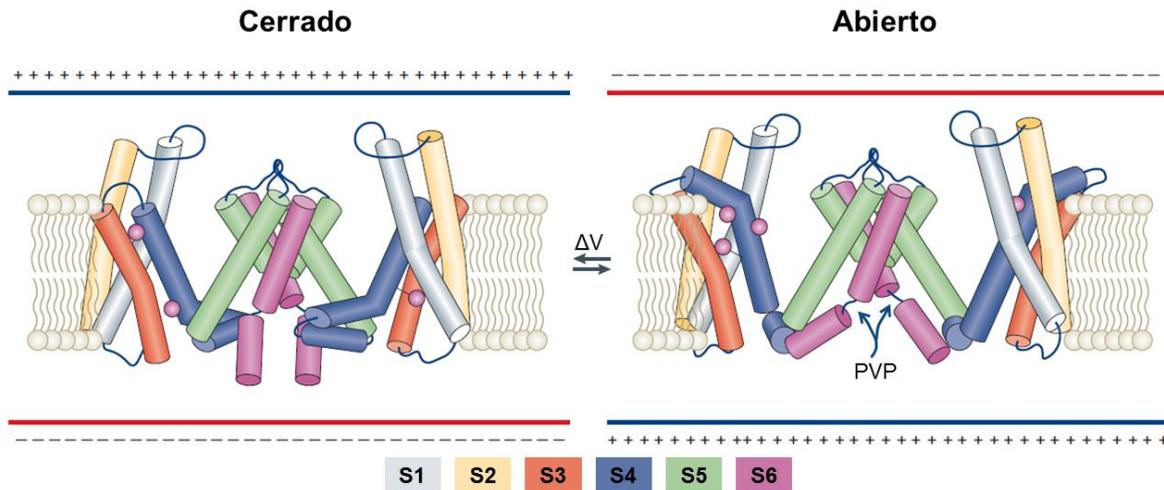
De manera similar a la secuencia firma del filtro de selectividad, los VGC se caracterizan por tener otro motivo conservado en el S4 que consiste en dos aminoácidos neutros (n) y uno con carga positiva, generalmente argininas (R) (nnR), y en algunos casos lisinas (**Figura 1.4**). Son justamente estas argininas o lisinas, las que permiten que los VGC puedan responder a cambios de voltaje. Por lo general hay 3-7 repeticiones del motivo nnR (Bezanilla, 2000, 2008), pero esto puede variar de un canal a otro

En su estado cerrado, los VGC tienen a S4 en una posición que tiende a ser intracelular dentro de la membrana plasmática. Las argininas están estabilizadas en esta posición debido a que la localidad de la membrana en potencial de reposo es negativa y por lo tanto hay atracción entre cargas. Adicionalmente, S4 está interactuando con el dominio del poro por medio de contactos con la hélice intracelular que conecta a S4 con S5. Al mismo tiempo, este *linker* S4-S5 interactúa con S6 en múltiples contactos. Otro motivo conservado en los canales es el de prolina-valina-prolina (PVP), que se encuentra en el extremo intracelular de S6, y es el que genera un quiebre en la hélice, haciéndola flexible (Bezanilla, 2000; Catterall, 2010; Rudy et al., 2009).

Como resultado de un cambio de potencial, como en el PA, se invierte el valor del potencial electrostático, por lo que S4 ya no es estable en la posición intracelular, pero sí en la posición extracelular, y entonces S4 se mueve al extremo extracelular de la membrana. Cuando S4 se mueve a la posición extracelular, rompe contactos con el *linker* S4-S5, y acto seguido S6 ya no interactúa igual con este mismo linker. Finalmente, la hélice flexible de S6 permite que el poro se abra y comience a permear iones.

Durante la apertura del poro, la organización de las hélices que forman una especie de cono, que permite que se forme una hendidura de agua tanto en el lado extracelular como en el intracelular. Este fenómeno se denomina acoplamiento electromecánico,

debido a que S4 acopla los cambios del potencial de membrana con los movimientos del canal para abrir el poro. Este acoplamiento ocurre en canales canónicos activados por voltaje, con ciertas variaciones. En la **Figura 1.5** se ilustra un modelo de acoplamiento electromecánico en el canal de potasio activado por voltaje Shaker.



**Figura 1.5. Acoplamiento electromecánico en canales activados por voltaje.** Se muestran dos subunidades del canal Shaker. En estado cerrado se aprecia al segmento 4 en posición intracelular o inactiva, con las argininas (esferas moradas) dirigidas al lado intracelular. El segmento intracelular de S6 mantiene contacto con S4. Cuando la membrana se despolariza, en estado abierto S4 se activa, las argininas se mueven al lado extracelular y ya no interactúa con S6, esto desencadena la apertura del poro. Modificado de (Bezanilla, 2008)

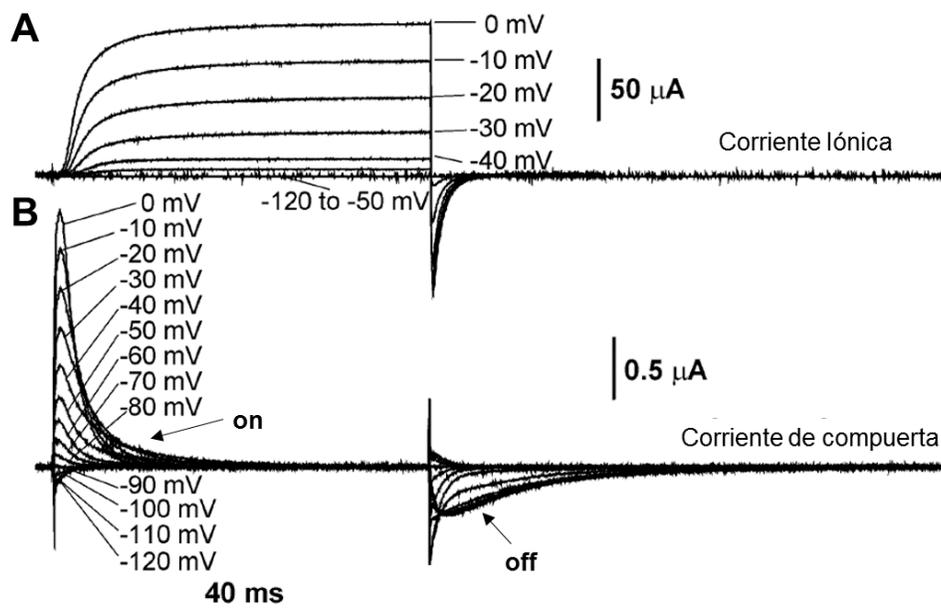
Adicionalmente, dependiendo de las repeticiones nnR, y de otras variaciones estructurales, cada canal responde a diferentes rangos de potenciales de membrana para llegar a su conformación abierta. El que cada canal responda de manera diferente al potencial de membrana permite que las células excitables tengan diversidad en la forma y frecuencia del PA (Bezanilla, 2000, 2008; Rudy et al., 2009) .

b. Corrientes de compuerta

Otra consecuencia del movimiento del S4 durante la activación de los canales iónicos es un movimiento de carga, debido a que las R se mueven a través de la membrana. Este movimiento de carga o de compuerta es previo a la apertura del poro, y dado que cada canal mueve entre 6 y 12 cargas elementales, esta es despreciable comparada

con la magnitud de la corriente iónica que pasa a través del poro (Bezanilla, 2005; DeCoursey, 2013; Whicher & MacKinnon, 2016).

En la **Figura 1.6** se pueden apreciar tres cosas. La primera es que la corriente de compuerta es más chica que la corriente iónica. Esta diferencia entre la corriente iónica y la de compuerta puede alcanzar un factor de hasta 10000. La segunda es que el movimiento de S4 es pequeño y está limitado por la membrana, por lo que se dice que la corriente de compuerta es transitoria. Cabe destacar que hay un movimiento denominado “on” durante la apertura y otro denominado “off”, durante el cierre del canal. En tercer lugar, es importante destacar que primero ocurren los cambios conformacionales del VSD, por lo que a potenciales muy negativos (-120 a -50 mV) hay corrientes de compuerta, pero no corriente iónica por que el poro tiene una probabilidad muy pequeña de apertura a esos potenciales. Esto es más evidente al graficar la corriente de compuerta y la conductancia normalizadas, como se muestra en la **Figura 1.7**.

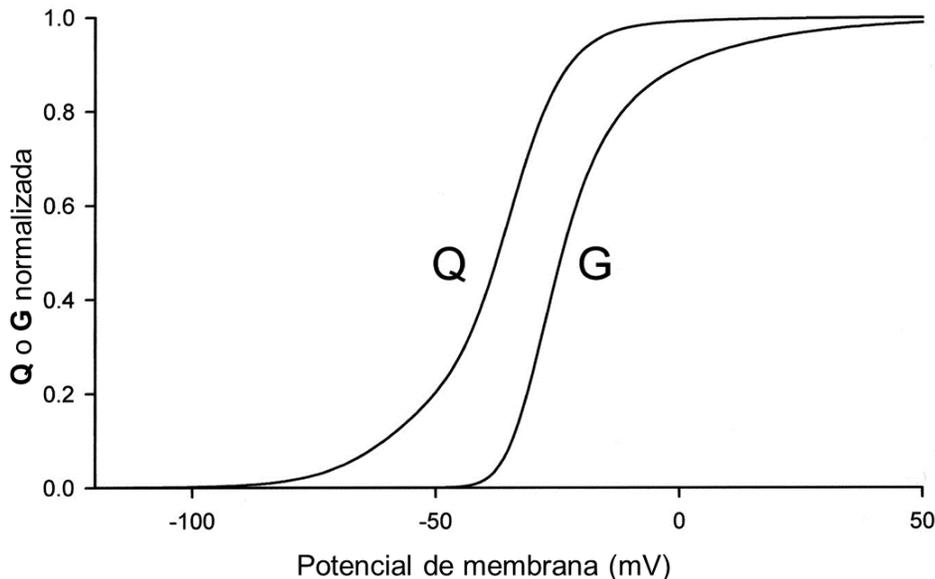


**Figura 1.6. Corriente iónica vs corriente de compuerta.** Se muestran corrientes del canal de potasio Shaker con su respectivo voltaje de registro. **A.** Se muestran corrientes de potasio. **B.** Corrientes de compuerta. Se indica la corriente de apertura (on) y de cierre (off). Nótese que a potenciales negativos hay pequeñas corrientes de compuerta negativas. Modificado de (Bezanilla, 2005).

### c. Medición de corrientes de compuerta

La medición de las corrientes de compuerta permite estimar cómo son los cambios conformacionales del canal durante su apertura. Para ello, se necesita bloquear la corriente iónica que pasa a través del poro. Esto puede hacerse al quitar el ion permeante de las soluciones de registro, otra opción es tapar al poro con bloqueadores específicos o debido a mutaciones en el canal para abolir la función del poro.

Una vez que se obtienen corrientes de compuerta, se integra el área bajo la curva para obtener el movimiento de carga (Bezanilla, 2000, 2005, 2008). Con el movimiento de carga se pueden obtener curvas carga-voltaje o QV, como se muestra en la **Figura 1.7**.



**Figura 1.7. Corriente de compuerta (Q) y conductancia (G) normalizadas y graficadas contra su respectivo voltaje.** Modificado de (Bezanilla, 2000).

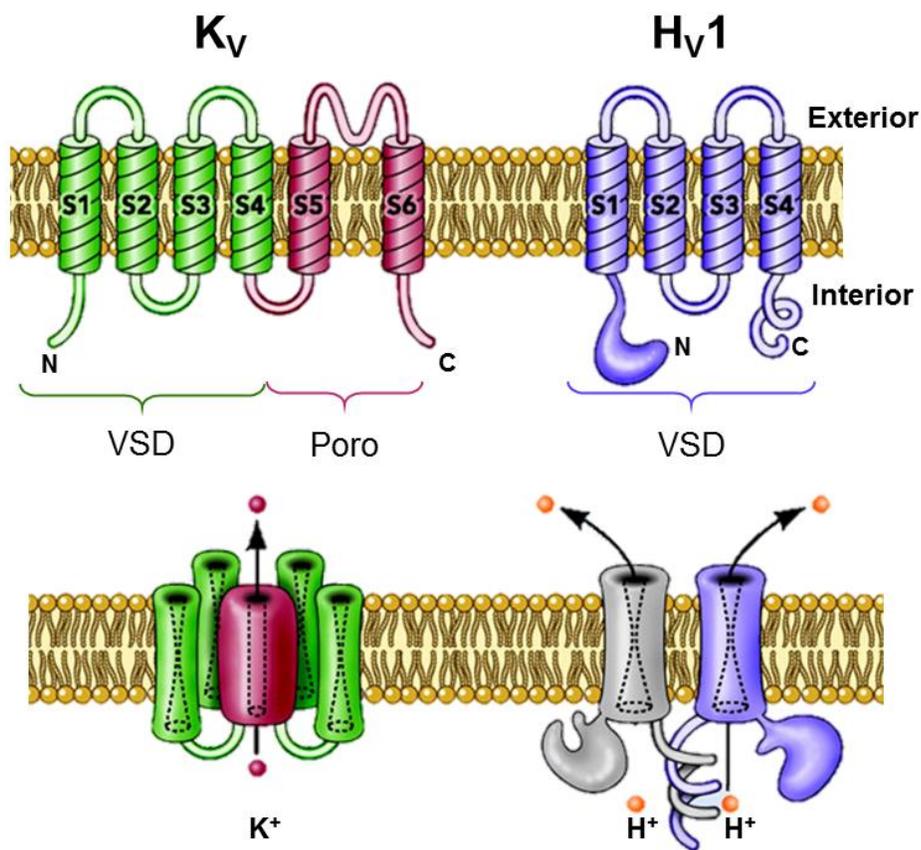
## 1.4 El canal permeable a protones Hv1

A diferencia de los canales canónicos activados por voltaje, como los Kvs, Hv1 es un VGC con varias características que lo hacen diferente.

La primera es que puede funcionar como monómero y se ha visto que el carboxilo terminal, ubicado en el lado intracelular permite la formación de una estructura coil-coil

entre los carboxilos terminales, que sirve para que Hv1 forme dímeros, y no tetrámeros como en el caso de los canales canónicos. Esto depende de cada especie (Bezanilla, 2008; DeCoursey, 2013).

La segunda diferencia de Hv1 con respecto a otros VGC es que cada monómero tiene únicamente 4 pases transmembranales, tal como se muestra en la **Figura 1.8**. Estos 4 pases tienen conservación de aminoácidos con el dominio sensor de voltaje de canales canónicos. Además, Hv1 solamente tiene 3 argininas en S4 (Ramsey et al., 2006).



**Figura 1.8. Hv1 vs VGCs canónicos.** Modelos de Hv1 y Kv en forma de monómero y en forma activa. En un canal canónico como un Kv, al activarse se forma un poro (rosa) con el VSD en la parte externa del canal (verde). En Hv1 se aprecia la formación de un dímero con un poro en cada VSD, así como la estructura coil-coil en los N-terminal. Los VSD de Kv y Hv1 son equivalentes en secuencia y estructura. Modificado de (DeCoursey, 2013).

En varios estudios se ha visto que con ciertas mutaciones del VSD de canales canónicos se induce una corriente que no pasa a través del poro, sino por el VSD (Gamal El-Din et al., 2010; Starace & Bezanilla, 2004). Esta corriente que no pasa a través de un poro canónico, se denomina corriente omega. En otras palabras, ya que Hv1 es un canal cuyo ion permeante no pasa a través de un poro canónico, si no a través del VSD se considera que es un sensor de voltaje con corriente omega (Decoursey, 2015; DeCoursey, 2018; Ramsey et al., 2010).

La tercera diferencia es que, ya que el VSD es el encargado de permear protones, cuando Hv1 está en forma de dímero, hay una corriente de protones en cada VSD, a diferencia de canales canónicos en los que solamente hay una corriente de iones por cada canal (Tombola et al., 2008).

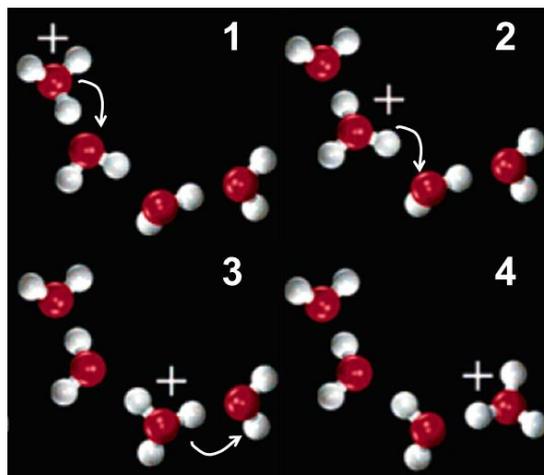
Se ha encontrado que Hv1 se expresa en diferentes organismos, desde dinoflagelados, invertebrados hasta en seres humanos (Decoursey, 2015). Además, está presente en todo tipo de células, como ovocitos (Smith et al., 2019), epitelios de vías aéreas (Fischer et al., 2002) e incluso en células del sistema inmune (Okochi et al., 2009). De hecho, una de las funciones mejor descritas de Hv1 es en los fagosomas de células fagocíticas. Durante la fagocitosis se producen radicales libres que podrían provocar que los fagosomas tengan un potencial de membrana, así como fuerza osmótica. Hv1 transporta protones al interior de dicho fagosoma. Su función en este proceso es neutralizar los efectos que puedan tener los radicales libres del fagosoma. (Decoursey, 2015; Rebolledo et al., 2012). Además, Hv1 también está sobre expresado en algunos tipos de cáncer (Bare et al., 2020; Reshkin et al., 2014); ya que ayuda a mantener un pH intracelular adecuado (Kim & Dang, 2006; Prevarskaya et al., 2010). En resumen, la importancia fisiológica de Hv1 radica en regular el pH de las células. (Decoursey, 2015; Ramsey et al., 2010).

#### a. Mecanismos propuestos para la permeación de protones

Al no tener un poro canónico, algunos trabajos se han enfocado en describir el mecanismo de permeación de protones de Hv1. En el caso de los VGC canónicos, el ion a transportar entra al filtro de selectividad e interactúa con varios sitios hasta llegar al otro lado de la membrana. Sin embargo, hay suficiente evidencia que apunta a que

este mecanismo no aplica para la permeación de protones en Hv1 (Ramsey et al., 2010; Rudy et al., 2009).

Normalmente en soluciones acuosas, el agua está en un equilibrio químico entre  $H_2O$ ,  $H_3O^+$  (hidronio),  $H_5O_2^+$  (Zundel) o  $H_9O_4^+$  (Eigen) y otras formas iónicas del agua, por lo que los protones realmente nunca están libres, si no interactuando con alguna molécula de agua y saltando de una a otra. Este equilibrio está determinado por el pH, a mayor pH hay menos moléculas de agua ionizadas; mientras que a menor pH la frecuencia de formas ionizadas del agua aumenta debido a una mayor concentración de protones (Cukierman, 2003; Swanson et al., 2007). Este movimiento de protones entre moléculas de agua se conoce como mecanismo de Grotthus, como se indica en el **Figura 1.9** y es justamente el que se propone para la permeación de protones a través Hv1. En otras palabras, se piensa que, a diferencia de canales canónicos, en el que el mismo ion se mueve del punto A al punto B a través del poro, Hv1 parece permear protones por medio del mecanismo de Grotthus, en el cual el protón que interactúa de un lado de la membrana no es el mismo que sale del otro lado del poro (Ramsey et al., 2010).

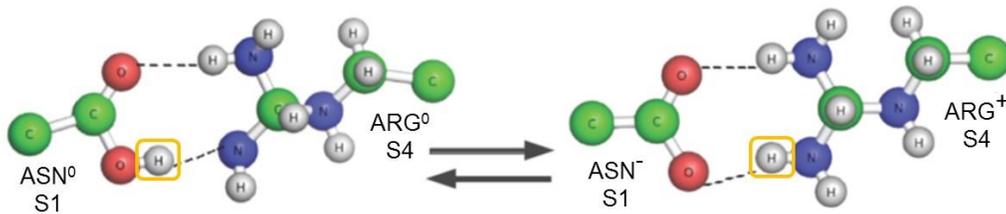


**Figura 1.9. Mecanismo de Grotthus para movimiento de protones en solución acuosa.** Se muestra un modelo tridimensional tres moléculas de agua, con los oxígenos en color rojo y los hidrógenos en blanco. Las flechas indican el salto de protones de una molécula de agua a la siguiente.

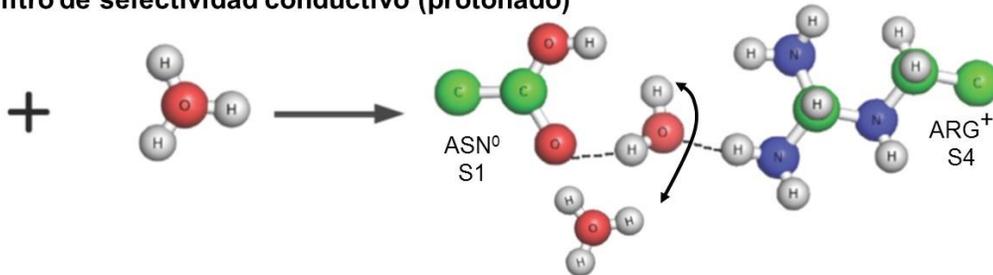
Se ha descrito que otras proteínas de membrana pueden interactuar con protones por un mecanismo de Grotthus (Ludwig, 2003), involucrando cadenas laterales de aminoácidos protonables. Estos aminoácidos protonables tienen un papel parecido al de las moléculas de agua de la solución. No sería sorprendente que Hv1 utilice este mecanismo de Grotthus para permear protones. Teniendo esto en cuenta, un estudio demostró que al mutar los aminoácidos protonables de Hv1 hay algún grado de compensación por el resto de los aminoácidos, incluso con mutaciones dobles (Ramsey et al., 2010). Con el fin de entender mejor estos resultados, se procedió a hacer ensayos de dinámica molecular del canal en estado abierto. Los resultados arrojaron que Hv1 tiene hendiduras de agua más profundas comparado con otros VSDs. Con base en los resultados, se llegó a proponer un modelo en el cual Hv1 puede compensar las mutaciones porque es probable que la presencia de agua en las cavidades del canal forma un “cable” que compensa la falta de las cadenas laterales de los aminoácidos neutralizados, lo que permite que los protones permeen como si no existiera la mutación (Ramsey et al., 2010).

El mecanismo de permeación de protones por un cable de agua se ve apoyado por el hecho de que el filtro de selectividad de Hv1 está constituido por la asparagina (N) 112, un aminoácido protonable ubicado a la mitad del S1. Ya que N112 interactúa con R208 (S4) se forma un puente salino. En presencia de moléculas de agua, el puente salino se sustituye por puentes de hidrógeno con el agua y al mismo tiempo se pueden transportar protones. El mecanismo anterior se ilustra en la **Figura 1.10**.

### A. Filtro de selectividad no conductivo



### B. Filtro de selectividad conductivo (protonado)

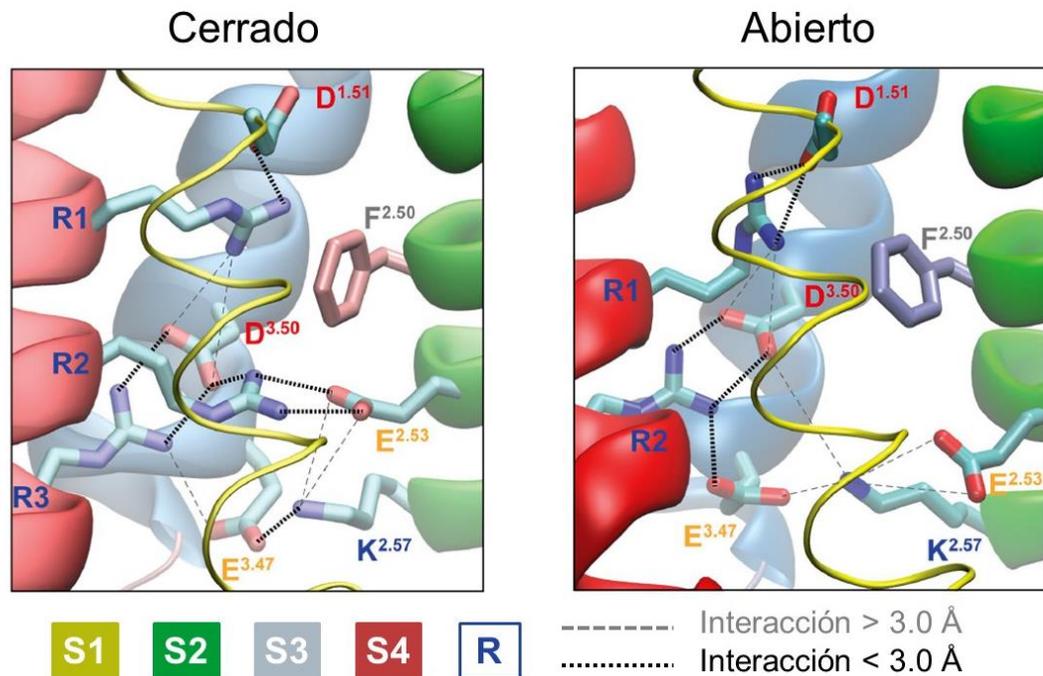


**Figura 1.10. Filtro de selectividad de H<sub>v</sub>1.** Se muestra un modelo de esferas y bastones del filtro de selectividad de H<sub>v</sub>1. **A.** En estado no conductivo, la asparagina 112 y la arginina 208 interactúan por medio de un puente salino. El protón que se muestra dentro del recuadro amarillo oscila entre ambos aminoácidos, manteniendo ambos en forma neutral o cargada. **B.** En estado conductivo, una molécula de agua ionizada interviene en los puentes salinos, formando un puente de hidrógeno en cada aminoácido. Esta molécula de agua abre el filtro y a la vez permite permear protones, ya que permite la continuidad del cable de agua, como se indica con la flecha negra. Modificado de (Decoursey, 2015).

#### b. Interacciones electrostáticas en el VSD de H<sub>v</sub>1

En un trabajo reciente se estudió a H<sub>v</sub>1 en presencia de Zn<sup>+</sup> y en ausencia de este. Lo relevante del estudio para esta tesis es que se evidenció que el Zn<sup>+</sup> cambia la posición de S4 respecto al resto del canal.

Con base en los estudios de dinámica molecular queda claro que dependiendo de la posición de S4, las interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales de las argininas de S4 y el resto de las hélices son diferentes en cada posición. Estas interacciones son puentes salinos y puentes de hidrógeno como los que se muestran en la **Figura 1.11** (V. D. de La Rosa et al., 2018).



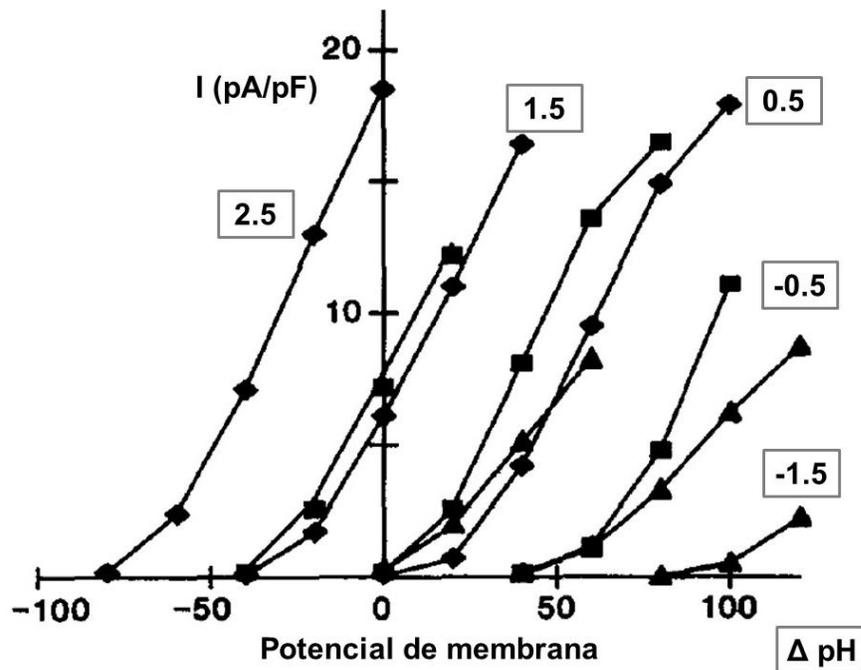
**Figura 1.11. Interacciones electrostáticas en Hv1.** Se muestra una vista lateral de Hv1. Cada hélice se representa con modelo de listón de diferentes colores, a excepción de S1, con el fin de visualizar las cadenas laterales. Las argininas de S4 se señalan directamente sobre la hélice. El resto de los aminoácidos se enumeran de acuerdo con el segmento al que pertenecen. Las interacciones electrostáticas se representan como líneas punteadas, las cuáles cambian entre el estado abierto y cerrado del canal. Esta figura es el resultado de simulaciones de un modelo refinado de Hv1. Modificado de (V. D. de La Rosa et al., 2018).

c. Hv1 está modulado por el gradiente de protones

Las células, además de regular la concentración de sales como  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , también establecen un gradiente de protones. Este gradiente se conoce como  $\Delta\text{pH}$ , que se calcula restando el pH interno del pH externo (Cherny et al., 1995). Este gradiente es consecuencia del metabolismo celular, y en condiciones fisiológicas normales, su valor no rebasa una unidad; sin embargo, en condiciones como cáncer o isquemia el  $\Delta\text{pH}$  puede llegar a ser de hasta 1.5 (Andersen et al., 2014).

La cuarta característica distintiva de Hv1 es que además de que es activado por voltaje, el  $\Delta\text{pH}$  puede modificar el rango del voltaje de activación del canal (Cherny et al., 1995). A  $\Delta\text{pH}$  positivos, el voltaje de activación de Hv1 es más negativo que a  $\Delta\text{pH}$  negativos. Esto significa que, entre más ácido sea el pH interno, Hv1 se abrirá a

potenciales más cercanos al de reposo y cuando el pH externo es más ácido, se necesitarían voltajes más positivos para abrir el canal, como se muestra en la **Figura 1.12**. Esto tiene sentido desde el punto de vista fisiológico, ya que las células requieren pH internos cercanos a la neutralidad (7.2 a 7.5) y Hv1 tiene corrientes salientes, esto es conveniente ya que el metabolismo celular tiende a acidificar el citosol. La excepción a la regla es en la especie *Karodinium veneficum*, un dinoflagelado que mantiene un pH bajo en las vesículas; esto desencadena una reacción de bioluminiscencia y, por lo tanto, Hv1 produce corrientes entrantes (DeCoursey, 2018).

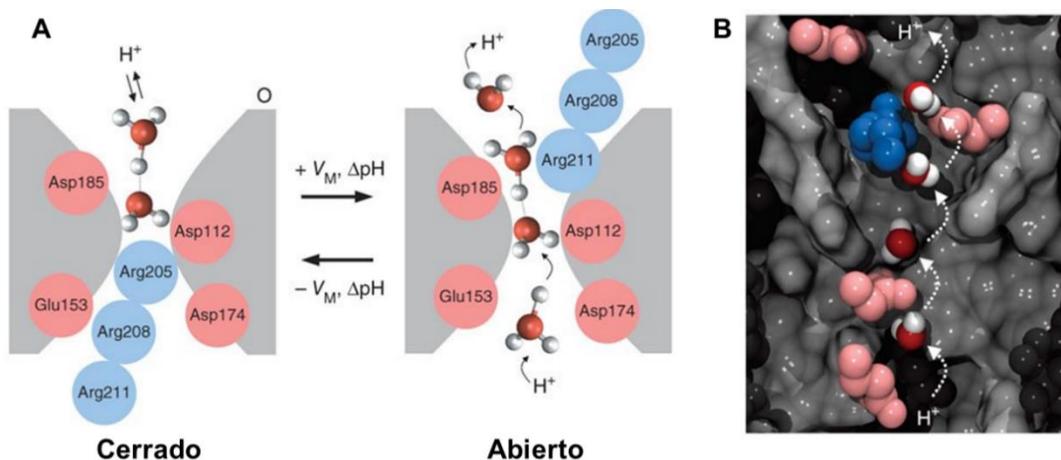


**Figura 1.12. Modulación de Hv1 por  $\Delta\text{pH}$ .** Se grafican las curvas GV de Hv1 registrado en diferentes valores de  $\Delta\text{pH}$ , indicado en el recuadro gris. Se observa claramente que por cada unidad de  $\Delta\text{pH}$  el voltaje medio de activación se corre alrededor de 40 mV. Modificado de (Cherny et al., 1995).

Todavía no se ha descrito el mecanismo preciso de cómo es que Hv1 puede estar modulado por el gradiente de protones, sin embargo, se ha propuesto que la presencia de cavidades de agua, junto con ciertos aminoácidos protonables podrían estar mediando este sensor de pH. Para entenderlo se deben tomar en cuenta varias cosas que suceden simultáneamente:

- 1) Las moléculas de H<sub>2</sub>O que están en las cavidades del VSD de Hv1 tienen un equilibrio químico que cambia dependiendo del pH. A mayor pH, menos probabilidad de ocupación de H<sub>3</sub>O (y otras formas ionizadas del agua) y caso contrario con pH bajo, en el cual abundan moléculas de agua ionizadas.
- 2) Las cadenas laterales de los aminoácidos cargados dentro del VSD que están en contacto con las moléculas de agua cambian su estado de ionización dependiendo del pH. Esto significa que se pueden romper las interacciones de los puentes de hidrógeno o de los puentes salinos, ya sea aminoácido-aminoácido o H<sub>2</sub>O-aminoácido.
- 3) La estabilidad de la posición de S4 que depende del voltaje también debe estar influenciada por las interacciones electrostáticas antes mencionadas, dando como resultado que el VSD cambie a diferentes voltajes, dependiendo del gradiente de pH. Este modelo se ilustra en la **Figura 1.13**.

En pocas palabras, Hv1 tiene un sitio de unión difuso para protones que le permite cambiar la estabilidad de S4. Simultáneamente, la probabilidad de que el VSD pase a su estado activado está en función del potencial de membrana. Aunque este modelo se ha ajustado a los datos experimentales obtenidos hasta el momento, aún no hay suficiente evidencia que compruebe que esto ocurre así. Dado que Hv1 es un canal activado por voltaje, se esperaría que haya un acoplamiento electromecánico similar al que ocurre en canales canónicos, así que lo ideal sería medir corrientes de compuerta en diferentes gradientes de pH y esto está parcialmente demostrado en el trabajo de (V. De La Rosa & Ramsey, 2018). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que Hv1 es un VSD y un poro a la vez, por lo que, aunque se han podido medir corrientes de compuerta en este canal, no es factible estudiar la modulación por  $\Delta$ pH ya que ocurren varios fenómenos a la vez. Se necesita un modelo en el cual se estudie por separado la modulación por pH de la permeación de protones.

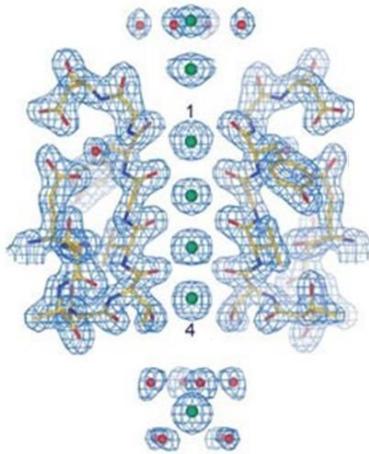


**Figura 1.13. Modelo de modulación por  $\Delta\text{pH}$  en  $\text{Hv1}$ .** **A.** Se esquematiza un canal en estado abierto y cerrado, las argininas de S4 se representan con esferas azules, mientras que las contracargas son esferas rosas. Cuando  $\text{Hv1}$  se abre, S4 sube y los protones permean a través de un cable de agua. La facilidad con la que S4 se mueva a posición extracelular depende de la ocupación de protones en el agua y aminoácidos cargados, modificando así interacciones electrostáticas (consultar Figura 1.11) así como del potencial de membrana. **B.** se muestra un modelo de superficies de  $\text{Hv1}$  con el mismo código de colores y el movimiento de protones se esquematiza con flechas blancas. Modificado de (Ramsey et al., 2010).

## 1.5 Shaker es un $\text{K}_\text{V}$ canónico

Uno de los grupos de VGC mejor descrito es el de los  $\text{K}_\text{V}$ s. Estos son de gran importancia en el sistema nervioso por que participan en la fase de repolarización de la membrana (**Figura 1.3**). Debido a la gran diversidad de proteínas accesorias regulatorias con las que se asocian, permiten que las neuronas tengan diferentes patrones de disparo de PA, que modifican principalmente frecuencia y amplitud. Otra función del extremo amino terminal es tiene un dominio T1 para tetramerización.

Como ya se había mencionado, la secuencia firma del filtro de selectividad de los canales de potasio es TVGYG y puede seleccionar  $\text{K}^+$  por que los grupos carboxilo de la cadena principal están expuestos al interior del filtro. Ya que las cargas del filtro son parcialmente negativas, se puede simular un estado de hidratación similar al que tiene el potasio cuando está disuelto en agua, como se muestra en la **Figura 1.14**. (Frolov et al., 2012; Rudy et al., 2009).

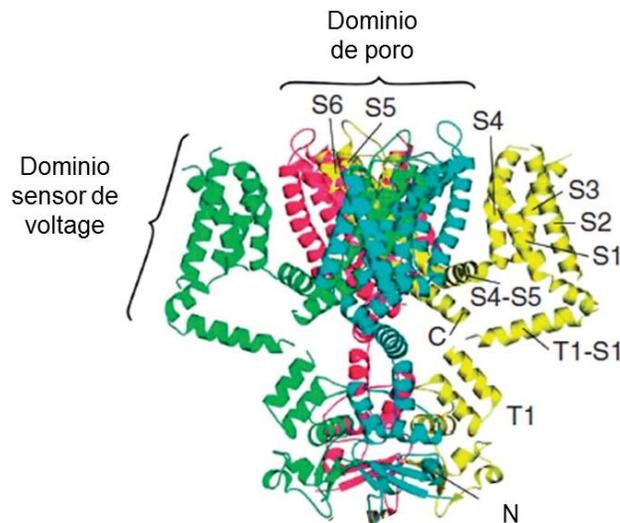


**Figura 1.14. Filtro de selectividad de  $K_V$ s.** Se muestra un modelo cristalográfico con su respectiva densidad electrónica. Los iones potasio se esquematizan como esferas verdes, los grupos negativos de los aminoácidos se muestran en color rojo, mientras que los positivos en azul. Se aprecia que los iones próximos a entrar al filtro están hidratados. Los números indican los sitios de unión para potasio. El modelo es del canal bacteriano KcsA, PDB 1K4C. Modificado de (Zhou et al., 2001).

La estructura completa del canal  $K_V$  1.2 se muestra en la **Figura 1.15**, en la cual se aprecian las características generales de los canales selectivos a potasio.

Los canales de potasio activados por voltaje se han clasificado en tres familias funcionales. Las familias KCN y EAG se caracterizan por activarse lentamente en comparación con la familia  $K_F$  (activados rápidamente, por sus siglas en inglés). Dependiendo de la identidad de secuencia, se han establecido 9 subfamilias. La familia  $K_F$  incluye las subfamilias  $K_V$  1- $K_V$  6,  $K_V$  8 y  $K_V$  9. La familia  $K_V$ 1 tiene 8 genes identificados ( $K_V$  1.1 - $K_V$  1.8) y también se conoce como la familia Shaker (Rudy et al., 2009).

El canal Shaker es un canal canónico que permea potasio. Fue descrito por primera vez en la mosca *Drosophila melanogaster*, cuya mutación producía un comportamiento con movimientos repetitivos y es un canal que se ha estudiado ampliamente.



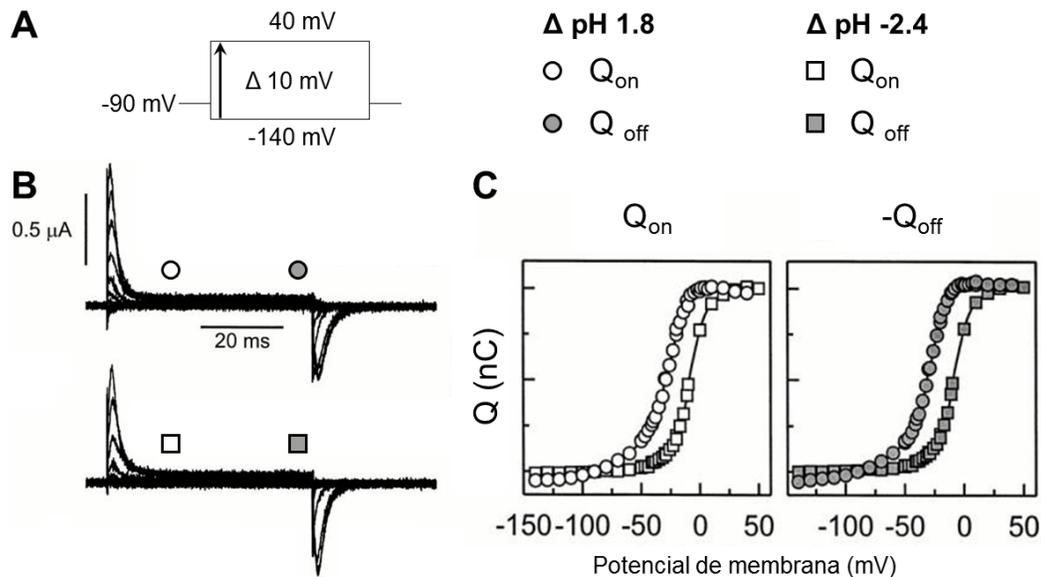
**Figura 1.15. Estructura de Kv 1.2.** Cada subunidad se marca con diferente color. Se aprecia claramente que los VSD se ubican en la parte externa del canal, interactuando con la membrana plasmática, mientras el poro se encuentra en la parte central. El dominio T1 para tetramerizar está en el lado intracelular de la membrana plasmática y en el extremo del amino terminal se unen proteínas accesorias (no mostradas en esta figura). Modificado de (Rudy et al., 2009).

a. Shaker es un buen modelo para medir corrientes de compuerta

Una de las mutaciones mejor estudiadas en el canal Shaker ha sido W434F, que se ubica en el asa del poro. Esta mutación induce una inactivación ultra rápida del canal, por lo que no presenta corriente iónica. La ventaja del estudio de esta mutante es que permite medir corrientes de compuerta. Además, se ha demostrado que los cambios conformacionales del canal no se ven afectados, es decir, permite que el acoplamiento electromecánico ocurra normalmente. Por lo anterior, Shaker W434F es un buen modelo para estudiar corrientes de compuerta (Perozo et al., 1993).

Uno de los casos en los que se estudió a Shaker W434F como modelo fue en el trabajo de Starace y Bezanilla, en el cual usaron esta variante no conductiva para añadir la mutación R377H, cambiando una de las argininas de S4. Si bien el objetivo del trabajo fue investigar el papel de cada arginina en el movimiento de carga o corriente de compuerta durante la activación del canal, se encontró que la curva QV de esta mutante se recorre a potenciales positivos cuando se establecen diferentes  $\Delta\text{pH}$ , como

se muestra en la **Figura 1.16**. (Starace & Bezanilla, 2001). Cabe destacar que los autores no discutieron mucho acerca del efecto de  $\Delta\text{pH}$  sobre la activación del canal.



**Figura 1.16. Corrientes de compuerta de Shaker W434F-R377H.** **A.** Se muestra el protocolo de registro y las etiquetas respectivas. **B.** Corrientes de compuerta de un mismo ovocito registrado mediante la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos, en diferente  $\Delta\text{pH}$ . **C.** Curvas QV normalizadas,  $Q_{\text{on}}$  corresponde a la apertura mientras  $-Q_{\text{off}}$  al cierre del canal. Nótese que en ambos cuadros hay un claro corrimiento de las curvas en diferente  $\Delta\text{pH}$ . Con  $\Delta\text{pH} -2.4$ , las curvas QV se recorren a potenciales positivos al comparar con  $\Delta\text{pH} 1.8$ . Modificado de (Starace & Bezanilla, 2001).

Posteriormente, el mismo grupo reportó el resultado de la mutación R362H, la R más extracelular de S4, sobre la misma variante Shaker W434F. Los resultados arrojaron que esta mutante produce una corriente omega de protones, es decir, la corriente no pasa por el poro. Dado que la corriente es entrante a potenciales negativos, pero se abole a potenciales positivos, se propuso un modelo en el cual la histidina introducida forma un poro en el dominio sensor de voltaje de Shaker. (Starace & Bezanilla, 2004).

En otro trabajo se estudió el efecto de mutar diferentes aminoácidos de S4 con el fin de averiguar por qué se presentan corrientes omega de protones en el VSD de Shaker. (Gamal El-Din et al., 2010) mutaron en diferentes combinaciones otras argininas de S4 y las sustituyeron por serinas. Descubrieron que al mutar dos argininas consecutivas, se replican las corrientes omega de (Starace & Bezanilla, 2004).

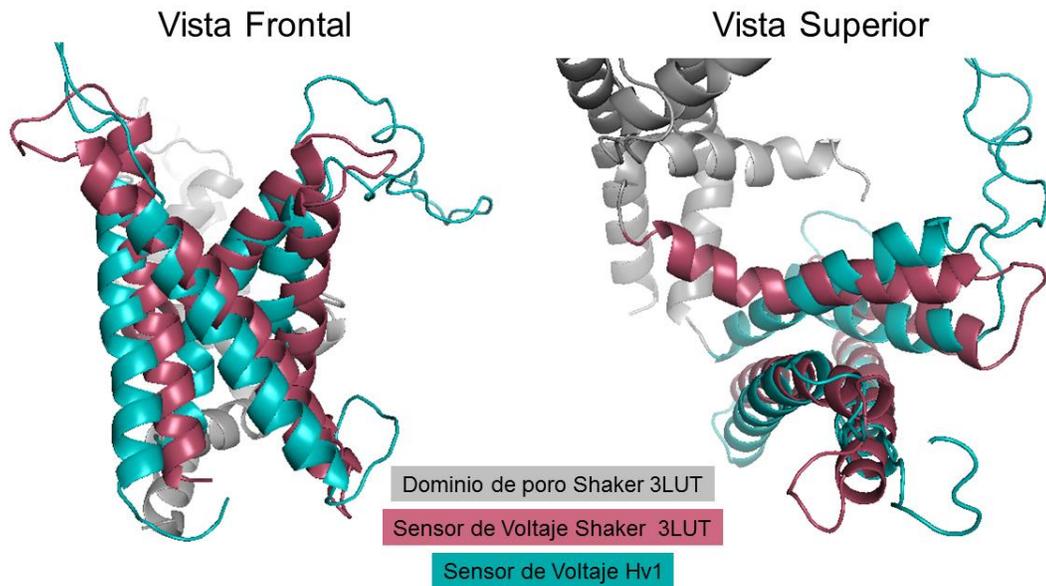
## Planteamiento del problema

Hv1 es un canal conformado por un VSD que tiene corriente omega, por lo que sus cuatro segmentos transmembranales, además de funcionar como un VSD, tienen un poro no canónico. También hay un dominio sensor de pH que hace que por cada unidad de  $\Delta\text{pH}$  el rango de voltaje de activación del canal se mueve 40 mV. Los detalles moleculares del mecanismo de función de este sensor de pH todavía no están completamente descritos (Ramsey et al., 2010). Lo anterior hace difícil estudiar los tres fenómenos en Hv1 no solo por el hecho de que depende de una misma proteína, si no que el mismo ion que permea, es el que modifica el gradiente de pH. Como ya se mencionó, lo ideal sería poder medir corrientes de compuerta en Hv1, sin embargo, esto no es factible metodológicamente, y además probablemente el bloquear la corriente de protones afectaría la función del canal y los resultados no serían del todo confiables.

El que Shaker presente corrientes omega selectivas a protones en su VSD con solamente una o dos sustituciones (Gamal El-Din et al., 2010; Starace & Bezanilla, 2001, 2004) es otra confirmación de que Hv1 es análogo en estructura y secuencia al VSD de canales canónicos (Randolph et al., 2016); tal como se observa en la **Figura 1.17**. Adicionalmente, hay evidencia que sugiere que Shaker podría estar regulado por gradiente de protones de manera similar a Hv1 (Starace & Bezanilla, 2001).

Tomando en cuenta todo lo anterior, Shaker podría ser un buen modelo para estudiar la modulación por pH que ocurre en Hv1, ya que la mutación de Shaker W434F permitiría medir corrientes de compuerta (Perozo et al., 1993) en diferentes gradientes de protones.

Hasta el momento, los resultados sin publicar de dinámica molecular de Hv1 han sugerido qué aminoácidos podrían estar formando el sensor de pH. En Hv1 dichos residuos son D112 en S1, S143 en S2, S181 y D185 en S3, así como N214, del S4. Estos sitios son equivalentes estructurales a Shaker en las posiciones S199 en S1, E242 en S2, Y282 y L286 en S3 y R330 en S4. Esta información proviene de una comunicación directa del Dr. Scott Ramsey (Virginia Commonwealth University).



**Figura 1.17. Alineamiento estructural de Shaker y Hv1.** Se muestra una vista frontal y una superior del alineamiento estructural realizado en Pymol. Tanto Hv1 como Shaker se presentan en estado cerrado. El modelo de Shaker se construyó por homología tomando como base al PDB 3LUT. El modelo de Hv1 se tomó de (Randolph et al., 2016). Adicionalmente, las estructuras de ambos canales se sometieron a un análisis de comparación estructural en el servidor Dalí. Los resultados arrojaron que ambas estructuras tienen un rmsd de 3.4 e identidad de 31%.

# Hipótesis

El VSD de Shaker presenta algún grado de modulación por un gradiente de protones similar al de Hv1 al ser equivalente en secuencia, estructura y función. Si esta modulación ocurre, implicaría dos cosas. La primera es que probablemente todos los VSDs de canales canónicos estén sujetos a esta modulación en algún grado. La segunda es que el sensor de pH putativo de Hv1 (D112, S143, S181, D185 y N214) podría integrarse en la secuencia de Shaker usando las mutaciones S199D, E242S, Y282S, L286E y R330N para estudiar la modulación por pH y entender mejor este fenómeno.

## Objetivo general

Determinar si Shaker es un modelo apto para estudiar la modulación por el pH que ocurre en Hv1.

## Objetivos específicos

- Caracterizar el movimiento de carga del canal Shaker W434F en diferentes gradientes de pH.
- Caracterizar el movimiento de carga del canal Shaker con las mutaciones equivalentes del sensor de pH putativo de Hv1 sobre el fondo Shaker W434F en diferentes gradientes de pH. Esta tesis se enfocará en las mutantes Y282S y L286E del VSD.

## 2. Metodología

Debido a que las corrientes de compuerta son relativamente pequeñas, se requiere hacer mediciones de la mayor cantidad de canales posible. Para ello, los ovocitos de la rana *Xenopus laevis* son ideales, ya que tienen un área de membrana aproximada de 1 cm<sup>2</sup>. El uso de ovocitos implica varios pasos, que incluyen una cirugía para extraer ovocitos, tratarlos con colagenasa para limpiarlos y separarlos e inyectarles RNA mensajero (mRNA) codificante para las diferentes mutantes de Shaker. Después de permitir la expresión del canal en la membrana celular, los ovocitos se registran con la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos para medir la magnitud de la corriente de compuerta. Esta técnica permite controlar el pH de la solución extracelular, y por lo tanto manejar diferentes  $\Delta\text{pH}$ . El análisis de datos comienza con una sustracción de corriente de fuga para obtener la corriente de compuerta, la cual se integra y se grafica contra su respectivo voltaje de fijación. Esta curva QV se interpola para determinar la  $V_{0.5}$  de cada mutante en cada  $\Delta\text{pH}$ . Adicionalmente, a cada corriente de compuerta se le ajusta una ecuación exponencial de decaimiento para estudiar la cinética de activación del canal.

### 2.1 Biología Molecular

La secuencia que codifica para Shaker  $\Delta 4\text{-}29$  W434F está clonada en el plásmido pGEM-A, el cual confiere resistencia a ampicilina y contiene un promotor T7, lo que permite utilizarlo como molde para hacer transcripción *in vitro* del gen de interés. Los residuos 4-29, que se ubican en el extremo amino terminal corresponden a la partícula de inactivación de Shaker, que sirve como “cadena y bola”. Por lo anterior, se deletaron esos residuos y así se evita interferencia por la inactivación del canal.

En colaboración con la Dra. Gisela Edith Rangel Yescas, que funge como Técnico académico del laboratorio, y con la alumna Andrea Alarcón García, se llevaron a cabo los procedimientos de biología molecular necesarios para obtener las mutantes utilizadas en este proyecto. El protocolo para generar las mutantes consiste en una reacción en cadena de polimeraza (PCR) de plásmido completo utilizando como molde

Shaker Δ4-29 W434F-pGEMA y oligonucleótidos 5´ y 3´ que contienen en su secuencia el nuevo codón que permite generar el cambio de aminoácido deseado. La reacción de PCR se llevó a cabo como lo indica el fabricante de la enzima KOD DNA polimerasa (Novagen). En la **Tabla 2.1** se muestran los oligonucleótidos mutagénicos usados.

| Mutante      | Región | Oligonucleótido mutagénico   |
|--------------|--------|--|
| <b>L286E</b> | S3     | 5´ATTCCGTACTTTATAACAG <b>GA</b> AGCGACTGTCGTTGCCGAA3´<br>3´TTCGGCAACGACAGTTCG <b>CTT</b> CTGTTATAAAGTACGGAAT5´ |
| <b>Y282S</b> | S3     | 5´ATAATCGCCATCATTCCG <b>TC</b> CTTTATAAACTAGCGACT3´<br>3´AGTCGCTAGTGTTATAA <b>AGG</b> ACGGAATGATGGCGATTAT5´    |

**Tabla 2.1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para mutar a Shaker.** Estos se diseñaron con ayuda del servidor ExPASy-Translate tool y se sintetizaron en la empresa Sigma. Los nucleótidos marcados en rojo corresponden al triplete modificado con respecto a la secuencia original.

Parte del producto de PCR se analizó en un gel de agarosa 1.2% en buffer TBE 0.5X para confirmar la amplificación del plásmido mutado. Posteriormente, se realizó un tratamiento de la muestra de PCR restante con la enzima DpnI (New England Biolabs) con la finalidad de degradar el DNA molde, ya que este tiene metilaciones, mientras que el DNA mutante sintetizado *in vitro* no, y la enzima de restricción utilizada solamente degrada el DNA metilado. El protocolo de restricción se llevó a cabo como lo indica el fabricante. Una vez terminada la restricción, esta misma muestra tratada con DpnI se usó para transformar bacterias *E. coli* quimiocompetentes de la cepa DH5α y se sembraron en placas de LB con ampicilina (Sigma) (80 µg/mL), manteniendo el cultivo a 37°C por 16 horas. Después de las 16 horas, se seleccionaron dos colonias de cada mutante para purificar el plásmido correspondiente en una miniPrep de acuerdo con (Lezin et al., 2011). Cada plásmido purificado se analizó por medio de secuenciación automática en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Cuando la secuenciación confirmó que la mutación se generó correctamente, se seleccionó la colonia positiva y se volvió a crecer en medio líquido LB-ampicilina, esta

vez para producir suficiente DNA para continuar con la transcripción *in vitro*. De este mismo cultivo se tomaron 700µL para congelar bacterias con el plásmido mutado y así mantener la clona en el laboratorio; el resto del cultivo se procesó con el kit midiPrep (QIAGEN). El plásmido purificado se linearizó con la enzima Not I (New England Biolabs), como lo indica el fabricante. La linearización se confirmó en gel de agarosa. Posteriormente, se hizo transcripción *in vitro* de acuerdo con las instrucciones del kit T7 mMessage mMachine (Ambion). Los mRNAs se analizaron en gel de agarosa 1.2% MOPS 1X y, finalmente se almacenaron a -20°C hasta el día de inyección.

## 2.2 Expresión heteróloga

La expresión heteróloga de los canales mutantes se llevó a cabo en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Los especímenes se sometieron a cirugía para extraer una porción del ovario, el cual se disgregó mecánicamente con pinzas. Posteriormente, las porciones de ovarios se enjuagaron en solución OR2 (**Tabla 2.2**) para después incubarse en colagenasa tipo I (Sigma Aldrich) a una concentración de 1.25 mg/mL durante 30 min. El volumen de reacción varió en función de la cantidad de ovocitos, entre 10 y 15 mL totales. Al terminar la reacción, los ovocitos separados y defoliculados se enjuagaron con solución OR2 y a partir de ese momento se incubaron a 18°C durante 12-24 horas en solución ND96 (**Tabla 2.2**).

| OR2               |                    |
|-------------------|--------------------|
| Sal               | Concentración (mM) |
| KCl               | 2.0                |
| NaCl              | 82.5               |
| HEPES             | 5.0                |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.0                |

| ND96              |                    |
|-------------------|--------------------|
| Sal               | Concentración (mM) |
| KCl               | 2.0                |
| NaCl              | 93.5               |
| HEPES             | 5.0                |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.0                |
| CaCl <sub>2</sub> | 1.8                |
| Piruvato sódico   | 2.5                |
| Gentamicina       | 20 µg/mL           |

**Tabla 2.2. Soluciones para procesamiento e incubación de ovocitos.**

Al acabar el periodo de incubación, los ovocitos en etapas IV y V fueron seleccionados para inyectarles entre 30 y 50 nL de mRNA. El tiempo de expresión varió de acuerdo con la cantidad de mRNA y de la eficiencia de expresión intrínseca de cada mutante. Todas cayeron en un rango de 24 a 48 horas. Por cada día transcurrido, se cambió la solución ND96 de los ovocitos.

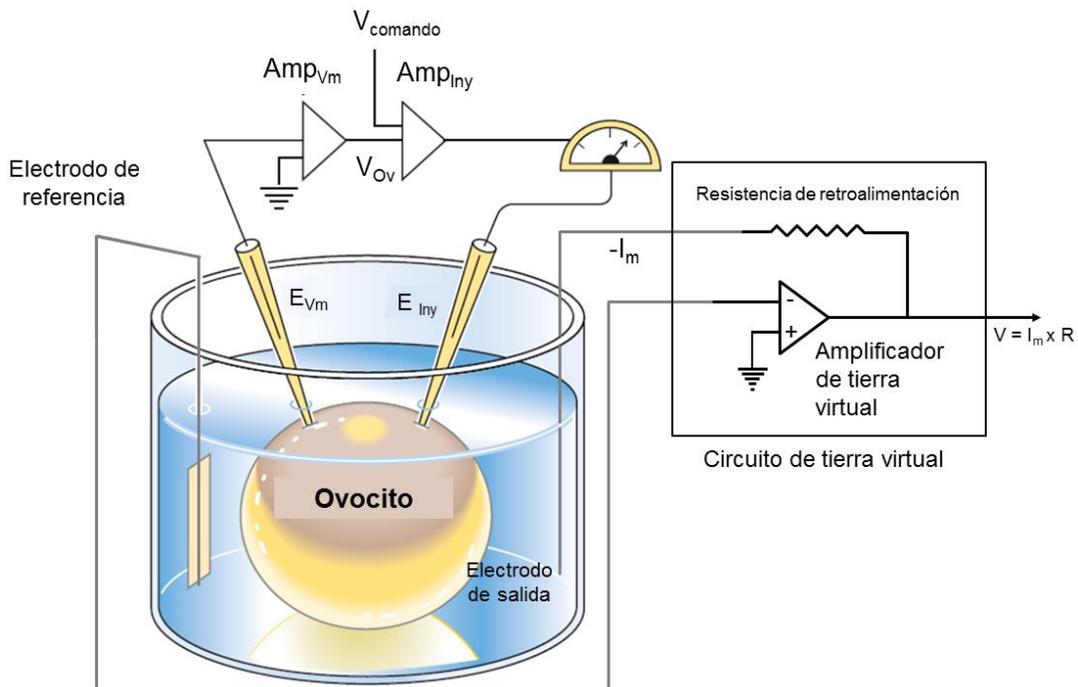
## 2.3 Electrofisiología

La técnica de fijación de voltaje de dos electrodos permite registrar electrofisiológicamente a células grandes como los ovocitos de las ranas *Xenopus laevis*. Para ello, se requiere que ambos electrodos se ingresen al ovocito de manera que se cierra un circuito entre estos dos. Al mismo tiempo, hay otro electrodo en contacto con la solución extracelular, cuya función es proporcionar un valor de referencia con respecto al exterior del ovocito. La ventaja de esta modalidad de registro es que se puede monitorear el potencial de membrana en tiempo real. Cada electrodo tiene una función diferente, mientras el electrodo de medición de voltaje de membrana ( $E_{Vm}$ ) monitorea el potencial de membrana con respecto al baño, el ( $E_{Iny}$ ) sirve para inyectar corriente al ovocito. (Molleman, 2003).

Como se puede apreciar en la **Figura 2.1**, cada electrodo de los que se ingresa al ovocito está conectado a un amplificador. El primero,  $E_{Vm}$  mide el voltaje interno del ovocito y su amplificador correspondiente ( $Amp_{Vm}$ ) compara la lectura respecto al electrodo de referencia. La diferencia de voltaje leída por ese amplificador ( $V_{Ov}$ ) alimenta al  $Amp_{Iny}$ . Este segundo amplificador, además recibe información de un voltaje comando ( $V_{com}$ ) previamente establecido. Este amplificador compara la lectura del  $V_{Ov}$  con el  $V_{com}$ . Si la diferencia es cero, el segundo electrodo,  $E_{Iny}$  no cambia su comportamiento. Cuando la diferencia no es cero,  $E_{Iny}$  inyecta una cantidad de corriente ( $I_m$ ) para compensar esa diferencia. Esta es una manera de puede saber la cantidad de corriente que pasa por los canales iónicos al inyectar una corriente proporcional para mantener el  $V_{com}$  (Hille, 2001).

En otros sets de fijación de voltaje, la medición de corriente se hace mediante un circuito de tierra virtual. En pocas palabras, cuando la corriente de iones pasa a través

de la membrana del ovocito, el potencial de la solución de baño cambia de manera proporcional. Este potencial es medido y comparado con el potencial de tierra a través del electrodo de referencia. Este cambio se compensa mediante una resistencia de retroalimentación que conecta con un electrodo de salida. El electrodo de salida está embebido en el baño, al cual le inyecta una corriente de igual magnitud, pero de signo opuesto. Esta corriente inyectada es proporcional a la que pasa a través de la membrana. El circuito de tierra virtual también se ilustra en la **Figura 2.1**.



**Figura 2.1. Fijación de voltaje de dos electrodos.** Se muestra el circuito eléctrico simplificado de la técnica. Modificado de (Boron F., 2012).

Tomando en cuenta que el pH interno de los ovocitos es aproximadamente 7.5, los  $\Delta pH$  se cambiaron únicamente al variar el pH de la solución extracelular. Para ello, se usó solución ND96 con buffer a una concentración de 10 mM. Para el rango de pH 4.5 a 5.5 se usó el buffer MES (Sigma), para el rango de 5.6 a 7.5 se usó HEPES (Sigma) y para el rango de 7.6 a 10.5 se usó TRIZMA (Sigma). Las soluciones se almacenaron a 4°C con papel para proteger de la luz. Antes de comenzar cada experimento se separó un volumen aproximado de 10 a 20 mL para llevarlo a temperatura ambiente. Una vez que las soluciones se atemperaron, se midió el pH de cada una y de ser necesario, se reajustó con solución HCl o NaOH 1M. El volumen agregado no

sobrepasó 1  $\mu$ L de ácido o base por cada 10 mL de solución de registro. Los protocolos de registro se especificarán en cada experimento. Las pipetas de los electrodos se llenaron con solución KCl a una concentración de 1M.

Debido a que algunos ovocitos presentaron corrientes endógenas, se usó un bloqueador de canales de cloro dependientes de calcio. El ácido niflúmico (NFA) ha sido ampliamente utilizado por su reversibilidad así como su efecto instantáneo en soluciones extracelulares (White & Aylwin, 1990). En los experimentos se usó una concentración de 1 mM en la solución de registro, a menos que se especifique otra cosa.

## 2.4 Adquisición y análisis de datos

Todos los datos se adquirieron mediante el software de uso libre WinWCP 5.5.5. La frecuencia de muestreo fue de 80 KHz. Los datos se filtraron digitalmente con un filtro paso bajo de 8 KHz antes de ser exportados para ser analizados.

### a. Sustracción de componentes lineales

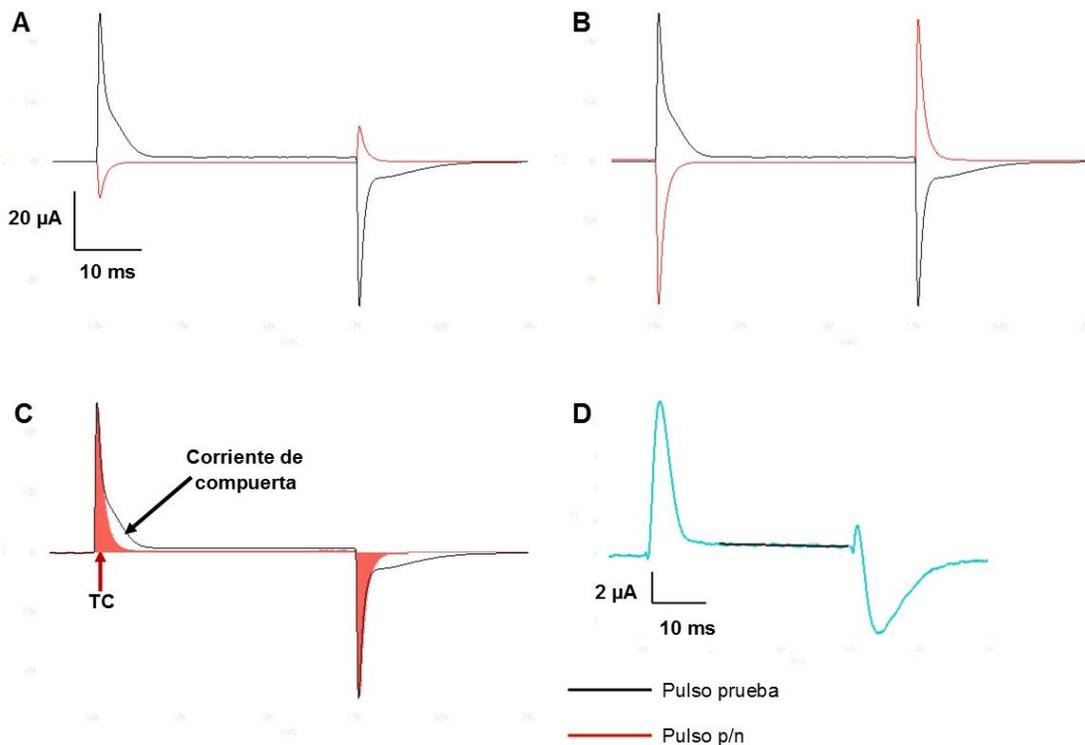
Ya que las corrientes de compuerta tienen el mismo rango temporal que el transitorio capacitivo, durante el registro electrofisiológico se aplicaron protocolos con sustracción de corriente de fuga de  $-p/4$  (Bezanilla, 1977). Este método permite sustraer corriente de fuga, y la corriente capacitiva, que en conjunto se denominan componentes lineales.

Para hacer sustracción de los componentes lineales, al hacer el registro se requiere establecer un protocolo en el cual, por cada pulso prueba se agrega un pulso adicional, el “ $-p/4$ ”, que se refiere a que el pulso prueba se divide entre cuatro y se le añade esa cantidad de potencial. Por ejemplo, para un pulso prueba de -100 mV, se añadieron otros 25 mV al pulso  $p/n$ , por lo que corresponden -125 mV. Esta técnica asegura monitorear la cantidad de corriente de fuga a potenciales más negativos que el pulso prueba, por lo que no habrá corrientes de compuerta.

En la **Figura 2.2** se muestra un ejemplo de cómo se lleva a cabo este proceso cuando se tienen los registros crudos (panel A). El pulso de corriente de fuga o  $-p/n$  se escala al pulso prueba (panel B) y se multiplica por -1 (panel C). La diferencia de área entre

ambos pulsos corresponde a la corriente de compuerta. Durante la adquisición de datos se tomó por triplicado tanto el pulso prueba como el de -p/n que le corresponde, por lo que el análisis de datos se llevó a cabo con el promedio de estos. De esta manera se mejoró la relación señal/ruido.

En muchos casos, los ovocitos presentaron algún grado de corriente endógena a pesar del uso de NFA, por lo que se hizo una sustracción matemática adicional. Para ello, a la corriente de compuerta se le ajustó una línea recta (**Figura 2.2**, panel D). Esta línea recta se usó para construir un rectángulo que se ajustó al curso temporal de la corriente de compuerta. Finalmente, el rectángulo construido se restó a la corriente de compuerta.



**Figura 2.2. Sustracción de componentes lineales de la corriente.** Se muestra el proceso de sustracción en varios pasos. **A.** Datos crudos. **B.** El pulso p/n se escala al valor máximo del pulso prueba. **C.** El pulso escalado se multiplica por -1 para compararlo con el pulso prueba. La diferencia de ambas áreas representa la corriente de compuerta (área blanca), mientras que el transitorio capacitivo (TC) y la corriente de fuga se aprecian en color rojo. **D.** Se muestra una corriente de compuerta (azul) con el ajuste de línea recta para sustraer la corriente endógena.

Una vez que a cada familia de corrientes se le sustrajo la corriente de fuga y de compuerta, se integró el área bajo la curva. Cada integral se midió en el estado estacionario y se graficó contra su respectivo voltaje de registro. Esta gráfica generada es una curva carga contra voltaje (QV).

b. Curvas carga contra voltaje

Considerando el caso en el que un canal tiene solamente un estado abierto y uno cerrado, las curvas QV se ajustan a la ecuación de Boltzmann, a partir de la cual se conocen tres parámetros: la valencia ( $z$ ) que corresponde a la pendiente de la curva; el voltaje medio de activación ( $V_{0.5}$ ), que corresponde al voltaje en el cual la mitad de la carga se ha movido y la proporción de los canales que tienen movimiento de carga a un voltaje dado ( $Q_0$ ). Se incluye la constante de Boltzmann ( $K_B$ ) y la temperatura en Kelvin ( $T$ ). La ecuación de Boltzmann se ilustra en la **Ecuación 2.1**.

$$Q(V) = \frac{Q_0}{1 + e^{-z(V-V_{0.5})/K_B T}} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

En algunos casos, la curva QV se ajusta mejor a los datos experimentales cuando se usan dos Boltzmann a la vez, o mejor dicho dos componentes (**Ecuación 2.2**). La interpretación entre una Boltzmann sencilla o doble se debe tomar con reservas, ya que hay varios modelos posibles. En general, se puede decir que al ajustar una ecuación Boltzmann de un componente, se trata de un canal que pasa la mayor parte del tiempo entre dos estados (abierto o cerrado) o que la transición es de un paso o tiene una carga mayoritaria. Cuando se trata de una doble Boltzmann, el movimiento de carga involucra un acoplamiento de al menos dos pasos. En este caso, hay dos parámetros  $z$ ,  $V_{0.5}$  y  $Q_0$ .

$$Q(V) = \frac{Q_1}{1 + e^{-z_1(V-V_{0.5(1)})/K_B T}} + \frac{Q_2}{1 + e^{-z_2(V-V_{0.5(2)})/K_B T}} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

La medición de corrientes de compuerta y la obtención de curvas QV son útiles para estudiar los mecanismos de modulación de los VGC (V. D. de La Rosa et al., 2018; Hille, 2001).

En este trabajo se encontró que los ajustes pueden variar de una mutante a otra y también con el  $\Delta\text{pH}$ . Las curvas se normalizaron respecto a su valor máximo para poder promediarse. Para volver comparables los datos, a cada curva QV se le hizo interpolación para estimar el valor de la  $V_m$ . Esta  $V_m$  se puede comparar entre WT y las mutantes sin importar el ajuste de la ecuación de Boltzmann que hayan tenido. Los ajustes de la ecuación de Boltzmann se reportarán como  $V_{0.5}$ .

c. Análisis de cinética

Como ya se mencionó, las corrientes de compuerta son transitorias a lo largo del tiempo. Cuando se observan estas corrientes, se puede apreciar una subida abrupta hasta llegar a un máximo, que va seguido de una caída. Esta caída tiene un comportamiento exponencial. Entonces, a cada corriente de compuerta se le puede ajustar la **Ecuación 2.3** en la fase de decaimiento.

$$I(t) = I_{\max}(\exp^{-\frac{t}{\tau}})$$

**Ecuación 2.3**

Donde  $I_{\max}$  es el punto máximo de la corriente de compuerta,  $t$  es el tiempo y  $\tau$  es el tiempo en el cual el 63% de la corriente ha decaído, también conocida como constante de tiempo. La constante de tiempo  $\tau$  de cada corriente se grafica contra el respectivo voltaje de registro para obtener curvas  $\tau$ -V. Con las curvas  $\tau$ -V se puede tener un panorama de la velocidad de movimiento de carga con diferentes potenciales de voltaje y por extensión, la velocidad de activación del VSD y de apertura del canal. Esto resulta útil cuando se quiere valorar si la apertura del canal se ve modificada en diferentes condiciones, por ejemplo, al variar el  $\Delta\text{pH}$  o para comprobar si ciertas mutaciones en el canal pueden afectar la activación de su VSD.

El análisis de la cinética también se llevó a cabo con un ajuste de la de ecuación exponencial, pero directamente sobre la corriente de compuerta después de sustraerle los componentes lineales.

De cada ajuste hecho en cada corriente de compuerta se tomó el valor de  $\tau$  correspondiente. Los datos se promediaron para graficar contra el voltaje de registro

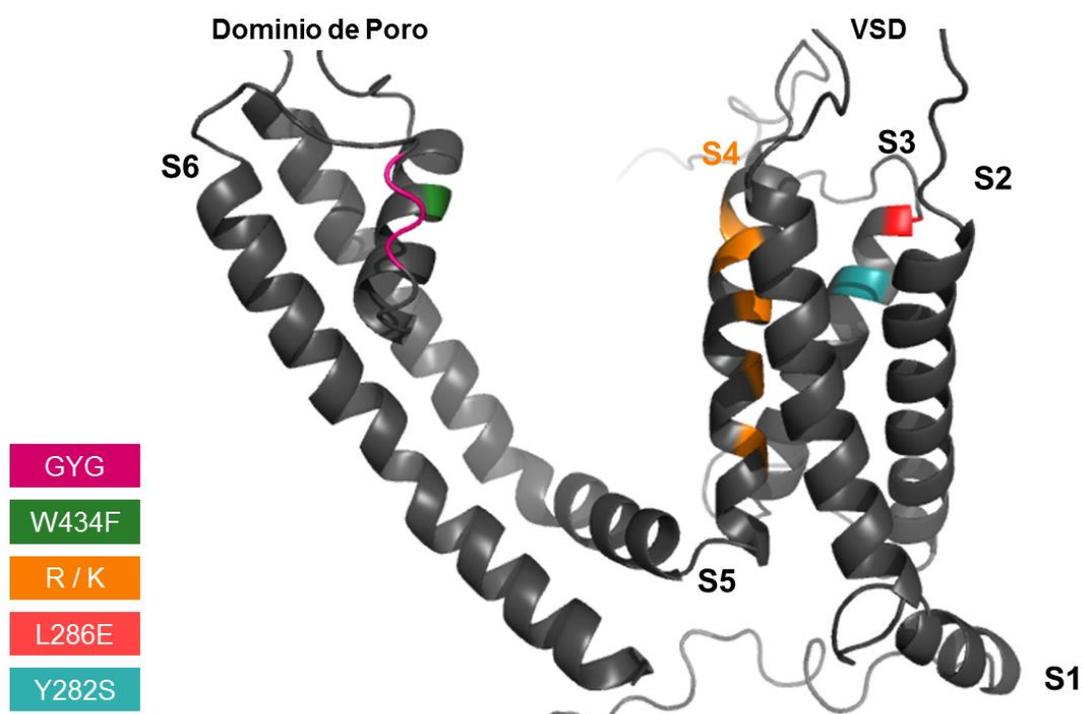
correspondiente. Con esto se generaron curvas  $\tau$ -V de cada mutante en cada  $\Delta\text{pH}$  registrado.

El análisis de las corrientes de compuerta se llevó a cabo usando el software Igor Pro 6.37.

Para el análisis estadístico de las  $V_m$  y las  $V_{0.5}$  así como las  $z$  correspondientes se usó el software GraphPad Prism 6.

### 3. Resultados

La secuencia de aminoácidos del canal Shaker  $\Delta 4-29$  W343F se usó para hacer modelado molecular por homología en el servidor de XPasy SWISS-MODEL. En la **Figura 3.1** se muestra el modelo de la estructura tridimensional -en su estado cerrado- de dicha secuencia. Este modelo se construyó al utilizar como molde la estructura con código PDB 3LUT (Chen et al., 2010). 3LUT es una estructura refinada de otra cristalografía de rayos X, con una resolución de 2.4 Å. El canal original fue el primer Kv de mamífero en ser cristalizado, tuvo una resolución de 2.9 Å. Este fue Kv 1.2, de la especie *Rattus norvegicus* (rata café), (Long, B., Campbell, E., MacKinnon, 2005).



**Figura 3.1. Modelo de la estructura tridimensional de Shaker.** El filtro de selectividad se indica como la secuencia GYG. Las argininas y lisinas de S4 se muestran de color anaranjado. El resto de las etiquetas corresponden a las mutantes registradas en esta tesis.

### 3.1 Caracterización del movimiento de carga de Shaker en diferentes

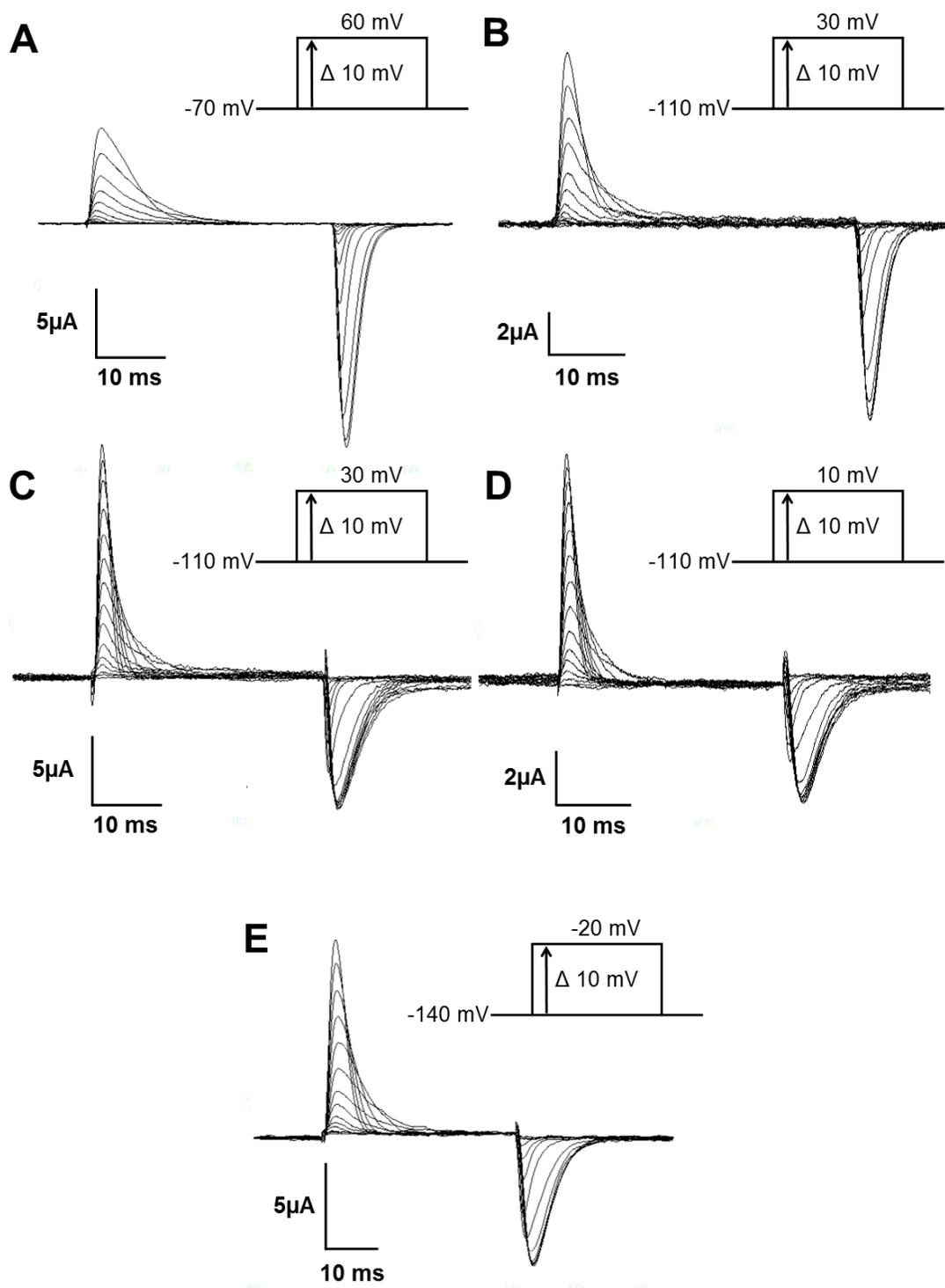
#### $\Delta$ pH

Cabe destacar que los experimentos se realizaron en la mutante de Shaker W434F, en la mutante doble W434F-L286E o W434F-Y282S, pero no en un canal con las tres mutaciones simultáneas. Ambas mutantes del VSD, que son L286E y Y282S se encuentran en el extremo proximal externo de S3. Es importante destacar que las mutantes del VSD, L286E y Y282S se hicieron usando como molde a la construcción Shaker W434F  $\Delta$ 4-29, por lo que ninguna de las mutantes presentó inactivación de tipo N.

Shaker  $\Delta$ 4-29 W434F, que a partir de ahora se denominará WT, por ser silvestre en el VSD, se registró mediante la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos. Como se mencionó en la sección de metodología, esta clona se obtuvo al deletarle los aminoácidos del 4 al 29 a la variante Shaker W434F, para evitar la inactivación lenta del canal. Es importante recordar que Shaker W434F solamente induce el bloqueo en el poro por la aceleración de la inactivación lenta de tipo C y que no afecta la función del VSD (Perozo et al., 1993). Las corrientes de compuerta resultantes representativas de Shaker WT se muestran en la **Figura 3.2**.

Estas corrientes se obtuvieron sin bloquear a los canales de cloro dependientes de calcio con la adición del NFA, ya que los ovocitos no presentaron corrientes endógenas grandes, por lo que pudieron sustraerse matemáticamente como se describe en los métodos. Durante la realización de los experimentos, se comenzó con protocolos de voltaje amplio con el fin de saturar todas las curvas QV. Sin embargo, para lograrlo, se tuvo que modificar el protocolo del  $\Delta$ pH= -3, recorriendo el rango de potenciales a valores más positivos. Esto también pasó con las curvas QV de los  $\Delta$ pH negativos de las mutantes.

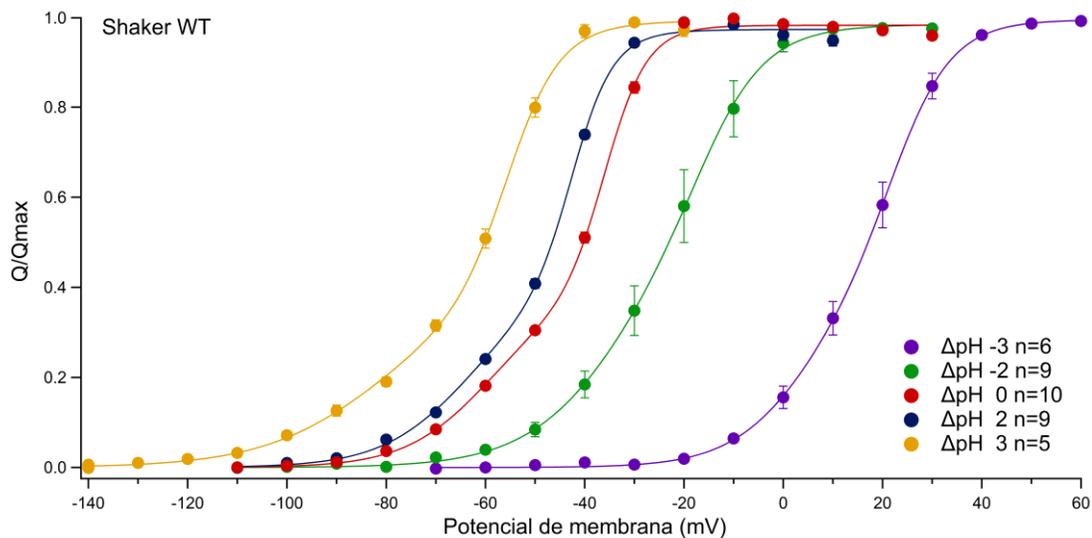
Cabe destacar que tanto para Shaker WT como para las mutantes del VSD tienen curvas QV que se saturan a potenciales más negativos que los que se reportan en los protocolos de voltaje. En esos casos esto es debido a que la QV se recortó para evitar saturar de información a las gráficas y así comparar las QV.



**Figura 3.2. Corrientes de compuerta de Shaker W434F.** Se muestran los trazos representativos de corrientes de compuerta en diferentes  $\Delta\text{pH}$ . **A.**  $\Delta\text{pH} = -3$ . **B.**  $\Delta\text{pH} = -2$ . **C.**  $\Delta\text{pH} = 0$ . **D.**  $\Delta\text{pH} = 2$ . **E.**  $\Delta\text{pH} = 3$ . El protocolo de voltaje se especifica en cada familia de corrientes.

El VSD de Shaker WT presenta cambios en el rango medio de activación de voltaje al cambiar el gradiente de protones. Esto se puede apreciar en la **Figura 3.3**, donde se muestran las curvas QV promedio obtenidas en cada  $\Delta\text{pH}$ . Adicionalmente, a los datos de Shaker WT se les ajustaron ecuaciones de Boltzmann dobles, lo que es consistente con la presencia de múltiples estados conformacionales durante la apertura del canal. Las  $V_{0.5}$  resultantes de los ajustes de la ecuación de Boltzmann fueron diferentes con respecto al  $\Delta\text{pH} = 0$ , estas se muestran en la **Tabla anexa A**.

Adicionalmente, se reportan las pendientes de la curva,  $z$ , resultantes del ajuste respectivo en la **Tabla anexa B**. En el caso de Shaker WT, no hubo cambios significativos en la pendiente al cambiar el gradiente de protones.



**Figura 3.3. Curvas QV de Shaker WT.** En línea continua se representa el ajuste de la ecuación de Boltzmann, los puntos son los datos experimentales. Las barras de error muestran el error estándar.

Shaker WT tiene curvas QV con rangos diferentes de activación con diferentes  $\Delta\text{pH}$  con la misma tendencia que Hv1. Es decir, los  $\Delta\text{pH}$  negativos corren la  $V_m$  de activación a potenciales positivos, mientras que con  $\Delta\text{pH}$  positivos la  $V_m$  se corre a potenciales negativos. Sin embargo, ni las  $V_{0.5}$  ni la  $V_m$  cambian de acuerdo con la regla de 40 mV/ $\Delta\text{pH}$  que sigue Hv1, a excepción del rango de  $\Delta\text{pH}$  entre -3 y -2.

Antes de comparar a Shaker WT con Hv1, es importante recalcar un par de cosas. Tomando en cuenta que no todas las curvas QV de Shaker mostradas en este trabajo

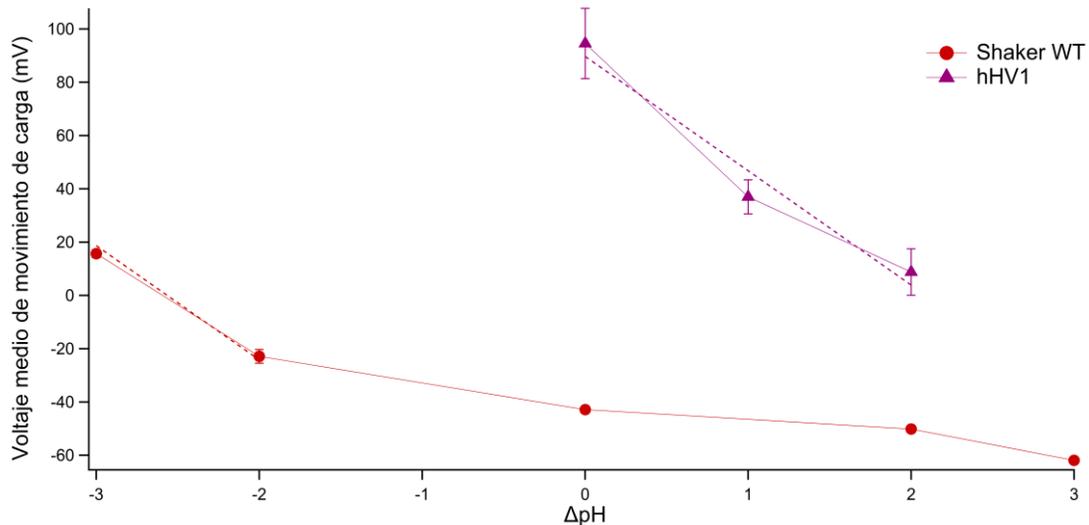
tuvieron ajustes sencillos o dobles de la ecuación de Boltzmann, para hacerlas comparables se calcularon  $V_m$  por interpolación. Es decir, la  $V_m$  es el voltage de registro en el cual la mitad de la carga de la curva QV se había movilizad, sin importar si esta curva se ajustó a una ecuación de Boltzmann doble o sencilla. Como ya se mencionó, las  $V_{0.5}$  resultantes de la ecuación de Boltzmann también se calcularon con su respectiva pendiente  $z$ .

La ventaja de presentar las  $V_m$  calculadas por interpolación es que se pueden comparar las mutantes sin importar el ajuste de la ecuación de Boltzmann que hayan tenido. Estas  $V_m$  se grafican contra el  $\Delta\text{pH}$  en el que fueron adquiridas. Otra ventaja de presentar los datos así es que se puede comparar el efecto del gradiente entre el VSD de Shaker con el de Hv1.

Mientras que Hv1 humano (hHv1) tiene una pendiente de  $-42 \text{ mV}/\Delta\text{pH}$  y es más o menos constante en un rango grande de  $\Delta\text{pH}$ , Shaker solo tiene esta tendencia en el rango de  $\Delta\text{pH}$  entre  $-3$  y  $-2$ . Esto se puede constatar en la **Figura 3.4**. Dado que no se considera que  $\Delta\text{pH} -3$  esté en rangos fisiológicos, es interesante que Hv1 pueda presentar esa misma pendiente, pero en todos los  $\Delta\text{pH}$ . Esto significa que, si Hv1 se adaptó para poder ser modulado por  $\Delta\text{pH}$  en rangos fisiológicos, esta función de sensor el pH debe tener importancia. Por otro lado, el VSD de Shaker está presentando esa misma modulación, pero su sitio de unión difuso para protones debe tener un  $\text{pKa}$  diferente, y por eso no se comporta exactamente como Hv1.

Tomando en cuenta que Shaker sigue una tendencia parecida a la de hHv1 en cuanto a la  $V_m$  de activación con respecto al  $\Delta\text{pH}$ , así como la conservación entre los VSD que existe no solamente entre Hv1 y Shaker, es probable que el resto de los VGCs estén sujetos a la misma modulación por el gradiente de protones, con sus respectivas variaciones.

Adicionalmente, el que Shaker WT tenga una pendiente diferente a lo largo del eje del gradiente de protones implica que, si bien está modulado por este gradiente, parece ser más sensible a pH ácido externo, pero no tanto con pH básico, comparado con hHv1, el cual no parece cambiar su comportamiento ante los diferentes gradientes.



**Figura 3.4.  $V_m$  vs  $\Delta pH$  de Shaker WT y hHV1.** Para Shaker WT, se muestran las  $V_m$  promedio calculadas por interpolación mientras que para hHV1 se muestran las  $V_{0.5}$  calculadas por ajuste de Boltzmann de la curva de conductancia contra voltage. Las líneas punteadas corresponden al ajuste de la línea recta correspondiente para hHV1, con una pendiente de  $-42.9 \text{ mV}/\Delta pH$ . Los datos de esta curva fueron obtenidos en el laboratorio por el alumno Esteban Suárez Delgado. La  $n$  de hHV1, comenzando con  $\Delta pH = 0$  hacia  $\Delta pH = 2$  fueron de 5, 5, y 4, respectivamente. Para Shaker WT, las  $n$ , comenzando con  $\Delta pH = -3$  fueron de 6, 9, 10, 9 y 5, respectivamente. Las barras de error muestran el error estándar.

Esto muestra que mientras Hv1 mantiene una pendiente más o menos constante de  $40 \text{ mV}/\Delta pH$ , Shaker no lo hace. Esta pendiente habla de qué tanto afecta el gradiente de protones al voltaje de activación del canal. Hv1 tiene una respuesta lineal al gradiente de protones, pero Shaker parece no hacerlo.

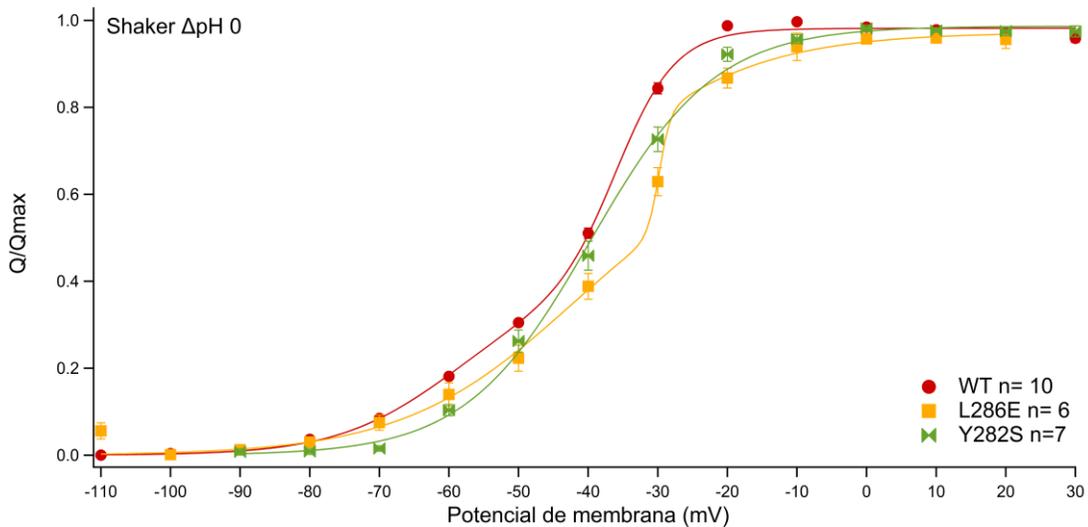
El anterior descubrimiento no solo cambia la visión de lo que se pensaba respecto al comportamiento de un VSD canónico como el de Shaker, sino que permite comprender un poco mejor a Hv1. Este canal permeable a protones en realidad no es una estructura de un VSD aberrante, ya que tuvo que haber evolucionado para mantener una respuesta lineal en cuanto a su modulación por gradiente de protones se refiere. Hv1 puede modularse con gradientes de protones que sí se presentan en rangos fisiológicos, ( $\Delta pH$  entre -1 y 1.5) mientras que Shaker, al tener una pendiente muy pequeña, en realidad no está especializado en sentir y responder tan fuerte en estos gradientes de protones.

a. Comparación del comportamiento de Shaker WT contra algunas mutantes de S3

En esta sección se van a comparar las mutantes del VSD al estudiar a Shaker WT en algunos gradientes de protones. Es importante aclarar que las mutantes no se pudieron comparar contra mismos gradientes que WT por diferentes razones, que se explicarán más adelante. También se profundizará en los efectos de cada mutante en la función del VSD frente a diferentes gradientes de protones.

En la **Figura 3.5** se comparan las curvas QV de Shaker WT con las curvas QV de las mutantes del VSD a  $\Delta\text{pH} = 0$ . El  $\Delta\text{pH} = 0$  sería la condición que se considera como control por la ausencia del gradiente y porque es lo que suele pasar en condiciones compatibles con la vida. Ambas mutantes del VSD corren por sí solas la  $V_m$  de apertura del canal, tal como se muestra en la **Figura 3.5** y en las **Tablas Anexas**.

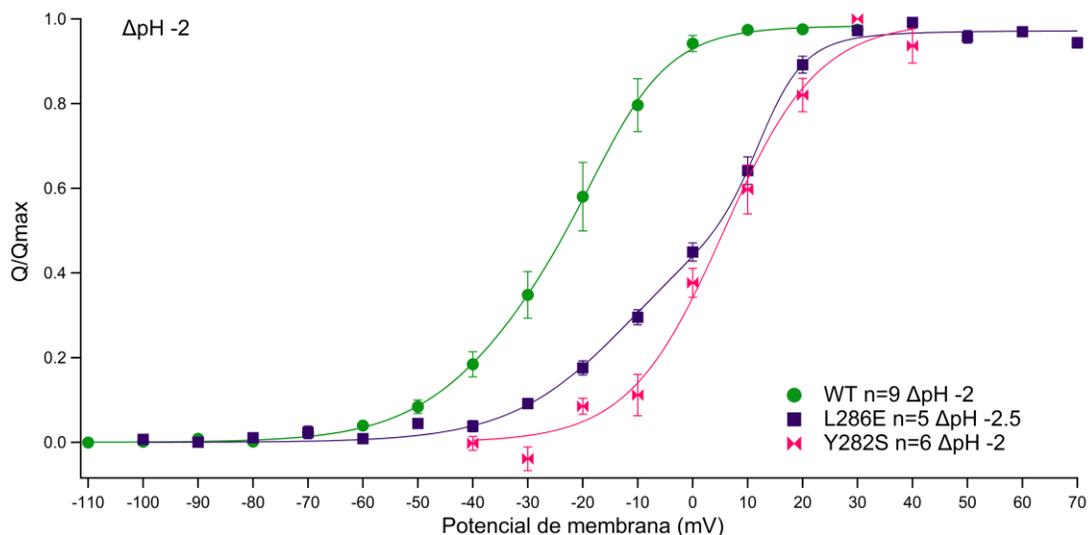
En el caso de Shaker L286E, además de comparar la  $V_m$ , los ajustes dobles de la ecuación de Boltzmann también pudieron compararse con los de Shaker WT. Tanto las  $V_{0.5}$  como las valencias  $z$  fueron diferentes. En cuanto a Shaker Y282S, a la cual se le ajusta a una ecuación sencilla, los parámetros se pueden comparar con la  $V_m$  obtenida por interpolación de Shaker WT. En este caso también resultó ser diferente.



**Figura 3.5. Curvas QV de Shaker WT, L286E y Y282S vs.  $\Delta\text{pH} = 0$ .** Las líneas corresponden al ajuste de la ecuación de Boltzmann. Las barras de error muestran el error estándar.

Como ya se había mencionado, en el caso de Shaker WT, con  $\Delta\text{pH} = -2$ , la  $V_m$  y por lo tanto las  $V_{0.5}$  se recorren a potenciales positivos con respecto al  $\Delta\text{pH} = 0$ . Como era de esperarse, las mutantes también tuvieron esta tendencia. Como se apreció en la **Figura 3.5**, dado que las mutantes corren la QV a potenciales positivos, al comparar las curvas QV de  $\Delta\text{pH} = -2$  con la análoga de Shaker WT también hubo un cambio en la  $V_m$ . Esto es evidente en la **Figura 3.6**. Mientras que Shaker WT y Shaker L286E tuvieron ajustes dobles de la ecuación de Boltzmann, Shaker Y282S no lo tuvo, sin embargo, la morfología de las curvas muestra que cada mutante tiene un comportamiento diferente a Shaker WT en condiciones de registro parecidas.

Es importante recalcar que, de acuerdo con estos resultados, la mutante Shaker L286E no es del todo comparable con Shaker WT. Esto se debe a que tuvo condiciones de registro con 0.5 unidades de pH de diferencia en el caso de los  $\Delta\text{pH}$  negativos. Cuando esta mutante se registró, los ovocitos tenían muy mala calidad, por lo que se comenzó a registrar esta mutante con  $\Delta\text{pH} = -2.5$ , considerando que probablemente ese sería el único  $\Delta\text{pH}$  negativo que se iba a poder registrar y que mostraría una diferencia significativa con respecto a las curvas QV de  $\Delta\text{pH} = 0$ .

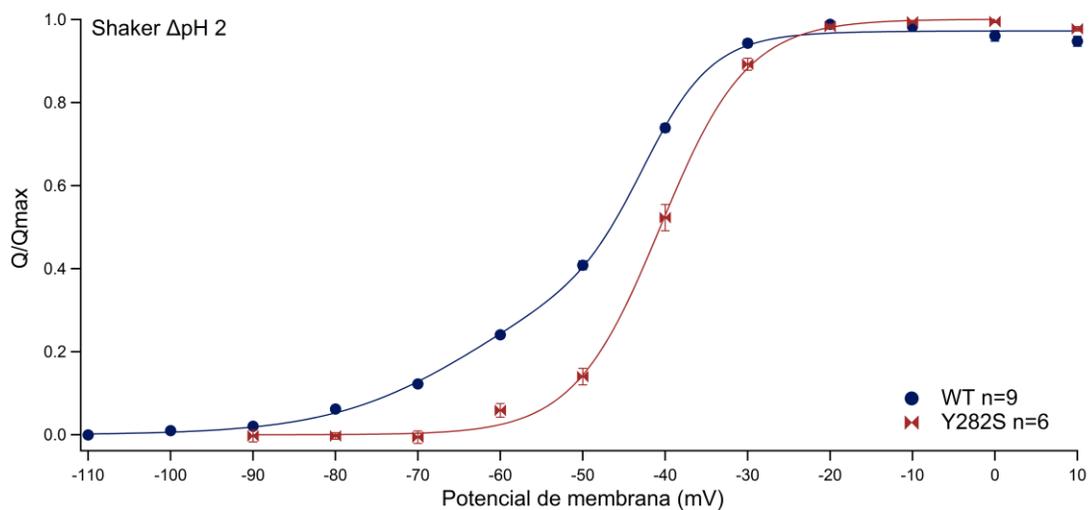


**Figura 3.6. Curvas de Shaker WT, L286E y Y282S QV vs.  $\Delta\text{pH} = -2$ .** Las líneas corresponden al ajuste de la ecuación de Boltzmann. Las barras de error muestran el error estándar.

Pasando a los  $\Delta\text{pH}$  positivos, en la **Figura 3.7** se muestran las curvas QV de Shaker WT y de Shaker Y282S obtenidas en  $\Delta\text{pH} = 2$ . Otra vez, la QV de Shaker Y282S está

desplazada a potenciales positivos con respecto a Shaker WT. Al comparar la  $V_m$  de Shaker WT con la de Shaker Y282S, hay una diferencia de 10 mV.

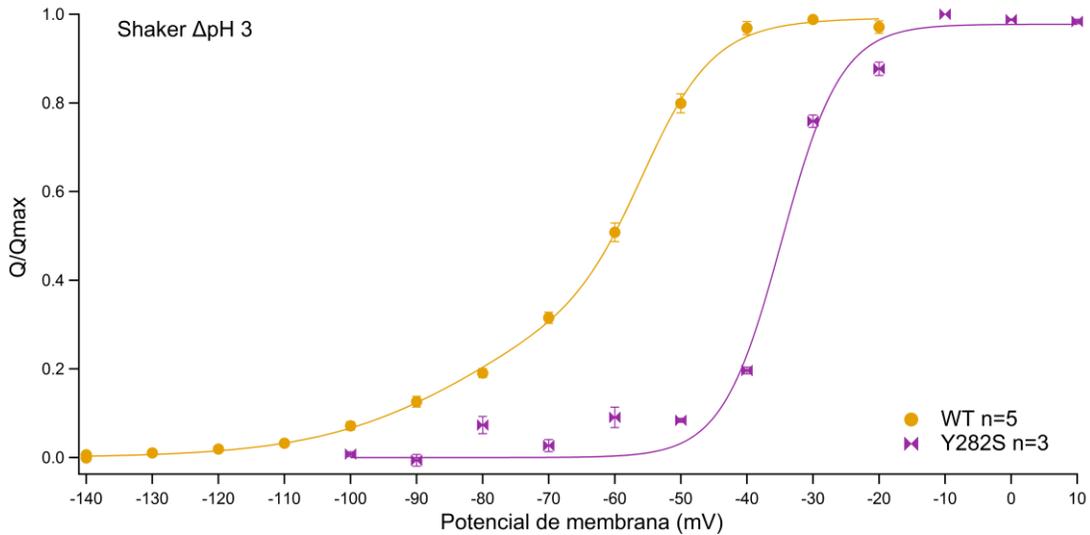
Otro aspecto diferente de Shaker Y282S con respecto de WT es que mientras que Shaker WT se ajusta a una ecuación de Boltzmann de dos componentes, Shaker Y282S corresponde a una sencilla. Esto es evidente al comparar al primer componente de la curva QV de Shaker WT con la de Shaker Y282S. Esto significaría que, de alguna manera la mutación Y282S hace que Shaker se comporte como un canal de dos estados, uno abierto y uno cerrado.



**Figura 3.7. Curvas QV de Shaker WT y Y282S vs.  $\Delta pH = 2$ .** Las líneas corresponden al ajuste de la ecuación de Boltzmann. Las barras de error muestran el error estándar.

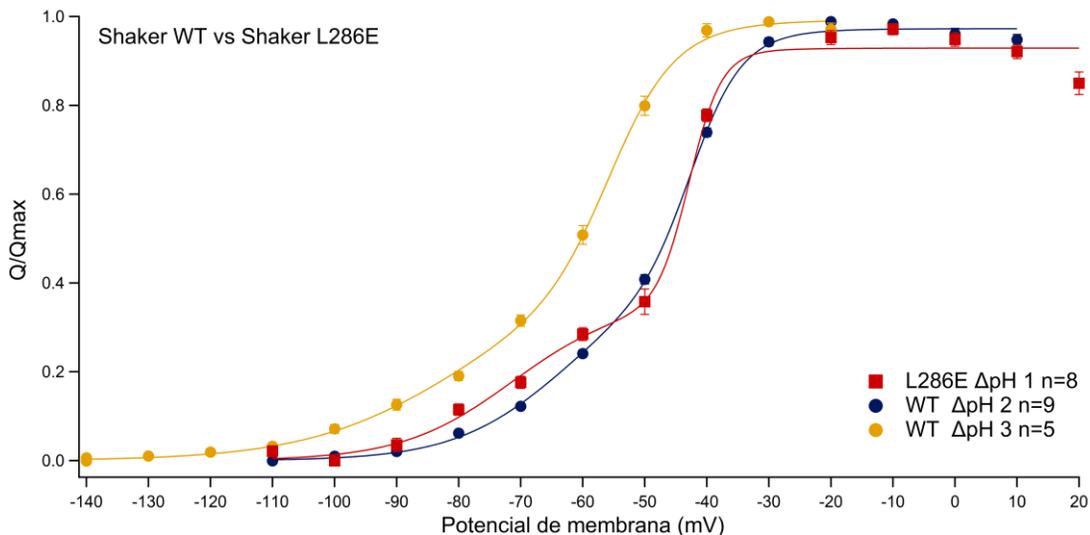
En el caso del  $\Delta pH = 3$ , Shaker Y282S también tiene una curva QV en potenciales más positivos que Shaker WT. Esto se muestra en la **Figura 3.8**. De igual manera que con el  $\Delta pH = 2$ , Y282S presentó ajuste sencillo de la ecuación de Boltzmann. En este  $\Delta pH$ , la diferencia entre las  $V_m$  de Shaker WT y Y282S fue de 29 mV. Esta diferencia casi se triplicó si se compara con el  $\Delta pH = 2$ . Al parecer, Shaker Y282S es más sensible a  $\Delta pH$  positivos que Shaker WT.

El único  $\Delta pH$  positivo reportado de la mutante L286E fue de 1. Considero importante mencionar que esta mutante presentó artefactos de sustracción muy grandes y corrientes de compuerta muy pequeñas con  $\Delta pH$  mayores a uno, por lo que no se incluyen los datos ni las curvas QV correspondientes.



**Figura 3.8. Curvas QV de Shaker WT y Y282S vs.  $\Delta\text{pH} = 3$ .** Las líneas corresponden al ajuste de la ecuación de Boltzmann. Las barras de error muestran el error estándar.

En la **Figura 3.9** se comparan las curvas QV de Shaker L286E  $\Delta\text{pH} = 1$  con Shaker WT  $\Delta\text{pH}$  de 2 y de 3. Shaker L286E tuvo ajustes dobles en este  $\Delta\text{pH}$ , por lo que se pueden comparar ambas  $V_{0.5}$  y las  $z$  correspondientes. En el caso de las pendientes del primer componente, no hay diferencia, pero las pendientes del segundo componente que corresponden a Shaker WT sí son diferentes de Shaker L286E.

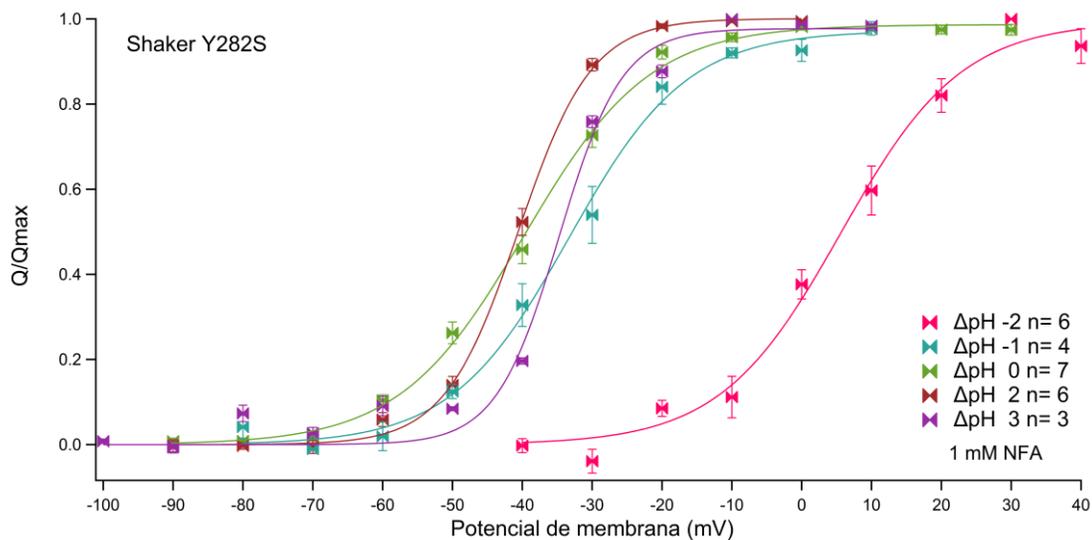


**Figura 3.9. Curvas QV de Shaker WT y L286E vs.  $\Delta\text{pH}$ s positivos.** Las líneas corresponden al ajuste de la ecuación de Boltzmann. Las barras de error muestran el error estándar.

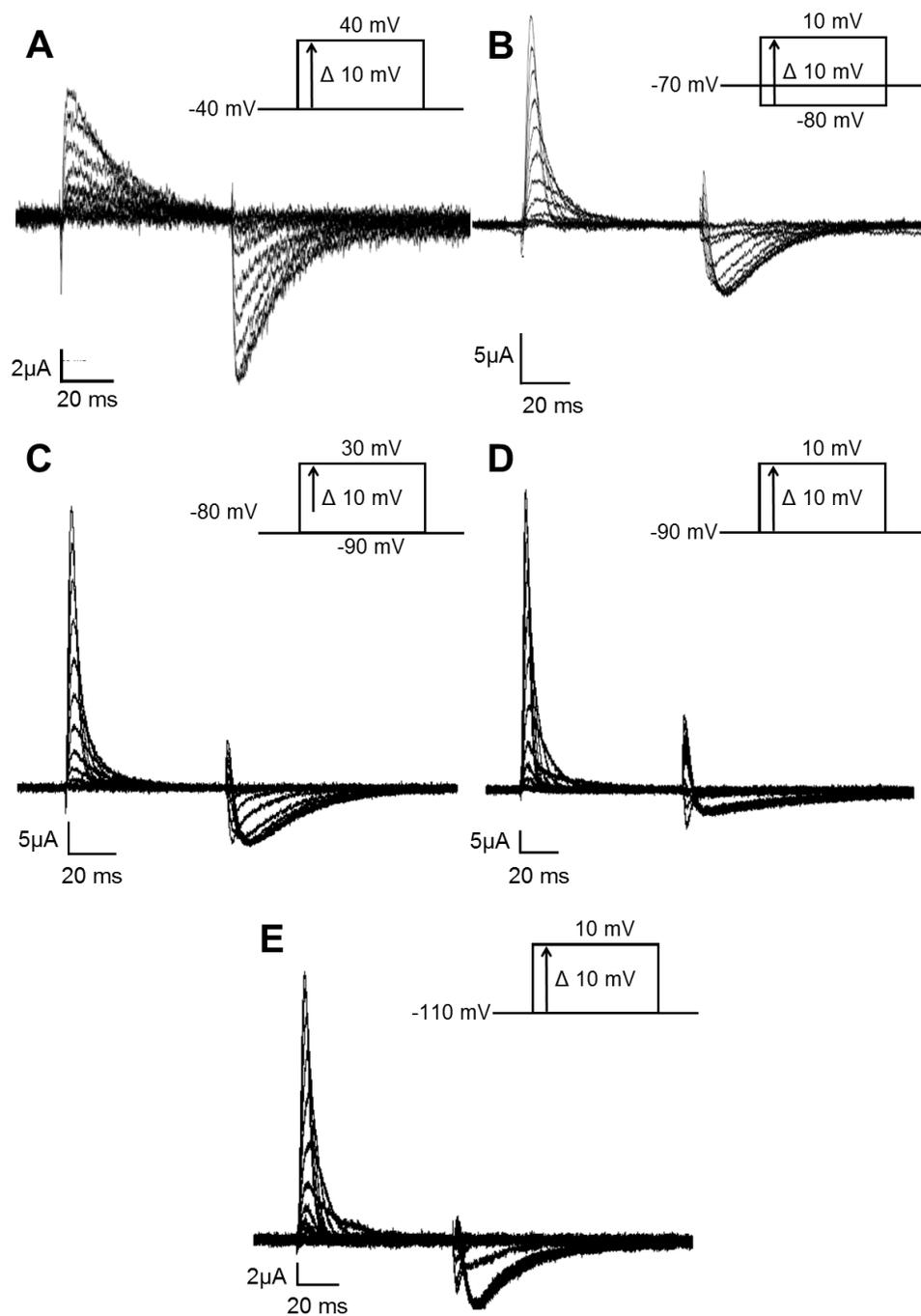
En cuanto a las  $V_{0.5}$ , solamente la  $V_{0.5(2)}$  de WT  $\Delta\text{pH} = 3$  no es diferente, lo cual también es evidente en la **Figura 3.9**. A pesar de que, en realidad estas curvas no son del todo comparables en términos de  $\Delta\text{pH}$  sí se puede concluir que la curva del  $\Delta\text{pH} = 1$  de Shaker L286E es más positiva que  $\Delta\text{pH} = -3$  de Shaker WT y que al menos en el segundo componente es igual que  $\Delta\text{pH} = -2$  de Shaker WT. El que tan solo una unidad de  $\Delta\text{pH}$  de Shaker L286E tenga un efecto comparable al  $\Delta\text{pH} = 2$  de Shaker WT es señal de que esta mutante no solamente se corre a potenciales más positivos que WT, sino que también parece ser más sensible a pHs externos básicos, comparados con Shaker WT.

b. Shaker Y282S

Los registros representativos de la mutante Shaker Y282S se muestran en la **Figura 3.11**. En  $\Delta\text{pH}$  negativos (con pH externos ácidos) se dificultó el registro de corrientes de compuerta posiblemente porque fueron condiciones poco favorables para la estabilidad estructural de la membrana de los ovocitos. Adicionalmente, el análisis de estos registros se tuvo que someter a una sustracción matemática por la presencia de corrientes endógenas a pesar de haber usado NFA para bloquearlas.



**Figura 3.10. Curvas QV de Shaker Y282S.** En línea continua se representa el ajuste de la ecuación de Boltzmann, los puntos son los datos experimentales. Las barras de error muestran el error estándar.



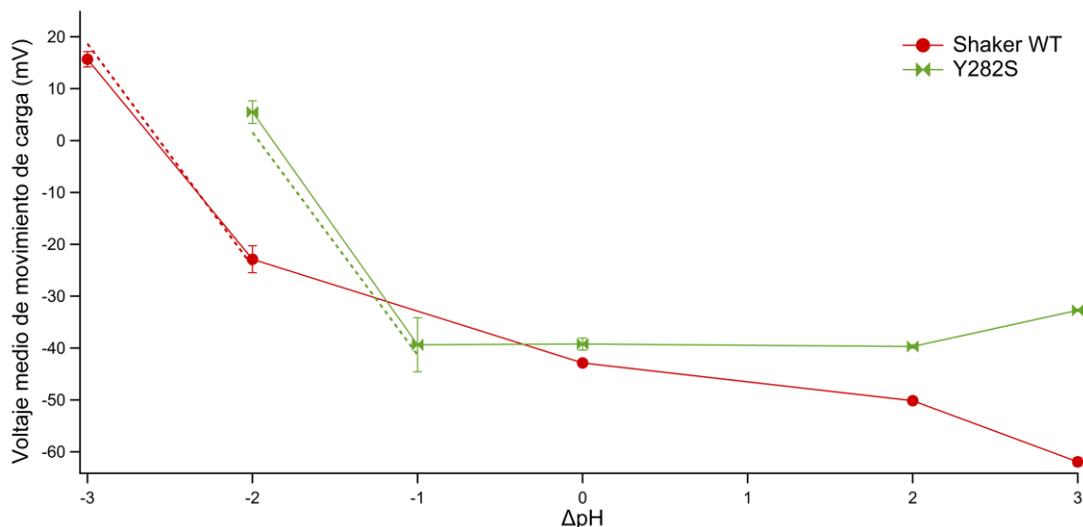
**Figura 3.11. Corrientes de compuerta de Shaker Y282S.** Se muestran los trazos representativos de corrientes de compuerta en diferentes  $\Delta\text{pH}$ . **A.**  $\Delta\text{pH} = -2$ . **B.**  $\Delta\text{pH} = -1$ . **C.**  $\Delta\text{pH} = 0$ . **D.**  $\Delta\text{pH} = 2$ . **E.**  $\Delta\text{pH} = 3$ . El protocolo de voltaje se especifica en cada familia de corrientes.

Como se muestra en la **Figura 3.10**, no fue posible saturar por completo la curva QV de esta mutante en el  $\Delta\text{pH} = -2$  debido a que a potenciales muy positivos aumenta la

cantidad de corriente endógena y eso imposibilitó un análisis confiable. Al comparar las  $V_{0.5}$  resultantes del ajuste sencillo de la ecuación de Boltzmann, no hay diferencia entre el  $\Delta\text{pH} = 2$  y el  $\Delta\text{pH} = 0$ . Sin embargo, el  $\Delta\text{pH} = 3$  sí fue suficiente para mover la  $V_{0.5}$  de manera significativa.

En cuanto a los  $\Delta\text{pH}$  negativos, ambos mostraron cambios en la  $V_{0.5}$  del canal. Esto también está en las **Tablas Anexas**. Estos datos indican que la mutante responde mejor a pHs externos ácidos.

La teoría de que Shaker Y282S responde mejor a  $\Delta\text{pH}$ s negativos cuadra con el hecho de que, con  $\Delta\text{pH} = -2$  hay un corrimiento de la  $V_{0.5}$  de aproximadamente 44.25 mV con respecto al  $\Delta\text{pH} = 0$ . Si se toma en cuenta que la posición del residuo mutado está en el extremo del S3 donde hay altas probabilidades de contacto directo con la solución extracelular, es factible pensar que el estado de protonación de la serina cambie con pHs externos ácidos (5-6) y esto influya en la estabilidad de la posición de S4.



**Figura 3.12.  $V_m$  vs  $\Delta\text{pH}$  de Shaker WT y Y282S.** Tanto para Shaker WT, como para Shaker Y282S se muestran las  $V_m$  promedio calculadas por interpolación. Las líneas punteadas corresponden al ajuste de la línea recta correspondiente para  $hH_{V1}$ , con una pendiente de  $-42.9 \text{ mV}/\Delta\text{pH}$ . Este ajuste se recorrió para compararlo con la curva de Shaker WT en el rango donde más se parece. Para Shaker WT, las  $n$ , comenzando con  $\Delta-3$  fueron de 6, 9, 10, 9 y 5, respectivamente. Para Y282S, comenzando por el  $\Delta\text{pH} = -2$  las  $n$  fueron de 6, 4, 7, 6 y 3, respectivamente. Las barras de error muestran el error estándar.

Adicionalmente, se compararon las curvas de  $V_m$  vs  $\Delta pH$  de Shaker WT y Shaker Y282S. Como se muestra en la **Figura 3.12**, Shaker Y282S responde más a  $\Delta pH$ s negativos en un rango de -2 a -1, de manera parecida a Shaker WT.

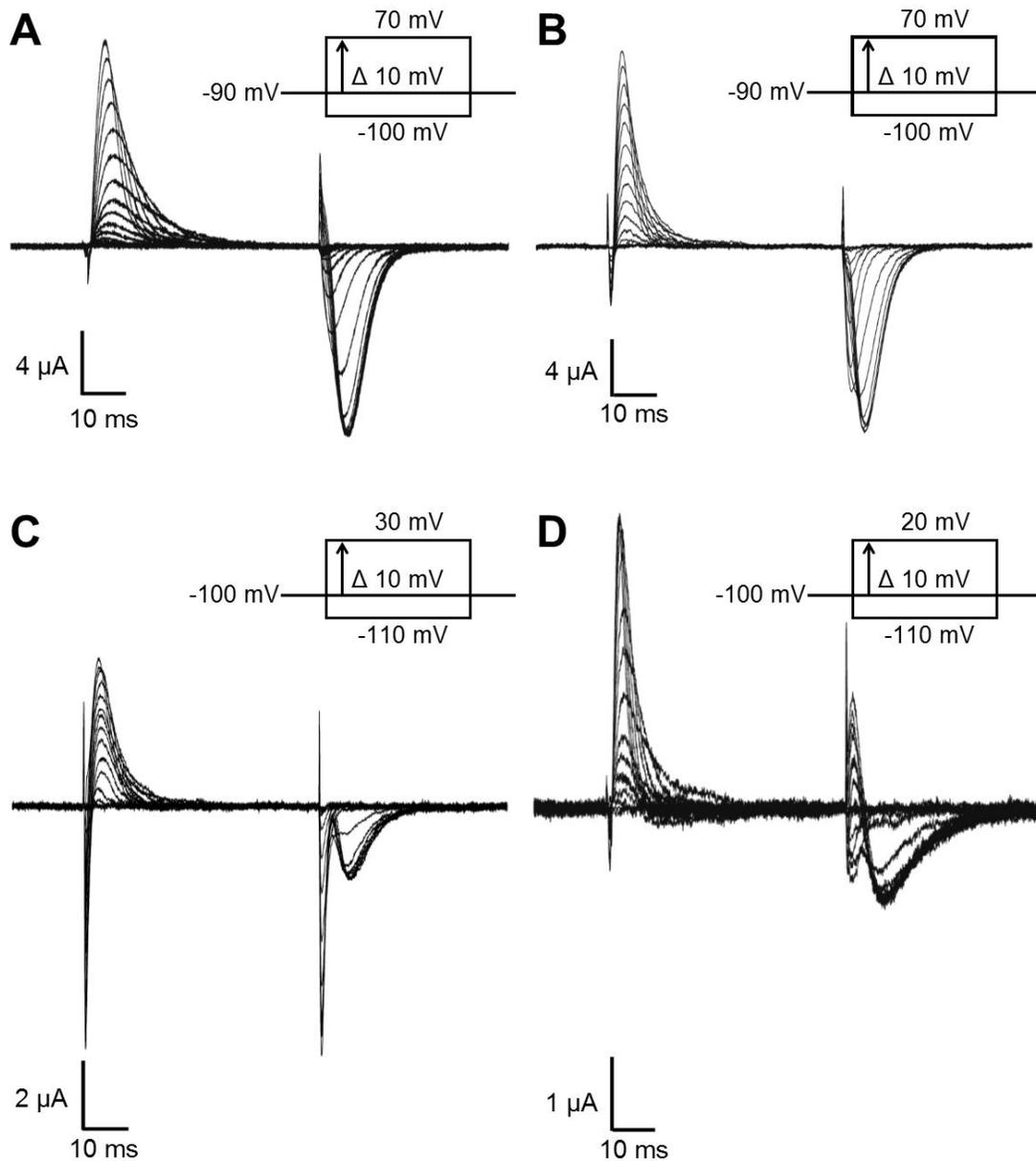
El que la pendiente de la curva  $V_m$  vs  $\Delta pH$  de Shaker Y282S no tenga cambios tan marcados entre el  $\Delta pH = -1$  al  $\Delta pH = 3$  indica que el canal no es tan sensible al gradiente de protones en ese rango de pH. Si se compara ese mismo rango con Shaker WT, queda claro que esta mutante presenta  $V_m$  más positivas que Shaker WT.

Comparando con la pendiente que presenta hHv1, que se muestra como una línea punteada, Shaker Y282S solamente presenta un comportamiento parecido en  $\Delta pH$  negativos, al igual que Shaker WT.

#### c. Shaker L286E

Shaker L286E se registró en  $\Delta pH$  negativos con relativa facilidad comparado con Shaker Y282S debido a que las curvas se saturaron a potenciales más negativos que esa mutante. Por otro lado, con  $\Delta pH$  positivos mayor a 1, no se apreciaron corrientes de compuerta libres de artefacto y el análisis correspondiente no se pudo realizar, por lo que no se incluyen esos datos. Los trazos representativos de esta mutante se muestran en la **Figura 3.13**.

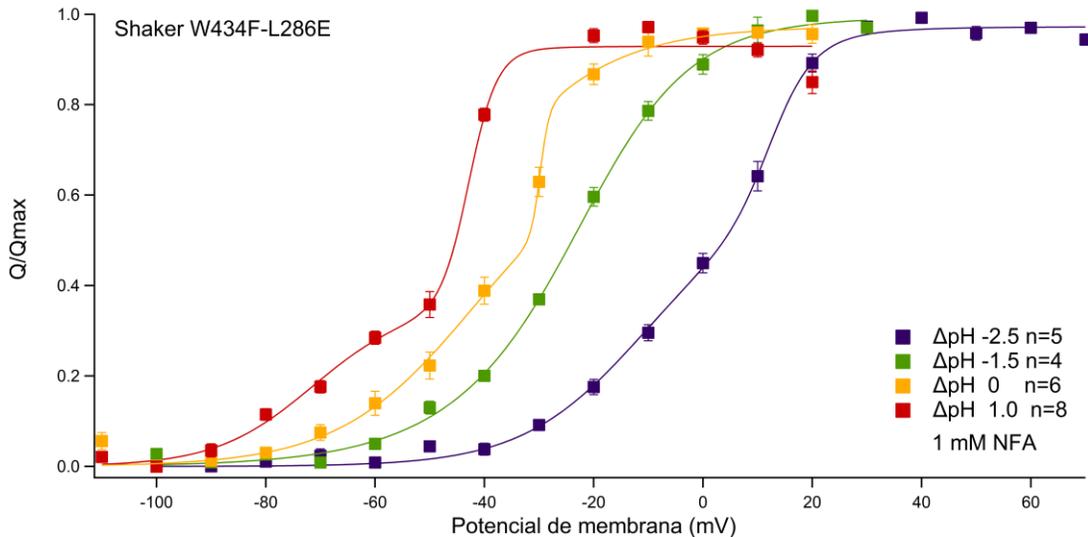
Las curvas QV correspondientes se muestran en la **Figura 3.14**. Los ajustes de la ecuación de Boltzmann fueron dobles, a excepción del  $\Delta pH = -1.5$ . Las curvas muestran cambios en morfología importantes a diferentes  $\Delta pH$ . Uno de los cambios más evidentes es que el primer componente de las curvas QV, que corresponde a la  $V_{0.5(1)}$  del  $\Delta pH = 1$  y conforme el gradiente de protones se invierte, este componente se atenúa. Lo anterior sugiere que el gradiente de protones probablemente modifica los cambios conformacionales por los que pasa el VSD al activarse, y que el primer componente debe representar un paso limitante que se atenúa al invertir el gradiente.



**Figura 3.13. Corrientes de compuerta de Shaker L286E.** Se muestran los trazos representativos de las corrientes de compuerta en diferentes  $\Delta\text{pH}$ . **A.**  $\Delta\text{pH} = -2.5$ . **B.**  $\Delta\text{pH} = -1.5$ . **C.**  $\Delta\text{pH} = 0$ . **D.**  $\Delta\text{pH} = 1$ . El protocolo de voltaje se especifica en cada familia de corrientes.

Las curvas QV de Shaker L286E tuvieron ajustes dobles de la ecuación de Boltzmann en los  $\Delta\text{pH} = -2.5, 0$ , y  $1$ , mientras que el  $\Delta\text{pH} = -1.5$  se ajustó mejor a una Boltzmann sencilla. Adicionalmente, es interesante que al observar las curvas QV se aprecia claramente que tienen marcado un hombro que corresponde al primer componente, el cual podría corresponder con un paso limitante durante la activación del canal. Este

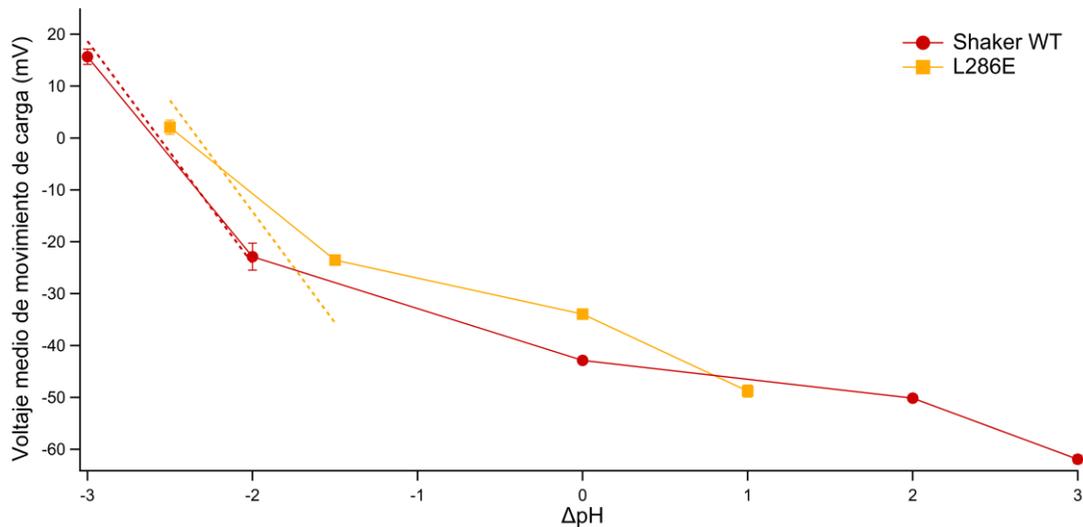
componente es evidente en la curva QV del  $\Delta\text{pH} = -1$  y se hace más tenue al invertir el gradiente de protones. Si el supuesto paso limitante es cierto, el gradiente de protones de alguna manera está ayudando a saltarlo. Lo anterior explicaría el aumento del valor de  $z_2$  que presenta  $\Delta\text{pH} = -2$  con respecto a  $\Delta\text{pH} = 0$ . Por otro lado, al establecer gradientes de pH con acidez en el exterior, Shaker L286E parece responder mejor, ya que sí presenta diferencias desde el  $\Delta\text{pH} = -1.5$



**Figura 3.14. Curvas QV de Shaker L286E.** En línea continua se representa el ajuste de la ecuación de Boltzmann, lo puntos son los datos experimentales. Las barras de error muestran el error estándar.

Al comparar las curvas  $V_m$  vs  $\Delta\text{pH}$  de L286E con WT, también se evidencia que las  $V_m$  de la mutante son más positivas que Shaker WT. Adicionalmente, esta mutante parece mantener una tendencia más parecida a Shaker WT, al menos en el rango de  $\Delta\text{pH}$  que se registró. Esto se puede observar en la **Figura 3.15**.

Shaker L286E, a diferencia de Shaker WT, no parece compartir la pendiente de los 40 mV/ $\Delta\text{pH}$  de  $hH_{v1}$  en ningún rango de la curva. Esto no significa que Shaker L286E no sea sensible a la modulación por  $\Delta\text{pH}$ , ya que su pendiente no se atenúa con los diferentes  $\Delta\text{pH}$  en que fue registrada.



**Figura 3.15.  $V_m$  vs  $\Delta pH$  de Shaker WT y L286E.** Tanto para Shaker WT, como para L286E se muestran las  $V_m$  promedio calculadas por interpolación. Las líneas punteadas corresponden al ajuste de la línea recta correspondiente para hH<sub>v</sub>1, con una pendiente de -42.897 mV/ $\Delta pH$ . Este ajuste se recorrió para compararlo con las curvas de Shaker en el rango donde más se parece. Para Shaker WT, las  $n$ , comenzando con  $\Delta -3$  fueron de 6, 9, 10, 9 y 5, respectivamente. Para L286E, comenzando por el  $\Delta pH = -2.5$  las  $n$  fueron de 5, 4, 6 y 8, respectivamente. Las barras de error muestran el error estándar.

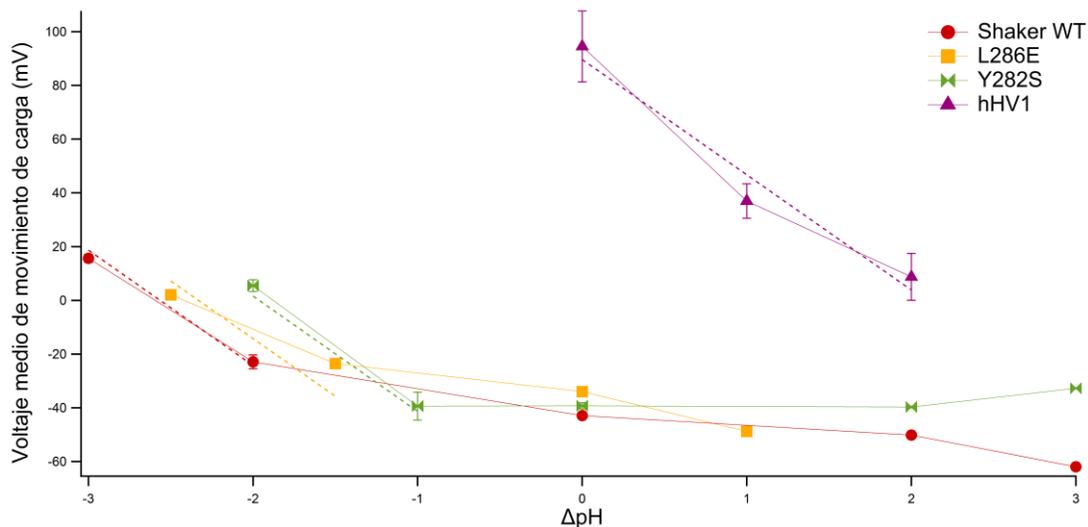
Finalmente, en la **Figura 3.16** se comparan las curvas de  $V_m$  vs  $\Delta pH$  de Shaker WT, las mutantes del VSD y hH<sub>v</sub>1. Es evidente que el gradiente de protones tiene un efecto diferente sobre la  $V_m$  de cada canal.

Las mutantes del VSD de Shaker parecen tener la misma tendencia que Shaker WT, y el que esta se modifique ligeramente implica que los residuos mutados son importantes para el sensor de pH de Shaker, de lo contrario las curvas QV presentarían el mismo comportamiento que el mostrado en Shaker WT.

Otro dato importante es que, mientras Shaker WT y Shaker L286E tienen una tendencia a reducir su pendiente entre los diferentes  $\Delta pH$ , Shaker Y282S tiene un cambio en  $\Delta pH$  de 2 a 3 en el que la pendiente se vuelve positiva.

Como ya se había mencionado anteriormente, ninguna de las curvas de Shaker presenta un comportamiento similar al de hH<sub>v</sub>1, al menos en términos de la pendiente. Esto indica que cada canal tiene una sensibilidad diferente al gradiente de protones, y

que varía con la magnitud del  $\Delta\text{pH}$ , cosa que no se presenta en hHv1. Otra cosa que es importante recalcar es la ubicación de ambas mutantes. Su posición en las cercanías de la membrana celular del lado externo seguramente está influyendo en que cada mutante responda con diferentes comportamientos a los gradientes de protones.

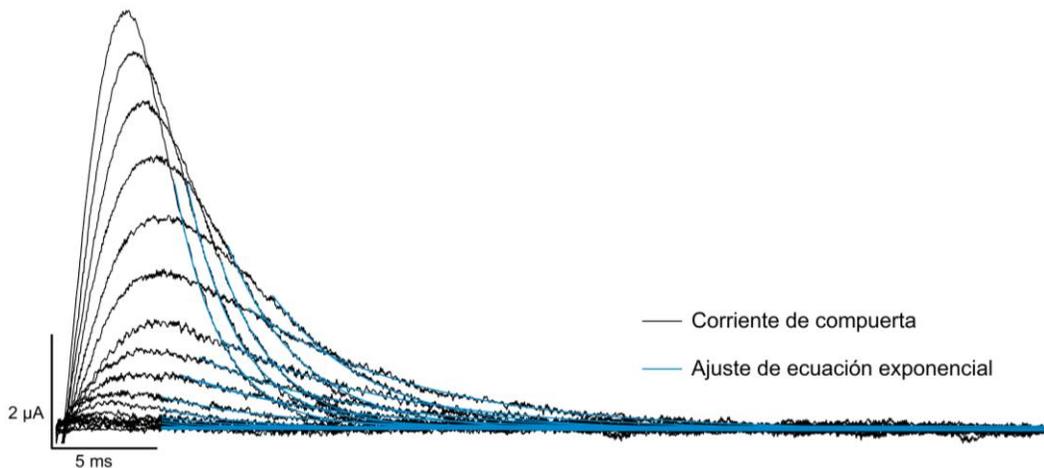


**Figura 3.16.  $V_m$  vs  $\Delta\text{pH}$  de Shaker WT, Y282S y L286E.** Se compara la curva de  $V_m$  vs  $\Delta\text{pH}$  de Shaker W434F con la del canal Hv1 humano (morado). Las líneas punteadas corresponden al ajuste de la línea recta correspondiente para hHv1, con una pendiente de  $-42.9 \text{ mV}/\Delta\text{pH}$ . Este ajuste se recorrió para compararlo con la curva de Shaker en el rango donde más se parece. Las barras de error muestran el error estándar.

## 3.2 Análisis de cinética

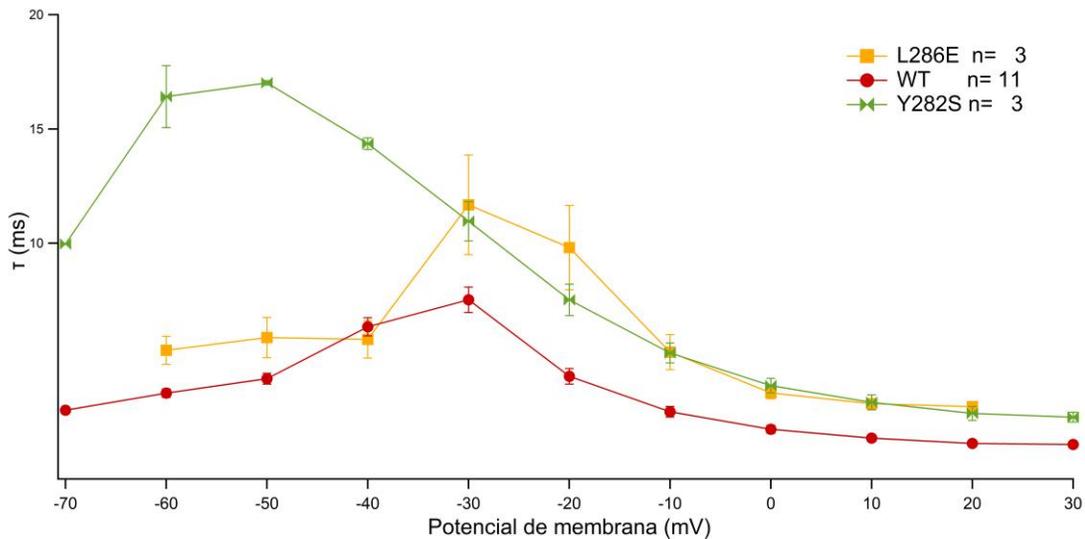
Como ya se mencionó, si se ajusta una ecuación exponencial al decaimiento de la corriente de compuerta y se calcula la constante de tiempo tau ( $\tau$ ) de cada una, se puede estimar la velocidad del movimiento de carga en cada potencial de membrana, esto resulta útil para cuantificar el efecto que tiene la mutación sobre la función del VSD.

De aquellas corrientes de compuerta que resultaron en una curva QV que se incluyeron en el promedio, se ajustó una exponencial a cada corriente, la  $\tau$  resultante se graficó contra el voltaje de registro correspondiente. En la **Figura 3.17** se muestra un ejemplo de cómo quedan los ajustes (color azul) sobre las corrientes de compuerta. Cada corriente tuvo un ajuste a diferente tiempo.



**Figura 3.17 Ajustes de ecuación exponencial a una familia de corrientes de compuerta.** Se muestra un ejemplo de una familia de corrientes con su respectivo ajuste de una ecuación exponencial.

En la **Figura 3.18** se muestran las  $\tau$  graficadas contra el voltaje, comparando a Shaker WT con las mutantes del VSD con  $\Delta\text{pH} = 0$ . Lo más evidente es que, mientras que Shaker WT tiene constantes de tiempo del orden de  $10 \text{ ms}$ , ambas mutantes son más lentas que Shaker WT, en especial Shaker Y282S. Lo anterior indica que ambas mutantes están haciendo que la apertura del canal sea más lenta, comparada con Shaker WT.

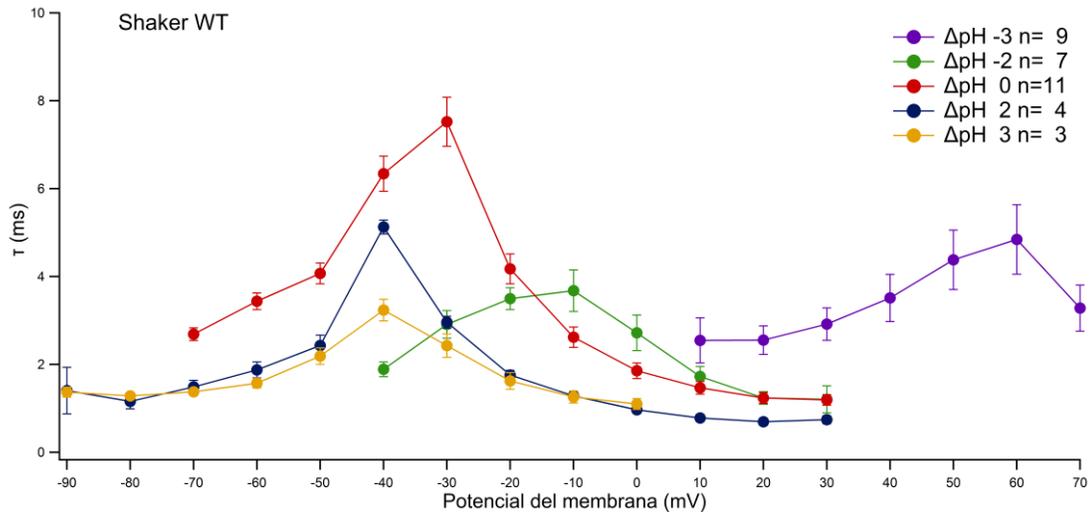


**Figura 3.18. Curvas  $\tau$ -V a  $\Delta\text{pH} = 0$  de Shaker WT, Y282S y L286E.** Las barras de error muestran el error estándar.

Cuando un canal solamente presenta un estado abierto y uno cerrado, el potencial en el cual se encuentra el punto máximo de la curva  $\tau$ -V debería coincidir con la  $V_m$  de la curva QV. Como se observa en la **Figura 3.18**, el punto máximo de cada curva  $\tau$ V no coincide con la  $V_m$  de la curva QV para Shaker WT ni las mutantes (**Figura 3.5**). Esto está parcialmente explicado debido a que, al menos L286E tiene un ajuste doble y entonces el pico de su  $\tau$ V puede o no coincidir con alguna de las  $V_{0.5}$  calculadas por medio de la ecuación de Boltzmann. La otra posibilidad es que esto sea evidencia que apoya la teoría de que cada canal mutante está pasando por diferentes estados conformacionales durante su apertura, por lo menos en ausencia de gradiente de protones.

#### a. Shaker WT

Al observar las curvas  $\tau$ V de Shaker WT con diferentes  $\Delta\text{pH}$  en la **Figura 3.19**, como era de esperarse, hay corrimiento de estas en el voltaje, dependiendo del gradiente de protones. Este comportamiento tiene la misma tendencia que el de las curvas QV. Adicionalmente, si se toma en cuenta la magnitud de las  $\tau$ , los datos sugieren que, ante un gradiente de protones el VSD se activa más rápido comparándolo con  $\Delta\text{pH} = 0$ . Cabe destacar que, a  $\Delta\text{pH}$  más positivos hay mayor aceleración, pero esto no se cumple para  $\Delta\text{pH}$  negativos.



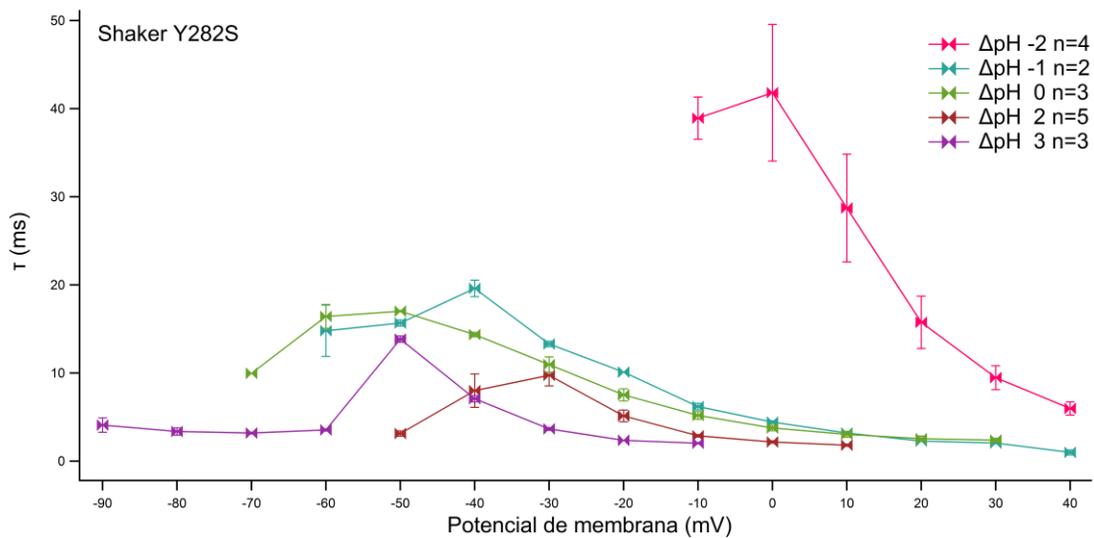
**Figura 3.19. Curvas  $\tau$ -V de Shaker WT.** Se muestran las Taus de activación de Shaker WT en varios gradientes de protones. Las barras de error muestran el error estándar.

b. Shaker Y282S

Shaker Y282S también presenta cambios en la cinética del canal al cambiar el gradiente de protones, pero no es tan fuerte como en Shaker WT. Como se muestra en la **Figura 3.20**, las curvas sugieren que, en esta mutante, con los  $\Delta\text{pH}$  positivos hay un ligero aceleramiento con respecto al  $\Delta\text{pH} = 0$ . Por otro lado, con el  $\Delta\text{pH} = -1$  el canal se vuelve más lento con respecto al  $\Delta\text{pH} = 0$  y el efecto es más evidente a  $\Delta\text{pH} = -2$ , que tiene valores de  $\tau$  hasta dos veces más grande que  $\Delta\text{pH} = 0$ . Como se sugirió al analizar las curvas QV de esta mutante, el análisis de cinética apoya la teoría de que la serina, al estar en contacto cercano con la solución acuosa que rodea la parte externa del canal seguramente cambia su estado de protonación con diferentes pHs externos. Lo anterior explicaría por qué esta la serina estaría influyendo en la velocidad con la que ocurren los cambios conformacionales durante la activación del VSD.

Otro punto importante para resaltar de esta mutante es que si se comparan los picos máximos de las  $\tau$  con las  $V_{0.5}$  de las curvas QV, estas no siguen la misma secuencia, ya que el máximo de  $\Delta\text{pH} = 3$  (-50 mV) es igual al de  $\Delta\text{pH} = 0$ , sin embargo,  $\Delta\text{pH} = 2$  se vuelve más positivo que estos dos últimos. Esto apoyaría teoría de que el canal pasa por diferentes estados conformacionales durante la apertura, dependiendo del gradiente de protones. Con el  $\Delta\text{pH} = -2$  no solamente corre la voltaje-dependencia del

canal, sino que, si se compara con el  $\Delta\text{pH} = 0$  a partir de los 10 mV, es evidente que hace más lenta la apertura del canal.



**Figura 3.20. Curvas  $\tau$ -V de Shaker Y282S.** Se muestran las Taus de activación de Shaker Y282S en varios gradientes de protones. Las barras de error muestran el error estándar.

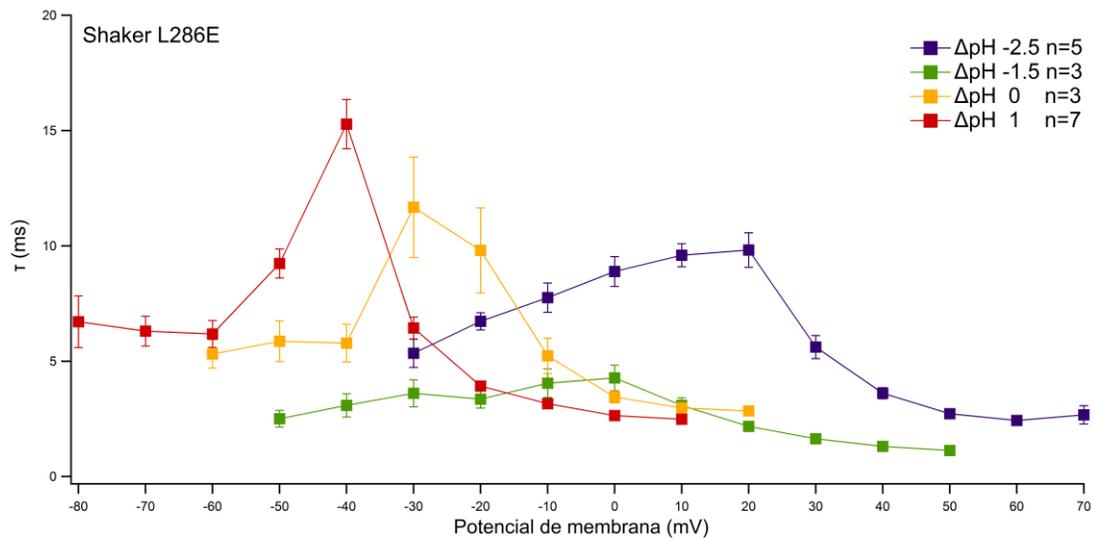
Finalmente, es importante recalcar otro efecto que tuvo el gradiente de protones sobre la cinética del canal Shaker Y282S. Si se compara la morfología de cada curva, es evidente que, mientras que a  $\Delta\text{pH} = 0$  la aceleración es gradual, con el resto de los  $\Delta\text{pH}$ s este fenómeno gradual se convierte en un pico que alcanza sus máximos en un rango de 10 a 20 mV.

### c. Shaker L286E

La última mutante, Shaker L286E también arrojó resultados con diferencias respecto al  $\Delta\text{pH} = 0$ . Las curvas de las  $\tau$ -V siguen la misma secuencia que las curvas QV en términos del rango de voltaje de activación y de  $V_m$ . Por otro lado, el gradiente de protones también cambia la cinética de activación del canal.

Como se muestra en la **Figura 3.21**, se puede apreciar que el pH también afecta la morfología de las curvas. En  $\Delta\text{pH} = 0$ , el cambio de potencial entre -40 y -30 mV es un paso abrupto para llegar al pico máximo de la curva, por otro lado, este fenómeno es más suave en  $\Delta\text{pH} = 1$  y aún más lento en los dos  $\Delta\text{pH}$  negativos. Si se toma en cuenta que las curvas QV de los  $\Delta\text{pH} = 1$  y  $\Delta\text{pH} = 0$  tienen dos componentes visiblemente

marcados, el pico máximo resultante del análisis de cinética apoya la teoría de que en estos  $\Delta\text{pH}$  hay un paso limitante durante la apertura del canal, y que se atenúa con los  $\Delta\text{pH}$  negativos. Si esto es cierto, la mutante estaría permitiendo que el canal se abra más rápido, tal vez por la formación de un sitio de protonación.



**Figura 3.21. Curvas  $\tau$ -V de Shaker L286E.** Se muestran las Taus de activación de Shaker L286E en varios gradientes de protones. Las barras de error muestran el error estándar.

## Discusión

La activación del VSD de Shaker se había medido en diversos estudios, pero no se ha estudiado el efecto que tiene el gradiente de protones ( $\Delta\text{pH}$ ) sobre la  $V_{0.5}$  de activación ni de su cinética. En este trabajo se demostró que el VSD de Shaker se activa con diferentes rangos de voltaje, y que este rango depende del gradiente de protones (**Figura 3.3**). La cinética del canal también presentó cambios importantes al cambiar el  $\Delta\text{pH}$  (**Figura 3.19**).

El hecho de que el VSD de Shaker WT responda de manera similar a  $Hv1$  (**Figura 3.16**) da pauta a reconsiderar varias cosas. La primera es que, dado que los VSD de los canales canónicos comparten secuencia y estructura muy similares, probablemente todos estos canales podrían presentar modulación por  $\Delta\text{pH}$  en algún grado. La segunda es sobre las consecuencias de esta modulación. En condiciones como cáncer o isquemia el  $\Delta\text{pH}$  puede rondar entre 1 y 1.5, adicionalmente, en cáncer de diversos tipos se ha observado que hay varios canales iónicos activados por voltaje que están sobre expresados. Tomando en cuenta estos dos fenómenos, se debería reconsiderar el papel de los canales iónicos dependientes de voltaje en dichas condiciones.

La modulación por gradiente de protones de Shaker no solamente cambia la visión que se tenía de los VSD en general, sino que también permite reconsiderar el papel de esta misma modulación para la función de  $Hv1$ . Con estudios anteriores, era evidente que la modulación por protones de  $Hv1$  tiene importancia fisiológica en varios procesos donde se producen  $\Delta\text{pH}$  relativamente grandes, como en el caso de la fagocitosis. Es muy interesante que  $Hv1$  mantenga su pendiente de aproximadamente  $40 \text{ mV}/\Delta\text{pH}$ , mientras que Shaker presenta cambios de pendiente a lo largo del rango de gradiente de protones de  $\pm 3$  y tiende a disminuir en el rango fisiológico, es decir, la función de sensar pH del VSD de Shaker no tiene impacto en condiciones fisiológicas. Por otro lado, el canal  $Hv1$  tuvo que haber especializado su función para poder responder a los cambios de voltaje y al gradiente de protones en rangos fisiológicos, por lo tanto, este canal no es tan extraño como se había pensado hasta ahora.

El registro de corrientes de compuerta no solamente permite calcular la  $V_{0.5}$  de apertura del canal, sino que además permite el estudio de su cinética correspondiente. La introducción de las mutaciones en el extremo proximal externo de S3 hace que Shaker tarde más tiempo en llegar al estado abierto, tal como se aprecia en la **Figura 3.18**. Esto no es sorprendente si se toma en cuenta que las mutantes están ubicadas en el VSD del canal y, por lo tanto, si bien el VSD no deja de sentir el voltaje, su función se ve comprometida.

Por otro lado, el que el gradiente de protones cambie la cinética del canal, no solamente en Shaker WT sino también en las mutantes permite reforzar la idea de que el VSD está modulado por dicho gradiente. Aunado a esto, no se ha podido estudiar la cinética del canal Hv1 con varios  $\Delta\text{pH}$ s, a excepción de un par de canales mutantes, por lo que los datos proporcionados por Shaker WT podrían ser útiles para comenzar a extrapolar con Hv1.

Como ya se mencionó, los trabajos previos sobre el sensor de pH de Hv1 han permitido suponer que este sensor está conformado por varios aminoácidos protonables. En términos sencillos, debe haber un sitio de unión difuso para los protones, el cual dependiendo del estado de protonación cambia la estabilidad de la posición de S4 con respecto al resto de la estructura del canal. Si las mutantes registradas son parte del sensor de pH de Hv1 o de Shaker, entonces habrá cambios en la relación  $V_m\text{-}\Delta\text{pH}$ .

La mutante Shaker Y282S, que presentó pequeños cambios en la  $V_{0.5}$  de las curvas QV, también presentó cambios en la cinética. El  $\Delta\text{pH}$  -2, es decir, con pH externo de 5 tuvo el efecto más grande sobre esta mutante, no solo en las curvas QV (**Figura 3.10**), sino que además hizo que la cinética del canal se volviera más lenta comparada con el  $\Delta\text{pH}$  0, tal como se muestra en la **Figura 3.20**. Es importante destacar que, como se aprecia en la **Figura 3.1** esta mutante tiene alta probabilidad de estar en contacto directo con la solución extracelular, por lo que la serina podría estar cambiando su estado de protonación, que a su vez influye en el pKa colectivo del VSD. Esto estabilizaría la posición del VSD en estado cerrado y eso es congruente con los experimentos, ya que se necesitaron potenciales de membrana muy positivos para abrir el canal. Además, el pico de la  $\tau\text{-V}$  correspondiente también es grande, es decir, con pHs externos ácidos, el VSD es más estable en posición inactiva. Para confirmar

esto, se requieren experimentos en los cuales se mantenga el mismo  $\Delta\text{pH}$ , pero usando pH diferentes adentro y afuera.

Otro resultado que llama la atención de Shaker Y282S es la no correspondencia de la  $V_m$  de las QV con el pico de la  $\tau$ -V. Dado que Shaker Y282S se ajusta bien a una ecuación de Boltzmann simple se esperaría que los picos de las curvas  $\tau$ -V tuvieran la misma secuencia en el rango de voltaje que se presenta en las curvas QV, pero esto no aplica para Shaker Y282S. Como se mencionó anteriormente en los resultados, al observar las curvas  $\tau$ -V en  $\Delta\text{pH}$  0 y compararla con el resto, los gradientes de protones hacen que la llegada al pico máximo no sea gradual como en  $\Delta\text{pH}$  0. Es probable que Shaker Y282S no tenga correspondencia entre las  $V_m$  y los máximos de la  $\tau$ -V debido a que tiene un paso limitante cuya barrera sea muy pequeña como para verla en las curvas QV pero que se hace más evidente en las curvas  $\tau$ -V. Sin embargo, para confirmar esto se necesitarán estudios adicionales de esta mutante.

La mutante L286E arrojó resultados aún más interesantes. El que no se pudieron obtener buenos registros con  $\Delta\text{pH}$  altos extracelulares sugiere que, probablemente el sitio de unión difuso para protones no tiene el pKa adecuado para desestabilizar a S4 y por ello las corrientes de compuerta observadas fueron tan pequeñas que su análisis no fue confiable. Caso contrario ocurrió con  $\Delta\text{pH}$  negativos, en los cuales sí se registraron corrientes de compuerta, pero a potenciales muy positivos. Ahora, si se toma en cuenta que el primer componente de la curva QV del  $\Delta\text{pH}$  -1 está muy marcado comparado con  $\Delta\text{pH}$  negativos (**Figura 3.14**), la teoría de un paso limitante se ve apoyada por el hecho de que el intentar medir corrientes con  $\Delta\text{pH}$ s muy positivos fue imposible. El análisis de cinética del canal cuadra con esta teoría, ya que con  $\Delta\text{pH}$  positivos, el comportamiento de la curva  $\tau$ -V para llegar al pico es muy pronunciada, mientras que al invertir el  $\Delta\text{pH}$  las curvas se vuelven menos pronunciadas, tal como se observa en la **Figura 3.21**. Recordando que el pico de las curvas  $\tau$ -V corresponden a la  $V_{0.5}$  de la curva QV, es probable que, en el caso de Shaker L286E, que tiene dobles ajustes de la ecuación de Boltzmann, los picos corresponden con las  $V_{0.5(2)}$  en el caso de los dobles ajustes. Otro punto por destacar de esta mutante es que hay una tendencia del  $\Delta\text{pH}$ = 1 el canal es más lento que con  $\Delta\text{pH}$ = 0, mientras que con el  $\Delta\text{pH}$ = -1.5 el canal se acelera aún más. El  $\Delta\text{pH}$ = -2.5 en lugar de seguir la misma tendencia,

vuelve a mantener  $\tau$  equivalentes al  $\Delta\text{pH} = 0$ . Este efecto podría estar dado por la sustitución del residuo, que también debe estar interactuando con la solución extracelular.

Desde el punto de vista estructural, es interesante que la sustitución por aminoácidos protonables de dos aminoácidos neutros, que además son cercanos entre sí tengan comportamientos tan diferentes. En primer lugar, con  $\Delta\text{pH} = 0$  Shaker L286E cambia un poco más la  $V_m$  que Shaker Y282S, comparando con Shaker WT. Esto no es del todo sorprendente ya que L286 es más extracelular que Y282 y por lo tanto L286 tiene más probabilidad de quedar más expuesta a la solución extracelular que el otro residuo. En segundo lugar, las respuestas de ambas mutantes ante los diferentes gradientes, si bien tienen la misma direccionalidad, no presentan exactamente los mismos comportamientos, al menos en las corrientes de compuerta. En tercer lugar, los residuos sustituidos deben ser parte del sensor de pH de Shaker, ya que las mutantes no presentan el mismo comportamiento que Shaker WT al cambiar los gradientes de protones.

Una de las limitaciones de este estudio dadas las desventajas de hacer experimentos de fijación de voltaje de dos electrodos es que no se puede controlar el contenido intracelular, incluyendo el pH. Se estima que los ovocitos de *Xenopus laevis* tienen un pH interno que ronda entre 7.2 y 7.5. Para hacer los experimentos, se partió de la suposición de que el pH interno fue de 7.5 y que este no cambió durante el registro electrofisiológico. El hecho de que se haya encontrado que las curvas QV de Shaker WT se recorran dependiendo del  $\Delta\text{pH}$  hipotético de registro indica que la modulación por gradiente de protones es un fenómeno que prevalece a pesar de estas condiciones no tan controladas de registro y que, seguramente debe tener importancia fisiológica.

Otra de las limitaciones de no poder controlar la composición iónica del interior del ovocito fue que, dado que los ovocitos aumentan la exportación de proteínas a la membrana durante la expresión del canal, en este caso Shaker, se producen corrientes endógenas indeseadas, principalmente del ion cloro. Estas corrientes endógenas en algunos casos se hicieron presentes en los pulsos de p/n, por lo que muchos experimentos tuvieron que ser descartados durante la etapa de análisis. En futuros trabajos, se requiere de un sistema mejor controlado como en el caso de fijación de

voltaje de microáreas de membrana (patch clamp) para controlar las soluciones de ambos lados de la membrana y aminorar los efectos de las limitaciones antes mencionadas. Adicionalmente, en estas condiciones se podrían intentar registros con los mismos  $\Delta\text{pHs}$ , pero con valores de pH internos diferentes. Los resultados permitirían determinar si las mutaciones estudiadas en este trabajo tienen influencia en el pKa de la hendidura interna del canal durante su activación.

Otro de los aspectos que faltan por estudiar es el efecto conjunto de las mutantes sobre el mismo canal. Esto permitiría tener más detalles acerca del sitio de unión difuso de protones del lado externo del canal y entonces poder extrapolarlo con la función del VSD de Hv1.

## Conclusiones

- La función del VSD de Shaker W434F está modulado por el gradiente de protones de manera similar a la de Hv1.
- Hv1 tiene un sensor de pH que funciona en rangos fisiológicos, mientras que Shaker necesita gradientes de protones grandes para tener respuestas similares a las de Hv1.
- Shaker W434F es un buen modelo para estudiar la modulación por  $\Delta\text{pH}$  del VSD, dada la facilidad de la medición de sus corrientes de compuerta.
- Es probable que los VSD de otros canales iónicos presenten en algún grado modulación por gradientes de protones, dado el nivel de conservación de secuencia y estructura.
- Las mutantes de Shaker Y282S y L286E, ubicadas en el extremo distal externo de S3 tienen efectos sobre la función, la cinética y la modulación del VSD de Shaker.
- Los efectos de las mutantes del VSD de Shaker sobre la modulación por gradiente de protones sugiere que esos residuos son importantes para que Shaker responda al pH.

## Tablas anexas

| $\Delta\text{pH}$   | n  | $V_{0.5}$ (1) | SEM   | D    | $V_{0.5}$ (2) | SEM   | D     |
|---------------------|----|---------------|-------|------|---------------|-------|-------|
| <b>Shaker WT</b>    |    |               |       |      |               |       |       |
| -3                  | 6  | 4.188         | 2.775 | **** | 22.178        | 1.780 | ****  |
| -2                  | 9  | -32.863       | 3.505 | **** | -16.190       | 2.810 | ****  |
| 0                   | 10 | -59.600       | 0.362 |      | -35.873       | 0.559 |       |
| 2                   | 9  | -63.356       | 2.064 | ns   | -42.466       | 0.502 | *     |
| 3                   | 5  | -80.595       | 3.780 | **** | -55.530       | 0.773 | ****  |
| <b>Shaker L286E</b> |    |               |       |      |               |       |       |
| -2.5                | 5  | -11.435       | 1.909 | **** | 12.329        | 1.916 | ****  |
| -1.5                | 4  | -24.390       | 0.124 | **** | _____         | _____ | _____ |
| 0                   | 6  | -42.133       | 2.044 | **** | -29.802       | 0.109 | ****  |
| 1                   | 8  | -72.680       | 1.278 | **** | -44.465       | 0.976 | ****  |
| <b>Shaker Y282S</b> |    |               |       |      |               |       |       |
| -2                  | 6  | 2.961         | 0.243 | **** | _____         | _____ | _____ |
| -1                  | 4  | -35.972       | 2.787 | **   | _____         | _____ | _____ |
| 0                   | 7  | -41.283       | 1.234 | **** | _____         | _____ | _____ |
| 2                   | 6  | -40.661       | 0.424 | ns   | _____         | _____ | _____ |
| 3                   | 3  | -34.708       | 0.159 | **   | _____         | _____ | _____ |

**Tabla Anexa A.  $V_{0.5}$  calculadas con base en ajustes de la ecuación de Boltzmann.** Cada curva QV obtenida se ajustó individualmente y se promediaron para obtener la SEM reportada. Las  $V_{0.5}$  se obtuvieron del ajuste hecho sobre la curva QV promediada correspondiente. El análisis estadístico de cada mutante se hizo con una prueba ANOVA de dos vías, tomando  $\Delta\text{pH} = 0$  como control (asteriscos negros). Para comparar a Shaker WT con las mutantes se hizo lo mismo, (asteriscos rojos) esta vez tomando a Shaker WT  $\Delta\text{pH} = 0$  como control. Para comparar la  $V_{0.5}$  de Y282S se usó la  $V_m$  (calculada por interpolación) de Shaker WT. La diferencia significativa se reporta en la columna D.

| $\Delta pH$         | N  | $z^{(1)}$ | SEM   | D  | $z^{(2)}$ | SEM   | D     |
|---------------------|----|-----------|-------|----|-----------|-------|-------|
| <b>Shaker WT</b>    |    |           |       |    |           |       |       |
| -3                  | 6  | 4.141     | 2.157 | ns | 3.007     | 0.685 | ns    |
| -2                  | 9  | 3.885     | 2.617 | ns | 2.446     | 2.762 | ns    |
| 0                   | 10 | 5.925     | 0.546 |    | 2.970     | 0.489 |       |
| 2                   | 9  | 6.108     | 2.655 | ns | 2.822     | 0.336 | ns    |
| 3                   | 5  | 4.789     | 0.691 | ns | 2.027     | 0.707 | ns    |
| <b>Shaker L286E</b> |    |           |       |    |           |       |       |
| -2.5                | 5  | 2.285     | 0.163 | ns | 6.425     | 3.641 | ***   |
| -1.5                | 4  | 2.136     | 0.032 | ns | _____     | _____ | _____ |
| 0                   | 6  | 2.437     | 0.269 | ** | 8.893     | 0.760 | ****  |
| 1                   | 8  | 2.756     | 0.453 | ns | 10.064    | 1.627 | ns    |
| <b>Shaker Y282S</b> |    |           |       |    |           |       |       |
| -2                  | 6  | 6.207     | 1.797 | ns | _____     | _____ | _____ |
| -1                  | 4  | 3.286     | 0.167 | ns | _____     | _____ | _____ |
| 0                   | 7  | 2.912     | 0.048 | ** | _____     | _____ | _____ |
| 2                   | 6  | 5.035     | 0.245 | ns | _____     | _____ | _____ |
| 3                   | 3  | 5.570     | 0.359 | ns | _____     | _____ | _____ |

**Tabla Anexa B. z calculadas con base en ajustes de la ecuación de Boltzmann.** Cada curva QV obtenida se ajustó individualmente y se promediaron para obtener la SEM reportada. Las  $V_{0.5}$  se obtuvieron del ajuste hecho sobre la curva QV promediada correspondiente. El análisis estadístico de cada mutante se hizo con una prueba ANOVA de dos vías, tomando  $\Delta pH= 0$  como control (asteriscos negros). Para comparar a Shaker WT con las mutantes se hizo lo mismo, (asteriscos rojos) esta vez tomando a Shaker WT  $\Delta pH= 0$  como control. La diferencia significativa se reporta en la columna D.

| $\Delta pH$         | n  | $V_m$  | SEM    | D    |
|---------------------|----|--------|--------|------|
| <b>Shaker WT</b>    |    |        |        |      |
| <b>-3</b>           | 6  | 15.67  | 1.494  | **** |
| <b>-2</b>           | 9  | -22.87 | 2.596  | **** |
| <b>0</b>            | 10 | -42.87 | 0.535  |      |
| <b>2</b>            | 9  | -50.14 | 0.370  | ***  |
| <b>3</b>            | 5  | -61.92 | 0.797  | **** |
| <b>Shaker L286E</b> |    |        |        |      |
| <b>-2.5</b>         | 5  | 2.06   | 1.371  | **** |
| <b>-1.5</b>         | 4  | -23.52 | 0.618  | **** |
| <b>0</b>            | 6  | -33.95 | 0.725  | **** |
| <b>1</b>            | 8  | -48.77 | 1.177  | **** |
| <b>Shaker Y282S</b> |    |        |        |      |
| <b>-2</b>           | 6  | 5.50   | 2.191  | **** |
| <b>-1</b>           | 4  | -39.36 | 5.215  | ns   |
| <b>0</b>            | 7  | -39.22 | 1.161  | **   |
| <b>2</b>            | 6  | -39.69 | 0.342  | ns   |
| <b>3</b>            | 3  | -32.71 | 0.236  | ns   |
| <b>hHv1</b>         |    |        |        |      |
| <b>0</b>            | 5  | 94.553 | 13.184 | **** |
| <b>1</b>            | 5  | 36.968 | 6.408  | **   |
| <b>2</b>            | 5  | 8.759  | 8.723  | ***  |

**Tabla Anexa C.  $V_m$  calculadas por interpolación.** Cada curva QV obtenida se interpoló individualmente para obtener la  $V_m$  (el voltaje cuando  $Q=0.5$ ) y se promediaron para obtener la SEM reportada. Las  $V_m$  se obtuvieron de la interpolación hecha sobre la curva QV promediada correspondiente. El análisis estadístico de cada mutante se hizo con una prueba ANOVA de dos vías, tomando  $\Delta pH= 0$  como control (asteriscos negros). Para comparar a Shaker WT con las mutantes se hizo lo mismo, (asteriscos rojos) esta vez tomando a Shaker WT  $\Delta pH= 0$  como control. La diferencia significativa se reporta en la columna D.

# Bibliografía

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). Molecular Biology of the Cell. In *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1201/9781315735368>

Andersen, A. P., Moreira, J. M. A., & Pedersen, S. F. (2014). Interactions of ion transporters and channels with cancer cell metabolism and the tumour microenvironment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 369(1638), 1–11. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0098>

Bare, D. J., Cherny, V. V., DeCoursey, T. E., Abukhdeir, A. M., & Morgan, D. (2020). Expression and function of voltage gated proton channels (Hv1) in MDA-MB-231 cells. *PLoS ONE*, 15(5), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227522>

Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the Sodium Channel. *J Gen Physiol.*, 70, 549–566.

Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in Voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.*, 80(2), 555, 592. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.555>

Bezanilla, F. (2005). Voltage-gated ion channels. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 4(1), 34–48. <https://doi.org/10.1109/TNB.2004.842463>

Bezanilla, F. (2008). How membrane proteins sense voltage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 323–332. <https://doi.org/10.1038/nrm2376>

Boron F., B. L. (2012). *Medical Physiology* (2nd ed.). Elsevier.

Catterall, W. A. (2010). Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>

Chen, X., Wang, Q., Ni, F., & Ma, J. (2010). Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107(25), 11352–11357. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000142107>

Cherny, V. V., Markin, V. S., & Decoursey, T. E. (1995). The Voltage-activated hydrogen ion conductance in rat alveolar epithelial cells is determined by the pH gradient. *J Gen Physiol.*, 105(6), 861–896. <https://doi.org/10.1085/jgp.105.6.861>

Cukierman, S. (2003). The transfer of protons in water wires inside proteins. Samuel Cukierman. *BioScience*, 8, 1118–1139.

- de La Rosa, V. D., Bennett, A. L., & Ramsey, I. S. (2018). Coupling between an electrostatic network and the Zn<sup>2+</sup> binding site modulates Hv1 activation. *J Gen Physiol.*, *150*(6), 863–881. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711822>
- De La Rosa, V., & Ramsey, I. S. (2018). Gating Currents in the Hv1 Proton Channel. *Biophys J.*, *114*(12), 2844–2854. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.04.049>
- Decoursey, T. E. (2015). The voltage-gated proton channel: A riddle, wrapped in a mystery, inside an enigma. *Biochemistry*, *54*(21), 3250–3268. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00353>
- DeCoursey, T. E. (2013). Voltage-gated proton channels: Molecular biology, physiology, and pathophysiology of the HV family. *Physiol Rev.*, *93*(2), 599–652. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2012>
- DeCoursey, T. E. (2018). Voltage and pH sensing by the voltage-gated proton channel, HV1. *J R Soc Interface.*, *15*(141). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0108>
- Fischer, H., Widdicombe, J. H., & Illek, B. (2002). Acid secretion and proton conductance in human airway epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.*, *282*(4 51-4), 736–743. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00369.2001>
- Frolov, R. V., Bagati, A., Casino, B., & Singh, S. (2012). Potassium channels in drosophila: Historical breakthroughs, significance, and perspectives. *J Neurogenet.*, *26*(3–4), 275–290. <https://doi.org/10.3109/01677063.2012.744990>
- Gamal El-Din, T. M., Heldstab, H., Lehmann, C., & Greeff, N. G. (2010). Double gaps along Shaker S4 demonstrate omega currents at three different closed states. *Channels*, *4*(2), 93–100. <https://doi.org/10.4161/chan.4.2.10672>
- Hille, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes. In *Sinauer Associates Inc.* (third, Issue January).
- Kim, J. W., & Dang, C. V. (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Research*, *66*(18), 8927–8930. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1501>
- Lezin, G., Kosaka, Y., Yost, H. J., Kuehn, M. R., & Brunelli, L. (2011). A one-step miniprep for the isolation of plasmid DNA and lambda phage particles. *PLoS ONE*, *6*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023457>
- Long, B., Campbell, E., MacKinnon, R. (2005). Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K<sup>+</sup> Channel. *Science New Crystal Structures*, *309*(4), 897–903. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2005.07.007>

- Ludwig, M. G., Vanek, M., Guerini, D., Gasser, J. A., Jones, C. E., Junker, U., Hofstetter, H., Wolf, R. M., & Seuwen, K. (2003). Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*, *425*(6953), 93–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature01905>
- Molleman, A. (2003). Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology. *Wiley*, 186.
- Okochi, Y., Sasaki, M., Iwasaki, H., & Okamura, Y. (2009). Voltage-gated proton channel is expressed on phagosomes. *Biochem Biophys Res Commun.*, *382*(2), 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.036>
- Perozo, E., MacKinnon, R., Bezanilla, F., & Stefani, E. (1993). Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K<sup>+</sup> channels. *Neuron*, *11*(2), 353–358. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90190-3)
- Phillips R., Kondev J. Theriot J. García H., O. N. (2013). *Physical Biology of the cell* (2nd ed.). Garland Science. <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*, *16*(3), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.01.005>
- Ramsey, I. S., Mokrab, Y., Carvacho, I., Sands, Z. A., Sansom, M. S. P., & Clapham, D. E. (2010). An aqueous H<sup>+</sup> permeation pathway in the voltage-gated proton channel Hv1. *Nature Structural and Molecular Biology*, *17*(7), 869–875. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1826>
- Ramsey, I. S., Moran, M. M., Chong, J. A., & Clapham, D. E. (2006). A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*, *440*(7088), 1213–1216. <https://doi.org/10.1038/nature04700>
- Randolph, A. L., Mokrab, Y., Bennett, A. L., Sansom, M. S. P., & Ramsey, I. S. (2016). Proton currents constrain structural models of voltage sensor activation. *ELife*, *5*(18017), 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.18017>
- Rebolledo, S., Qiu, F., & Peter Larsson, H. (2012). Molecular structure and function of Hv1 channels. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, *1*(6), 763–777. <https://doi.org/10.1002/wmts.49>
- Reshkin, S. J., Greco, M. R., & Cardone, R. A. (2014). Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, *369*(1638). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0100>
- Rudy, B., Maffie, J., Amarillo, Y., Clark, B., Goldberg, E. M., Jeong, H. Y., Kruglikov, I.,

- Kwon, E., Nadal, M., & Zagha, E. (2009). Voltage Gated Potassium Channels: Structure and Function of Kv1 to Kv9 Subfamilies. *Encyclopedia of Neuroscience*, 7, 397–425. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01630-2>
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
- Smith, R. Y., Morgan, D., Sharma, L., Cherny, V. V., Tidswell, N., Molo, M. W., & Decoursey, T. E. (2019). Voltage-gated proton channels exist in the plasma membrane of human oocytes. *Human Reproduction*, 34(10), 1974–1983. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez178>
- Starace, D. M., & Bezanilla, F. (2001). Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol.*, 117(5), 469–490. <https://doi.org/10.1085/jgp.117.5.469>
- Starace, D. M., & Bezanilla, F. (2004). A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, 427(6974), 548–553. <https://doi.org/10.1038/nature02270>
- Swanson, J. M. J., Maupin, C. M., Chen, H., Petersen, M. K., Xu, J., Wu, Y., & Voth, G. A. (2007). Proton solvation and transport in aqueous and biomolecular systems: Insights from computer simulations. *J Phys Chem B.*, 111(17), 4300–4314. <https://doi.org/10.1021/jp070104x>
- Tombola, F., Ulbrich, M. H., & Isacoff, E. Y. (2008). The Voltage-Gated Proton Channel Hv1 Has Two Pores, Each Controlled by One Voltage Sensor. *Neuron*, 58(4), 546–556. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.026>
- Whicher, J. R., & MacKinnon, R. (2016). Voltage sensing mechanisms. *Science*, 353(6300), 664–669.
- White, M. M., & Aylwin, M. (1990). Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels in *Xenopus* oocytes. *Molecular Pharmacology*, 37(5), 720–724.
- Zhang, X. C., Yang, H., Liu, Z., & Sun, F. (2018). Thermodynamics of voltage-gated ion channels. *Biophys Rep.*, 4(6), 300–319. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0074-y>
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., & Mackinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 414(6859), 43–48. <https://doi.org/10.1038/35102009>