

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

9  
2es.

" CARACTERIZACION DE UNA CORRIENTE  
ENDOGENA RECTIFICADORA ENTRANTE  
DE K<sup>+</sup> EN OVOCITOS DE RANA *Xenopus laevis* "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOME

P R E S E N T A : DICAS

RICARDO GAMBOA AVILA

CD. UNIVERSITARIA. MEXICO, D.F. 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

258181



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

*Este Trabajo lo dedicó con todo mi amor a la única persona que con su  
pequeña sonrisa alegra mi corazón y mi alma, quien con sus palabras  
siempre tiernas, me impulsa a seguir adelante, y con sus abrazos y sus  
besos me da razón suficiente como para nunca rendirme bajo cualquier  
circunstancia*

**Natalia**

*Esta tesis es el reflejo de la enseñanza y perseverancia que mis padres me han mostrado durante mi formación académica, a quienes les tengo una profunda admiración, por ser las personas que me han enseñado que nunca es suficiente para dar por terminado cualquier meta fijada en la vida.*

**A mi Papá:**

Por su gran apoyo mostrado no solo durante mi formación sino en todo momento.

**A mi Mamá:**

Por su insistencia en nunca bajar los brazos.

**Esta tesis se realizó en el departamento de Fisiología  
del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”,  
bajo la asesoría y supervisión del Dr. Rafael Mejía  
Alvarez.**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
(CONACyT) por la beca otorgada para cursar y realizar la  
presente tesis para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

# INDICE

## Página

INTRODUCCION	4
ANTECEDENTES	6
1. Propiedades funcionales de los Canales de K <sup>+</sup> Rectificadores Entrantes	6
2. Propiedades Estructurales de los K <sub>IR</sub>	9
3. Bloqueo de K <sub>IR</sub> Inducido por Cationes Externos	10
3.1 Bloqueo por Cationes Divalentes	10
3.2 Bloqueo por Cationes Monovalentes	12
3.2.1 Bloqueo por Cs <sup>+</sup>	12
3.2.2 Bloqueo por Na <sup>+</sup>	13
4. Clonación y Expresión de los Canales de K <sup>+</sup> de Rectificación Entrante	14
4.1 Subfamilia K <sub>IR</sub> 1	15
4.2 Subfamilia K <sub>IR</sub> 2	16
4.3 Subfamilia K <sub>IR</sub> 3	16
4.4 Subfamilia K <sub>IR</sub> 4 y 5	17
4.5 Subfamilia K <sub>IR</sub> 6	18
5. Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> como Sistemas de Expresión de Canales Iónicos	18
5.1 Corrientes Endógenas Presentes en Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	19
5.1.1 Corriente de Cl <sup>-</sup> Independiente de Ca <sup>2+</sup> Activada por Hiperpolarización	20
5.1.2 Corriente de Cl <sup>-</sup> inducida por Ca <sup>2+</sup>	20
5.1.3 Corriente Saliente de K <sup>+</sup> Activada por Hiperpolarización	21
5.1.4 Canales Sensibles a Estiramiento	22
5.1.5 Corriente de K <sup>+</sup> Rectificadora Entrante (K <sub>IR</sub> <sup>TENDO</sup> )	22
OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos Específicos y Diseño Experimental	25
MATERIAL Y METODOS	28
Obtención de los Ovocitos	28
Registro de K <sub>IR</sub> <sup>TENDO</sup>	28
Protocolos de Voltaje Utilizados para el Registro de la Corriente de Membrana	30
Soluciones Experimentales	31
RESULTADOS	
Capítulo I. Resta de los Componentes Lineales	32
Resta Analógica con el Protocolo p/-4	32
Resta Digital de la Corriente de Fuga	33

	<b>Página</b>
Capitulo II. Propiedades de Permeabilidad	36
Rectificación Entrante	36
Dependencia de la Amplitud de $K_{IR}^{TENDO}$ de la $\{K^+\}_o$	37
Capitulo III. Curso Temporal de $K_{IR}^{TENDO}$	41
Fase de Activación	41
Fase de Inactivación	43
Capitulo IV. Cinética Estacionaria de $K_{IR}^{TENDO}$	45
Dependencia del Voltaje y de la $\{K^+\}_o$ de la Activación	45
Dependencia del Voltaje de la Inactivación	46
Curso Temporal de la Recuperación de la Inactivación	47
Capitulo V. Sensibilidad de $K_{IR}^{TENDO}$ al Bloqueo Inducido por $Ba^{2+}$ Externo	50
Efecto sobre la Amplitud y Curso Temporal	50
Dependencia del Voltaje	51
DISCUSION	57
Corriente Endógena Rectificadora Entrante	57
Propiedades de Permeabilidad	58
Activación de $K_{IR}^{TENDO}$	59
Inactivación de $K_{IR}^{TENDO}$	59
Bloqueo de $K_{IR}^{TENDO}$ por $Ba^{2+}$ Externo	60
Comparación con otras Corrientes de $K^+$ con Propiedades de Rectificación Entrante	63
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

## I N T R O D U C C I O N

Los ovocitos de rana *Xenopus laevis* se han utilizado ampliamente como sistemas de expresión de proteínas membranales clonadas, tales como canales iónicos, receptores y transportadores. Para el caso de los canales iónicos, los elevados niveles de expresión proteica que se obtienen cuando se inyecta el RNAm en los ovocitos, permiten el análisis cualitativo detallado de las corrientes de membrana resultantes. No obstante, los ovocitos de *Xenopus* presentan algunos problemas experimentales que se tienen que considerar cuidadosamente. Por ejemplo, los ovocitos como cualquier otra célula, contienen DNA genómico cuya expresión se puede activar con la inyección de RNAm exógeno. La falta de un método que impida *a priori* la ocurrencia de tal fenómeno, complica la interpretación de las propiedades funcionales de la proteína exógena que se pretende estudiar. Por otro lado, es bien conocido que el ovocito posee una gran diversidad de canales iónicos endógenos, cuya presencia potencialmente interfiere con el estudio de la función de los canales exógenamente expresados. Algunos ejemplos de canales descritos en el ovocito incluyen: *a*) canales de Cl<sup>-</sup> (Miledi, 1982; Miledi y Parker, 1984; Takahasi y cols., 1987; Parker y Miledi, 1988*a*; Moorman y cols., 1992; Kowdley y cols., 1994, 1995); *b*) canales de Ca<sup>2+</sup> (Miledi, 1982; Parker y Miledi, 1987*a*); *c*) canales de Na<sup>+</sup> (Parker y Miledi, 1987*b*; Krafe y Volberg, 1992; Weber y cols., 1995); *d*) canales de K<sup>+</sup> (Peres y cols., 1985; Parker y Miledi, 1988*b*; Parker e Ivorra, 1990); *e*) y canales catiónicos no selectivos (Sakmann y cols., 1985; Methfessel y cols., 1986; Yang y Sachs, 1989 y 1990; Arellano y cols., 1995). La amplitud de la corriente que fluye por la mayoría de éstos canales es muy variable entre los ovocitos de diferentes ranas, llegando en algunos casos a prácticamente no existir. En todo caso, usualmente se conoce de antemano la existencia de alguna corriente endógena del ovocito, que pudiera complicar la interpretación del comportamiento de los canales iónicos exógenos. De tal forma, el conocimiento detallado de las corrientes endógenas ha permitido diseñar estrategias experimentales biofísicas y/o farmacológicas para separarlas de las exógenas. Asimismo, este conocimiento ha llevado a definir su papel funcional en la generación de potenciales de fertilización y en la regulación del proceso de maduración de los ovocitos.

Recientemente en nuestro laboratorio, iniciamos el uso de ovocitos de *Xenopus* como sistema de expresión heteróloga para el estudio de la relación estructura-función de los canales

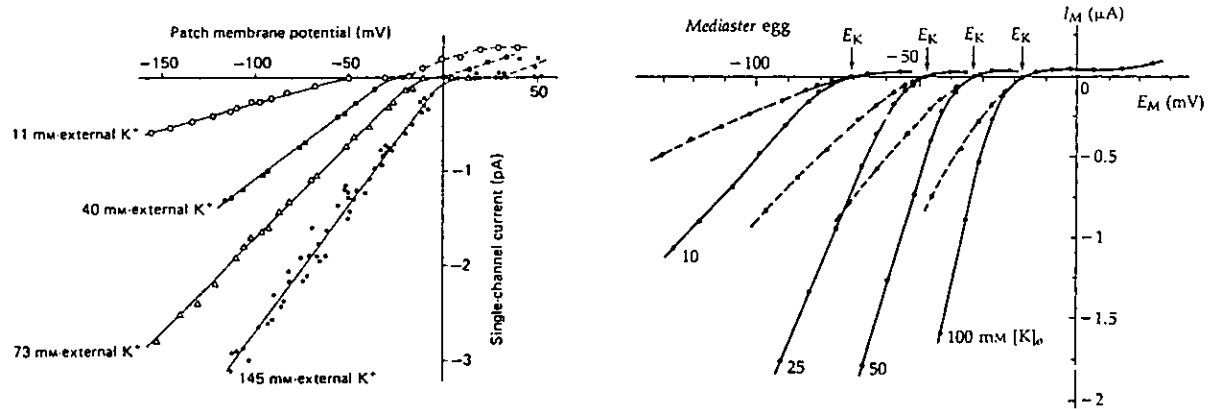


rectificadores entrantes de  $K^+$  ( $K_{ir}$ ) de corazón. La razón por la que seleccionamos los ovocitos de *Xenopus* es que la mayoría de los estudios en canales recombinantes de  $K_{ir}$ 's se han llevado a cabo en éstas células. Sin embargo, se ha reportado por diversos grupos que los ovocitos expresan de manera endógena una corriente de  $K^+$  con propiedades de rectificación entrante ( $K_{ir-Endo}$ ; Kubo y cols., 1993a y 1993b; Tzounopoulos y cols., 1995; Amarillo y cols., 1996; Hedin y cols., 1996; Bauer y cols., 1996). Debido a que la mayoría de esos estudios se enfocaron en la caracterización de las clonas de  $K_{ir}$  expresadas exógenamente, las propiedades funcionales de  $K_{ir-Endo}$  habían sido soslayadas hasta muy recientemente. Para nuestra mayor sorpresa, encontramos que  $K_{ir-Endo}$  se expresa de una manera considerablemente más consistente de lo que los reportes indican. Por lo tanto, y con el fin de interpretar correctamente nuestros resultados con los  $K_{ir}$  cardiacos, nos dimos a la tarea de estudiar con detalle las propiedades biofísicas de  $K_{ir-Endo}$  a nivel macroscópico. De tal forma, el objetivo de la presente tesis fue el describir  $K_{ir-Endo}$  en términos de: a) sus propiedades de permeabilidad iónica; b) curso temporal de su activación y decaimiento; c) dependencia del voltaje de su cinética de apertura y cierre; y d) su sensibilidad al bloqueo inducido por el  $Ba^{2+}$  externo. Adicionalmente, intentamos comparar el perfil funcional de  $K_{ir-Endo}$  con el desplegado por otros  $K_{ir}$ 's. Nuestros resultados indican que pese a que  $K_{ir-Endo}$  muestra similitudes importantes con otros  $K_{ir}$ 's, también exhibe características únicas, tales como cinética de apertura y cierre fuertemente dependientes de voltaje y una respuesta compleja al  $Ba^{2+}$  externo por el cual además presenta menor afinidad. Estas peculiaridades podrían resultar de diferencias en la estructura de la proteína del canal tan considerables y extensas que  $K_{ir-Endo}$  bien podría representar una nueva subfamilia de  $K_{ir}$ 's.

## A N T E C E D E N T E S

### 1. Propiedades Funcionales de los Canales de $K^+$ Rectificadores Entrantes ( $K_{ir}$ ).

El primero en describir la propiedad de rectificación entrante en los canales de  $K^+$  fue Katz en 1949, en músculo esquelético de rana. Katz también fue el primero en utilizar el término de rectificación "anómala", para diferenciarla de la rectificación saliente o "normal", que la mayoría de los canales presentan. La característica distintiva de esta corriente es que su conductancia aumenta conforme  $E_m$  se hace más negativo y disminuye cuando se despolariza. Como se muestra en la Figura 1, las propiedades de la rectificación entrante de los  $K_{ir}$  se han estudiado tanto a nivel macroscópico (Harvey y Ten Eick, 1988) como unitario (Sakman y Trube, 1984; Kurachi, 1985).



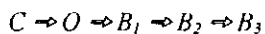
**Figura 1. Propiedades Distintivas de  $K_{ir}$ .** A. Relación I - V de la corriente unitaria de  $K_{ir}$  de células ventriculares de cobayo en diferentes  $[K^+]_o$ . La concentración de  $K^+$  en la pipeta se indica en cada curva (tomado de Sakmann y Trube, 1984). B. Relación I - V de la corriente macroscópica de ovocitos de estrella de mar en diferentes  $[K^+]_o$  (10, 25, 50 y 100 mM) en un medio libre de  $Na^+$ . La línea continua, indica la corriente instantánea y la línea discontinua, la corriente en el estado estacionario (tomado de Hagiwara, Miyazaky y Rosenthal, 1976).

Esta corriente anómala o de rectificación entrante se ha estudiado ampliamente en preparaciones tan diversas como: estrella de mar (Hagiwara y Takahashi, 1974; Hagiwara, 1976; Hagiwara y Yoshii, 1979); ovocitos de tunicados (Ohmori, 1978 y 1980; Fukishima, 1982); músculo esquelético (Almers, 1972a y b; Adrian y cols., 1979; Standen y Stanfield, 1979; Hestrin, 1981; Leech y Stanfield, 1981); y músculo cardíaco (Sakman y Trube, 1984; Harvey y Ten Eick, 1989; Shimoni y cols, 1992; Whaler, 1992; Matsuda y Sperelakis, 1993).

Estas propiedades funcionales se ilustran en la relación I - V de la Figura 1, en donde se observa que el comportamiento de la corriente exhibe una fuerte rectificación entrante, la cual se demuestra por el hecho de que a potenciales negativos a  $E_k$  la amplitud es significativamente mayor que a valores positivos a  $E_k$ . Otra característica distintiva de los  $K_{ir}$  es que su cinética de apertura y cierre (o de compuerta) depende tanto del voltaje como de la concentración de  $K^+$  extracelular ( $[K^+]_o$ ), siendo prácticamente independiente de  $[K^+]_i$ ; (Hagiwara y Yoshii, 1979; Leech y Stanfield, 1981).

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la rectificación que muestran los  $K_{ir}$  se basa en la existencia de una partícula bloqueadora intracelular (Sakmann y Trube, 1984). Inicialmente se pensó que tal partícula podía ser el  $Na^+$ , quien es capaz de bloquear los canales de  $K^+$  desde el interior (Harvey y Ten Eick, 1988). Sin embargo, experimentos llevados a cabo con la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*), en su configuración de célula completa (*whole cell*) y en ausencia de  $Na^+$  extracelular, revelaron que la conductancia de la corriente rectificadora entrante de  $K^+$  fue menor en ausencia de  $Na^+$  que en su presencia (Hagiwara y Yoshii, 1979; Silver y De Coursey, 1990). Posteriormente, la atención cambió hacia el ion  $Mg^{2+}$ , constituyente normal del líquido intracelular que participa como cofactor en muchas reacciones que involucran ATP y GTP (Arellano y cols, 1995). La hipótesis de que el  $Mg^{2+}$  es el responsable de la rectificación entrante en los  $K_{ir}$  se vio fortalecida por los hallazgos casi simultáneos de Matsuda y cols. (1987) y del grupo de Vandenberg (1987). Ambos laboratorios demostraron la dependencia de la rectificación entrante del  $Mg^{2+}$  intracelular, ya que cuando eliminaron este catión de la solución intracelular, apareció una corriente saliente a través de  $K_{ir}$ , cuyo comportamiento fue totalmente ohmico. Tal observación se extendió a otros canales cardíacos de  $K^+$  rectificadores entrantes, incluyendo el canal sensible a ATP ( $I_{KATP}$ ) y el activado por acetilcolina ( $I_{KACH}$ ).

Con éstas observaciones se propuso de manera especulativa un modelo para explicar el comportamiento cinético de los  $K_{ir}$ . Cuando  $E_r$  se encuentra en valores cercanos a  $E_k$ , el canal fluctúa continua y aleatoriamente entre un estado abierto a otro cerrado. Este comportamiento determina el nivel de actividad basal (*background*) o estacionaria, responsable del componente independiente del tiempo que despliegan los  $K_{ir}$  a nivel macroscópico. Cuando la membrana se despolariza, el canal ingresa de manera reversible a un estado de bloqueo inducido por el  $Mg^{2+}$  intracelular. Tal bloqueo aparece cuando el  $Mg^{2+}$  se repele electrostáticamente por la positividad interna creciente (o negatividad interna decreciente) e ingresa a la región más estrecha del poro de conducción del canal. Debido a su mayor tamaño el  $Mg^{2+}$  no cruza este sitio, por lo que permanece ahí bloqueando intermitentemente la luz del canal. Durante la repolarización, la negatividad interna se restablece, lo que obliga al  $Mg^{2+}$  a abandonar el interior del poro del canal. Ishihara y cols. (1989) sugirieron que cada una de las tres subunidades que constituyen el canal  $K_{ir}$ , pueden ser bloqueadas por iones de  $Mg^{2+}$  de manera independiente. De tal forma, la actividad del canal en presencia de  $Mg^{2+}$  interno (2 - 10  $\mu$ M) se podría describir por el siguiente modelo de Markov:

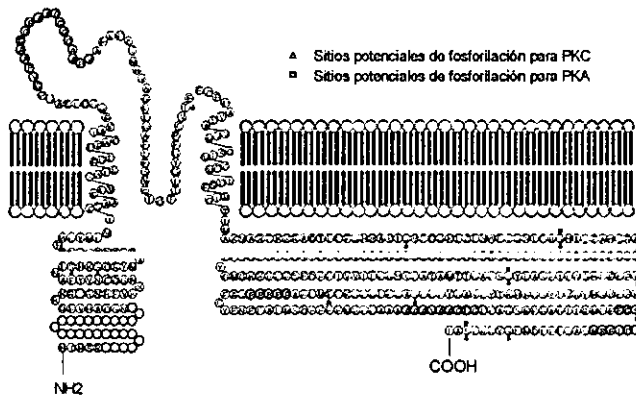


donde  $C$  indica el estado cerrado,  $O$  el estado abierto y  $B_1$ ,  $B_2$  y  $B_3$ , indican cada uno de los estados (subestados) bloqueados por  $Mg^{2+}$  intracelular.

Estudios recientes derivados de la clonación de los  $K_{ir}$  (French y cols., 1994; Kubo y cols., 1993, Makhina y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Ashen y cols., 1995; Wible y cols., 1995; Hedin y cols., 1996) han permitido reconocer que la rectificación entrante también resulta de la acción de factores intracelulares solubles. Numerosos estudios bioquímicos se han realizado recientemente con el objetivo de identificar la naturaleza de tales factores. Los resultados de tales trabajos indican que diversas poliaminas intracelulares, tales como espermina, espermidina, putrescina y cadaverina, también participan en la rectificación entrante de los  $K_{ir}$  (Lopatin y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Fakler y cols., 1995, Lopatin y cols., 1995). El mecanismo de rectificación inducido por tales aminas es en esencia de naturaleza similar al propuesto para el  $Mg^{2+}$ , es decir que resulta de la ocupación intermitente y dependiente del voltaje del poro de conducción del canal.

## 2. Propiedades Estructurales de los $K_{ir}$ .

Los canales  $K_{ir}$  son proteínas homotetraméricas, en donde cada subunidad posee únicamente dos segmentos hidrofóbicos transmembranales conocidos como M1 y M2 (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993). Estos dos segmentos están separados por una región denominada H5, que supuestamente forma el poro de conducción por donde los iones cruzan la proteína (Heginbotham y cols., 1992, Tagliatalata y cols., 1994). La Figura 2 muestra la estructura básica para todos los  $K_{ir}$ . Las regiones de mayor homología estructural entre los  $K_{ir}$ 's se localizan en los dominios transmembranales, mientras que la región H5 presenta elevada homología con todos los canales de  $K^+$ . En contraste, los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje son heterotetrámeros, en los que cada subunidad se forma de seis segmentos transmembranales. Los  $K_{ir}$  contienen sólo una estructura central interna, la cual forma la región responsable de la selectividad al  $K^+$ . El poro de conducción interactúa fuertemente no sólo con los iones que cruzan el canal, sino también con los que no (bloqueadores extracelulares como  $Na^+$ ,  $Cs^+$  y  $Ba^{2+}$ , e intracelulares como  $Mg^{2+}$ ).



**Figura 2.** Secuencia Primaria del Canal de  $K^+$  Rectificador Entrante Clonado de Hipocampo Humano (HHR). El canal es un homomultímero de 4 subunidades. El poro está formado por la región H5 que se localiza entre los segmentos transmembranales M1 y M2 de cada subunidad. La región N y C terminal se localizan en el citoplasma celular. Se muestran los posibles sitios de fosforilación por PKC y PKA. (Périer, 1994).

Con el enorme desarrollo de la biología molecular se ha podido clonar recientemente una gran cantidad de isoformas de  $K_{ir}$ , entre las que destacan, por sólo citar algunos ejemplos: IRK1 de macrófago de ratón (Kubo y cols., 1993); ROMK1 de riñón de rata (Ho y cols, 1993); GIRK1 (Dascal y cols., 1993; Kubo y cols, 1993)  $rcK_{ATP}$  (Ashford y cols., 1994) de corazón de rata; HIRK1 de hipocampo humano (Hishihara y Hiraoka, 1994); y RBHK1 de corazón de conejo (Ishii y Hiraoka, 1994). Asimismo, llama la atención la gran diversidad de propiedades funcionales y mecanismos de regulación tan variados que tales isoformas presentan. Por ejemplo, GIRK1 se activa a través de una proteína G;  $rcK_{ATP}$  aumenta su actividad (probabilidad de apertura,  $P_o$ ) en presencia de ATP, mientras que todos ellos son activados por voltajes hiperpolarizantes. Por otra parte, el grado de rectificación también es una propiedad que aunque presente en todos los  $K_{ir}$ 's su magnitud es muy variable, siendo ROMK1 quien la presenta quizás de manera más débil.

### *3. Bloqueo de $K_{ir}$ Inducido por Cationes Externos.*

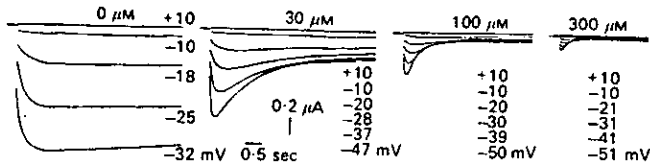
#### *3.1 Bloqueo por Cationes Divalentes.*

Los cationes divalentes en la solución externa modifican las propiedades cinéticas de apertura y cierre de algunos canales iónicos (Eyring y cols., 1949; Frankenhaeuser y Hodgkin, 1957). Por ejemplo, en miocitos cardíacos de cobayo la amplitud de la corriente macroscópica de  $K^+$  rectificadora entrante, disminuye por la adición de  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  a la solución externa (Biermans, y cols., 1987). A nivel unitario, los iones  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  y  $Sr^{2+}$  inducen una disminución de la conductancia de los  $K_{ir}$  (Kell y DeFelice, 1988; Matsuda, 1988; Standen y Stanfield, 1978; Arellano, Woodward, Miledi, 1995). Se ha supuesto que este efecto se deba a una disminución de  $[K^+]$  en el vestíbulo externo del canal, lo cual posiblemente resulta de la repulsión electrostática generada por acumulación de cationes divalentes, los cuales son atraídos por las cargas negativas de la superficie de la membrana (Arellano, Woodward, Miledi, 1995). Alternativamente, se ha sugerido que la disminución en la conductancia se explica por bloqueo del canal inducido por los propios iones de  $Mg^{2+}$  y/o  $Ca^{2+}$ , los cuales al ser impermeables, entran al poro del canal, obstruyendo de ésta manera la conducción del  $K^+$ . El hecho de que tanto el  $Mg^{2+}$  como el  $Ca^{2+}$  puedan bloquear el canal también desde el lado interno apoya fuertemente esta hipótesis (Matsuda y cols., 1987; Mazzanti y DiFrancesco, 1989).

### 3.1.1. Bloqueo por $Ba^{2+}$ .

Es bien conocido que el  $Ba^{2+}$  induce bloqueo del canal de  $K^+$  de rectificación saliente en diferentes preparaciones, tales como axón gigante de calamar (Gilbert y cols, 1969), fibras musculares de invertebrados (Werman y Grundfest, 1961), y vertebrados (Sperelakis, Schneider y Harris, 1977; Standen y Stanfield, 1978) y ovocitos de estrella de mar (Hagiwara y cols, 1978). A nivel macroscópico el efecto del  $Ba^{2+}$  sobre  $K_{ir}$  se caracteriza por inducir una disminución en la corriente máxima (pico) y por aumentar la velocidad de decaimiento de la corriente. Ambos efectos muestran una clara dependencia del potencial de membrana y del tiempo (Hagiwara y cols, 1978). Es decir, el bloqueo de  $K_{ir}$  inducido por  $Ba^{2+}$  externo aumenta conforme el potencial de membrana se hace más negativo, y su magnitud es mayor sobre el componente estacionario de la corriente que sobre el transitorio, como se muestra en la figura 3. Por otro lado, el efecto del  $Ba^{2+}$  muestra una dependencia de  $[K^+]_o$ , ya que la magnitud del bloqueo disminuye conforme aumenta  $[K^+]_o$ . Esta disminución esta dada por el hecho de que al aumentar la  $[K^+]_o$ , el potencial transmembrana disminuye, evidenciando de ésta manera la dependencia del voltaje.

El bloqueo de  $K_{ir}$  por el  $Ba^{2+}$  tiene un comportamiento muy similar al observado en presencia de  $Cs^+$ , especialmente en relación a su dependencia del voltaje (Hagiwara y cols, 1976). Sin embargo, la magnitud de tal dependencia es distinta. Se ha calculado que para el efecto del  $Cs^+$  el valor del parámetro que refleja tal dependencia  $\mu$  es  $\sim 1.4$  (Hagiwara y cols, 1978), mientras que para el  $Ba^{2+}$  es de 0.64 (Hagiwara y cols, 1978). Por otra parte, el bloqueo de la corriente estacionaria observado en presencia de  $Cs^+$  es mayor que el inducido por  $Ba^{2+}$ . La constante de tiempo para el bloqueo por  $Cs^+$  es de 50 ms (Hagiwara y cols, 1978), mientras que para el  $Ba^{2+}$  es de 2 a 3 seg (Hagiwara y cols, 1978), en ambos casos  $V_{III} = -140$  mV a una concentración de 0.01 mM



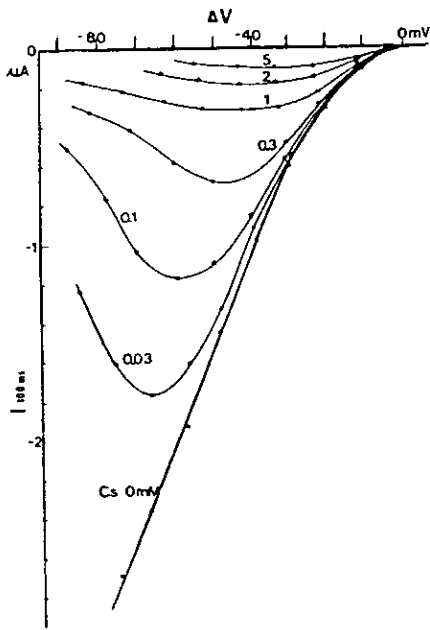
**Figura 3.** Efecto del  $Ba^{2+}$  Externo Sobre  $I_{K1}$ .  $I_{K1}$  se registró a diferentes potenciales de membrana, con una  $[K^+]_o$  de 25mM, y en presencia de diferentes concentraciones de  $Ba^{2+}$  en la solución externa (0, 30, 100, 300  $\mu$ M). HP = -51 mV (Tomado de Hagiwara y cols, 1978).

### 3.2. Bloqueo por Cationes Monovalentes.

#### 3.2.1 Bloqueo inducido por $Cs^+$

Al igual que el  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , el  $Cs^+$  induce un bloqueo de  $K_{ir}$  cuando se agrega a la solución externa (Figura 4; Hagiwara y Takahashi 1974). En huevos de estrella de mar la magnitud de tal bloqueo depende de la concentración, del tiempo y del voltaje (Hagiwara y cols, 1976). En miocitos ventriculares de gato el  $Cs^+$  (0.01 mM) modifica significativamente la corriente sólo a potenciales muy negativos ( $> -120$  mV; Harvey Y Ten Eick, 1988). El efecto característico del  $Cs^+$  sobre la corriente macroscópica de  $K_{ir}$ , no es sólo la disminución de su amplitud, sino la modificación de su curso temporal. En miocitos de ventrículo de gato, el  $Cs^+$  (0.01 mM) extracelular induce un aumento, dependiente del voltaje, en la velocidad de decaimiento de la corriente (Harvey and Ten Eick, 1989). Este efecto llevó a pensar que el  $Cs^+$  al igual que otros cationes monovalentes, como el  $Na^+$  y el  $Li^+$ , potencian el proceso de inactivación del canal, ya sea por comportarse como verdaderas partículas de inactivación o por inducir alostéricamente cambios en la cinética de tal proceso (Harvey y Ten Eick, 1989). De acuerdo con los valores de  $K_d$  para el bloqueo del canal, la potencia de bloqueo entre algunos cationes monovalentes es la siguiente:  $Cs^+$  ( $K_d = 1.11 \times 10^{-6}$  M)  $>$   $Na^+$  ( $5.62 \times 10^{-3}$  M)  $>$   $Li^+$  ( $1.40 \times 10^{-2}$  M); (Harvey y Ten Eick, 1989).





**Figura 4.** Bloqueo de  $I_{K1}$  Inducido por  $Cs^+$  Externo. Relación I - V de  $I_{K1}$  registrada 100 ms después de aplicar el pulso de voltaje, con 25 mM de  $K^+$  y 0  $Na^+$  en la solución externa, y en presencia de diferentes concentraciones de  $Cs^+$ ; en ovocitos de estrella de mar. (Tomado de Hagiwara y cols., 1976.)

### 3.2.2. Bloqueo por $Na^+$

Los canales  $K_{ir}$  se caracterizan por presentar mecanismos de conducción iónica que depende fuertemente de  $[Na^+]_o$  (Harvey y Ten Eick, 1988). Tal dependencia se ejerce tanto sobre las propiedades de permeabilidad como de la cinética de apertura y cierre. La remoción del  $Na^+$  extracelular reduce significativamente la amplitud de la corriente al pico (Harvey y Ten Eick, 1988), pero disminuye el decaimiento de la corriente (Ohmori, 1978). Esto último se refleja en el hecho de que a potenciales más negativos que  $E_k$  el componente estacionario se comporta linealmente con respecto al voltaje. En condiciones fisiológicas ( $[Na^+]_o$  normal) tanto en músculo esquelético como en miocitos ventriculares de gato, la corriente normalmente despliega un decaimiento pronunciado a potenciales muy negativos. Se ha supuesto que tal decaimiento se debe, por lo menos parcialmente, a un bloqueo dependiente del tiempo y del voltaje (Standen y Stanfield, 1978; Harvey y Ten Eick, 1988). Por otro lado, Josephson y Brown (1986) sugirieron que en miocitos ventriculares de rata la inactivación de  $K_{ir}$  resulta de un cambio intrínseco en la

cinética de apertura y cierre del canal  $K_{ir}$ . Finalmente, se ha postulado que el efecto inducido por los cationes monovalentes extracelulares ( $Na^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Li^+$ ) se explica por una competencia por el sitio de unión posiblemente involucrado con el proceso de inactivación del canal

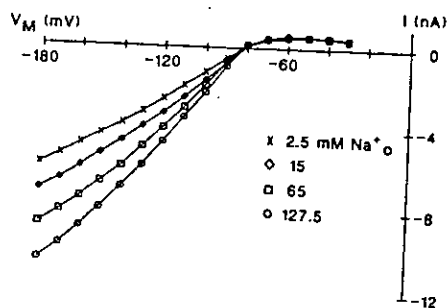


Figura 5. Efecto del  $Na^+$  Sobre la Conductancia Unitaria de  $I_{K1}$ . Relación  $I - V$  de la corriente unitaria de  $I_{K1}$  en miocitos ventriculares de gato, registrada en presencia de diferentes concentraciones de  $Na^+$  extracelular (2.5, 15, 65 y 127.5 mM) (Tomado de Harvey y Ten Eick, 1989).

#### 4. Clonación y Expresión de los Canales de $K^+$ de Rectificación Entrante.

Hace cuatro años dos grupos reportaron por primera vez y casi simultáneamente la clonación del gen que codifica a los  $K_{ir}$ 's, ROMK1 y IRK1 (Ho y cols., 1993; Kubo y cols., 1993, respectivamente). Este fue el primer paso en una larga serie de trabajos relacionados con la clonación de numerosas isoformas y con estudios de la relación estructura-función de los  $K_{ir}$ 's. La clonación de estos canales ha permitido descubrir una nueva familia de genes que codifican proteínas con características estructurales y funcionales distintas a la superfamilia de los canales de  $K^+$  operados por voltaje ( $K_v$ ) (Figura 6).

Debido a la falta de ligandos naturales o sintéticos, selectivos para los canales  $K_{ir}$ 's, la clonación de los primeros miembros [Kir 1.1a (ROMK1), Kir 2.1 (IRK1) y Kir 3.1 (GIRK1)] de esta nueva familia de canales se logró hasta 1993, cuando por medio de expresión funcional en ovocitos de *Xenopus laevis* se clonó por primera vez una gen que codificaba para un canal de  $K^+$  rectificador entrante (Ho y cols, 1993; Dascal y cols, 1993; Kubo y cols, 1993). Posteriores estudios de la relación estructura-función evidenciaron que estos canales  $K_{ir}$ , al igual que los canales  $K_v$  (MacKinnon, 1991) se ensamblan en la membrana en forma tetramérica (Yang y cols, 1995; Glowatzky y cols, 1995). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, su diseño

estructural es totalmente distinto. Por su perfil funcional (especialmente relacionado a su regulación), se han identificado varias subfamilias pertenecientes a la familia de los  $K_{ir}$ 's. A continuación se mencionan brevemente algunos de los aspectos más destacables de cada una.

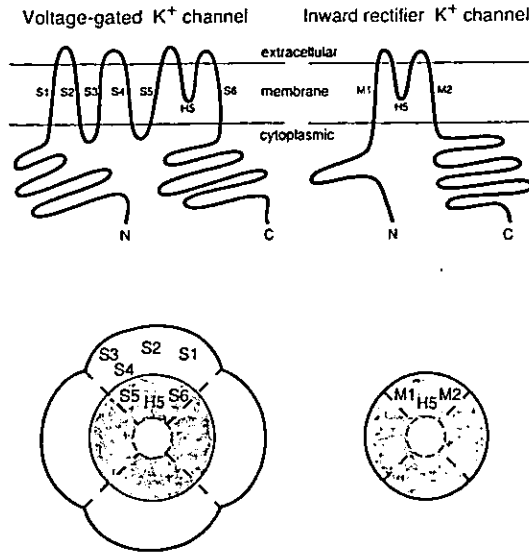


Figura 6. Topología de los Canales  $K_{ir}$  y su Analogía con los Canales de  $K^+$  Operados por Voltaje. Los segmentos M1 y M2 de  $K_{ir}$  se muestran como los espacios transmembranales y la secuencia H5 desde la superficie extracelular hasta la membrana. (Tomado de Kubo y cols, 1993).

#### 4.1. Subfamilia $K_{ir}$ 1.1.

$K_{ir}$  1.1 (ROMK1) se clonó a partir de riñón de rata, donde se expresa predominantemente, para de esta manera ser el primer  $K_{ir}$  clonado (Ho y cols., 1993). Reportes recientes indican que también se expresa en varios tejidos cerebrales de manera significativa (Ho y cols., 1993; Kenna, 1994; Boin y cols., 1995). Trabajos posteriores han reportado la existencia de isoformas con propiedades funcionales muy similares a  $K_{ir}$  1.1, las cuales se generan mediante empalme alternativo en la región 5' (Shuck y cols., 1994; Yano y cols., 1994; Zhou y cols., 1994). A diferencia de otras subfamilias de  $K_{ir}$ ,  $K_{ir}$  1.1 presenta una asa de unión a fosfatos en la región C

terminal (Ho y cols., 1993). Tal característica apoya la suposición de que la regulación de su activación mediada por ATP implica fosforilación de la proteína que constituye el canal. De hecho, el trabajo de Xu y cols. (1996) demuestra que tales sitios son sustrato para la fosforilación mediada por la proteína cinasa dependiente de cAMP.

#### 4.2. Subfamilia $K_{ir} 2$ .

Hasta la fecha se han clonado tres miembros de la subfamilia  $K_{ir} 2$ , los cuales difieren en el valor de su conductancia unitaria (medida en 140 mM de  $[K^+]_o$ ,  $K_{ir} 2.1 = 20$  pS,  $K_{ir} 2.2 = 35$  pS,  $K_{ir} 2.3 = 10$  pS), y en su sensibilidad a la fosforilación por segundos mensajeros (Chang y cols., 1996; Fakler y cols., 1994; Henry y cols., 1996). Los miembros de la subfamilia  $K_{ir} 2$  se expresan principalmente en corazón y en sistema nervioso (Ishii y cols., 1994; Kubo y cols., 1993; Perier y cols., 1994; Raab-Graham y cols., 1994; Wible y cols., 1995). Al igual que otros  $K_{ir}$ 's, se caracterizan por presentar rectificación dependiente del tiempo y del voltaje, la cual es prácticamente indistinguible de los canales nativos  $I_{K1}$  del corazón o de los canales  $K_{ir}$  en células de la glia.

#### 4.3. Subfamilia $K_{ir} 3$ .

La subfamilia  $K_{ir} 3.0$  esta formada por canales activados por proteína G. El primer canal de esta subfamilia se clonó a partir de aurícula de rata, y se expresó en ovocitos de *Xenopus laevis* (Dascal y cols., 1993; Kubo y cols., 1993). Actualmente existen numerosas evidencias de que en corazón, cerebro y tejidos endócrinos, estos canales conducen una corriente que se activa por un receptor acoplado a una proteína G (Ferrer y cols., 1995; Karschin y cols., 1994; Kubo y cols., 1993). A partir de corazón de rata Ashford y cols. (1994) clonaron un cDNA que denominaron  $rcK_{ATP}$  y el cual codifica para un canal  $K_{ATP}$ . Este canal es un miembro de la subfamilia  $K_{ir} 3$  ( $K_{ir} 3.4$ ). Krapivinsky y cols. (1995) mostraron que la subfamilia 3.4 se coensambla con  $K_{ir} 3.1$  (GIRK1) para formar el canal sensible a acetilcolina ( $I_{KACH}$ ) y que ellos no forman el canal  $K_{ATP}$  en forma monomérica. Otros estudios muestran un acoplamiento entre los diferentes miembros de la subfamilia  $K_{ir} 3$  (Duprat y cols., 1995; Ferrer y cols., 1995). Existe evidencia sustancial de la activación directa del canal por la subunidad  $G\beta\gamma$  que se une a las regiones amino o carboxilo

terminal del canal (Huang y cols., 1995; Krapivinsky y cols., 1995). También hay evidencias de una unión directa de la proteína G (subunidad  $G\alpha$ ) con el canal (Huang y cols., 1995).

Duprat y cols. (1995) encontraron que el canal  $I_{K_{ACH}}$  se forma por el ensamblaje heteromultimérico de  $G_{IRK1}$  y  $C_{IR}$  (proteína de origen cardíaco que forma un canal rectificador entrante). Hedin y cols. (1996) reportaron que cuando se expresa en ovocitos de *Xenopus*  $G_{IRK1}$  en ausencia de  $C_{IR}$ , la corriente resultante es significativamente menor (~80%) que cuando se coexpresan ambas proteínas. Si  $G_{IRK1}$  no es capaz de formar canales homomultiméricos, entonces los canales observados en ausencia de  $C_{IR}$ , pueden resultar de la combinación de  $G_{IRK1}$  con una proteína endógena del ovocito que sea capaz de sustituir a  $C_{IR}$ . Esta posibilidad se ha confirmado y la proteína endógena del ovocito se ha denominado  $X_{IR}$  (Hedin y cols., 1996).

$X_{IR}$  se considera como un nuevo miembro de la subfamilia  $K_{IR}$  3 el cual se ha clasificado como  $K_{ir}$  3.5. Tiene un tamaño de 1.2 Kb formada de una cadena peptídica de 404 aminoácidos. La secuencia de  $X_{IR}$  y de  $C_{IR}$  muestran una homología del 74.9% a nivel de aminoácidos. Los ovocitos que expresan  $X_{IR}$  en ausencia de  $G_{IRK1}$  muestran un corriente sensible a acetilcolina. Por otro lado, Hedin y cols. (1996) mostraron que en ovocitos de *Xenopus*  $C_{IR}$  y  $X_{IR}$  pueden participar juntos en la formación de canales de  $K^+$  estimulados por proteínas G. Cuando  $X_{IR}$  y  $G_{IRK1}$  son coinyectados en ovocitos, la amplitud de la corriente máxima (medida al pico) registrada a -100 mV y en presencia de acetilcolina, es de 5.4  $\mu$ A. Este valor es similar al observado cuando son coinyectados en ovocitos de *Xenopus*  $C_{IR}$  y  $G_{IRK1}$  (7.2  $\mu$ A a -80 mV, Krapivinsky y cols, 1995). Cuando sólo  $G_{IRK1}$  se expresa, la amplitud es de 1.3  $\mu$ A, mientras que cuando se expresa sólo  $X_{IR}$  tal valor es de 0.2  $\mu$ A. La conductancia unitaria del canal coexpresando  $X_{IR}/G_{IRK1}$  es de 38 pS en presencia de 140 mM de  $K^+$  extracelular.

#### 4.4. Subfamilias $K_{ir}$ 4 y 5.

Dos subfamilias más de canales  $K_{ir}$  han sido descritas en cerebro ( $K_{ir}$  4 y  $K_{ir}$  5, Bond y cols., 1994; Takumi y cols., 1995). Cuando en ovocitos de *Xenopus laevis* se expresa únicamente  $K_{ir}$  4.1, se observa la formación de canales rectificadores entrantes homotetraméricos, lo cual no sucede con  $K_{ir}$  5.1 (Bond y cols., 1994). Estos dos canales pueden coexpresarse en forma heteromultimérica, en forma de dímeros o tetrámeros, arreglados de manera específica.

#### 4.5. Subfamilia $K_{ir}$ 6.

$K_{ir}$  1.1 fue el primer canal  $K_{ir}$  en ser clonado (Ho y cols., 1993) el cual contiene sitios de unión al ATP, y las propiedades de rectificación de los canales expresados son similares a las de los canales  $K_{ATP}$  endógenos de riñón (Lu y MacKinnon, 1994). Basados en la homología de  $K_{ir}$  1.1 y de otros miembros de la familia  $K_{ir}$ , Inagaki y cols. (1995) aislaron y expresaron un gen que codifica para un canal de  $K^+$  con propiedades de rectificación entrante, el cual llamaron uKATP1 ( $K_{ir}$  6.1). Una isoforma específica del páncreas ( $K_{ir}$  6.2) fue encontrada posteriormente para codificar una subunidad del canal  $K_{ATP}$  (Inagaki y cols., 1995), pero la expresión activa de este canal requiere la coexpresión de  $K_{ir}$  6.2 o  $K_{ir}$  6.1 (Ammala y cols., 1996), y dicha coexpresión presenta una alta afinidad al receptor para sulfonilurea (SUR) (Aguilar y cols., 1995). La mutación de residuos homólogos unidos al poro en  $K_{ir}$  1.1 (Lu y MacKinnon, 1994) y  $K_{ir}$  6.2 (Shyng y cols., 1996), demostraron que la forma  $K_{ir}$  6.2 forma el poro del canal en una forma análoga a la formación de otras subunidades  $K_{ir}$  y la subunidad SUR le da una cierta afinidad a nucleótidos. Esto sugiere una asociación física entre  $K_{ir}$  6.2 y SUR y abre la posibilidad de que estos canales posiblemente están regulados por asociación con una proteína reguladora (McNicholas y cols., 1996).

#### 5. Ovocitos de *Xenopus laevis* como Sistema de Expresión Heteróloga de Canales Iónicos.

*Xenopus laevis* es una especie de rana originaria de Sudáfrica, caracterizada por una ovogénesis continua. Por tal motivo, estas células se han utilizado ampliamente como sistemas de expresión heteróloga de diversas proteínas transmembranales. En las hembras *Xenopus* cada ovario está formado de 24 lóbulos, los cuales varían su tamaño según la estación. Los ovocitos se pueden encontrar en 6 diferentes estadios, del I al VI (Dumont T.J., 1970). Los ovocitos maduros, correspondientes a los estadios V y VI, presentan un diámetro promedio de 1.2 mm, y se caracterizan por presentar dos hemisferios claramente delimitados, denominados polo animal (oscuro) y polo vegetal (claro). Además de su óptima expresión proteica, la razón por la que se utilizan ovocitos maduros para estudios de expresión funcional, es que su tamaño permite microinyectarlos en forma individual y su manejo por separado.

Los ovocitos de *Xenopus laevis* se utilizaron por primera vez como instrumento para estudiar los mecanismos de traducción proteica en 1971 por Gurdon y cols. en Inglaterra.

Estas células representan un valioso modelo experimental para el estudio de la relación estructura-función de los canales iónicos. La razón de ello es su gran capacidad para manejar e incorporar información genética exógena, además de su capacidad para insertar complejos receptor/canal en la membrana plasmática. La microinyección de ovocitos de *Xenopus* ha llevado a la expresión heteróloga de numerosos canales, bombas y receptores, y a la clonación y caracterización de genes que codifican para éstos. Por otro lado, la capacidad de los ovocitos para incorporar mRNA permite la cuantificación de los mRNAs específicos en diferentes tejidos o estados fisiológicos.

Algunos problemas experimentales a considerar cuando se utilizan los ovocitos como sistema de expresión funcional son: a) la cantidad de proteína que se puede sintetizar varía de un ovocito a otro (aún cuando se obtengan de la misma rana), b) los ovocitos tienen DNA genómico cuya expresión se puede activar con la inyección de RNAm exógeno. Además, el ovocito posee una gran diversidad de canales iónicos endógenos, cuya presencia potencialmente interfiere con el estudio de la función de los canales exógenamente expresados.

A continuación se describen las características funcionales más importantes de algunos de los canales descritos en el ovocito.

### 5.1 Corrientes Endógenas del Ovocito de *Xenopus laevis*.

Desde etapas tempranas de maduración los ovocitos de *Xenopus laevis* expresan una gran diversidad de corrientes iónicas. Hasta la fecha se han identificado y caracterizado numerosos canales endógenos, los que incluyen: a) canales de  $\text{Cl}^-$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Miledi, 1982, Miledi y Parker, 1984, Takahashi, Neher y Sakmann, 1987); b) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por despolarización (Miledi, 1982; Barish 1983; Leonard y cols., 1987) y por hiperpolarización (Parker y cols., 1984; Parker y Miledi, 1987); c) dos tipos de canales de  $\text{Na}^+$  (Baud, Kado y Marcher, 1982; Parker y Miledi, 1987) d) canales de  $\text{Cl}^-$  independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por hiperpolarización (Parker y Miledi, 1988a) e) una gran variedad de canales de  $\text{K}^+$  (Peres y Bernardini, 1985; et al, Parker y Miledi, 1988b; Parker y Iborra, 1990), y f) canales activados por estiramiento (Methfessel, Witzemann, Takahashi, Mishina, 1986). Cuando se intenta estudiar las propiedades funcionales de canales iónicos exógenos expresados en ovocitos a partir de la

inyección de mRNA, la presencia de estos canales endógenos puede interferir de manera muy importante en la interpretación de los resultados.

Las corrientes mencionadas anteriormente están casi siempre presentes y probablemente tienen una función en el desarrollo de los ovocitos o del embrión. Un ejemplo de esto es la corriente de  $\text{Cl}^-$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual parece estar involucrada en la fertilización (Whitaker y Steinhardt, 1982).

#### *5.1.1. Corriente de $\text{Cl}^-$ Independiente de $\text{Ca}^{2+}$ , Activada por Hiperpolarización.*

Esta corriente entrante se activa mediante hiperpolarización de la membrana, con un umbral entre  $-100$  y  $-110$  mV. Es acarreada principalmente por iones  $\text{Cl}^-$ , y presenta un curso temporal caracterizado por una activación seguida de una inactivación muy lenta, que no alcanza a ser total aun con pulsos de varios segundos de duración. Una característica importante es que esta corriente de  $\text{Cl}^-$  no desaparece al eliminar el  $\text{Ca}^{2+}$  externo, ni en presencia de un agente quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA), o por la adición de  $\text{Mn}^{2+}$  (10 mM). Lo cual indica que esta corriente es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, por lo tanto es diferente de la corriente de  $\text{Cl}^-$  transitoria dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Peres y Bernardini, 1983; Parker y cols., 1984).

Este canal es semejante a los canales de  $\text{Cl}^-$  activados por hiperpolarización descritos en neuronas de *Aplysia* (Chesnoy-Marchais, 1983; Chesnoy-Marchais y Evans, 1986) y de rata (Selyanko, 1984). Llama la atención que esta corriente muestra una amplitud mayor cuando se registra inmediatamente después de que los ovocitos se han disecado del ovario, y desaparece casi completamente después de que los ovocitos se han mantenido en un medio de cultivo (medio Barths a  $16^\circ\text{C}$ ) por pocos días. Este comportamiento puede indicar que el ovario produce algún factor que sirve para regular la actividad funcional de los canales de  $\text{Cl}^-$ , o su expresión en la membrana.

#### *5.1.2. Corriente de $\text{Cl}^-$ Inducida por $\text{Ca}^{2+}$ .*

La despolarización de la membrana provoca la aparición de una corriente saliente acarreada principalmente por  $\text{Cl}^-$ , y cuyo potencial umbral de activación se encuentra alrededor de 0 mV (Miledi, 1982; Barish, 1983). A voltajes cercanos al potencial de equilibrio del  $\text{K}^+$  ( $-100$  mV, en solución Ringer) esta corriente de  $\text{Cl}^-$  es francamente entrante, y su amplitud disminuye



conforme el potencial se vuelve más positivo, para invertirse aproximadamente a  $-20$  mV, lo cual es muy cercano al potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$  en el ovocito, apoyando la idea de que es acarreada fundamentalmente por  $\text{Cl}^-$  (Kusano y cols 1982). Una característica de esta corriente es que su amplitud disminuye significativamente con la inyección intracelular de EGTA (Peres y Bernardini, 1983; Parker y cols., 1984). Tal comportamiento sugiere que la activación de esta corriente depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular, la cual incrementa transitoriamente por el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Con el fin de probar esta hipótesis, Miledi (1982) fue capaz de bloquear la corriente al quitar el  $\text{Ca}^{2+}$  de la solución externa, o mediante adición de agentes bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Más tarde Miledi y Parker (1984) demostraron que esta corriente de  $\text{Cl}^-$  también se puede activar por la inyección de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, en ausencia de cualquier cambio en el potencial de membrana. De hecho, la inyección de  $\text{Ca}^{2+}$  induce corrientes de  $\text{Cl}^-$  de mayor amplitud que las obtenidas con pulsos despolarizantes. Por otro lado, la inyección intracelular de  $\text{Ba}^{2+}$  (25 pM) o  $\text{Sr}^{2+}$  (60 pM) también activa estos canales, aunque de manera menos efectiva que el  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el  $\text{Mg}^{2+}$  no provoca efecto alguno (Miledi y Parker, 1984).

### 5.1.3. Corriente Saliente de $\text{K}^+$ Activada por Hiperpolarización

Parker e Ivorra (1990) describieron una corriente de  $\text{K}^+$  activada por despolarización, la cual presenta un umbral de activación de  $+80$  mV. Esta corriente se caracteriza por un curso temporal transitorio, determinado por una fase de activación (tiempo al pico entre 10 y 100 ms), seguida de una de inactivación, las cuales son dependientes del potencial de membrana y del tiempo. La amplitud de la corriente alcanza su valor máximo ( $\sim 700$  nA) alrededor de  $+50$  mV. Contrario a lo que muestra la corriente de  $\text{Cl}^-$  activada por hiperpolarización, esta corriente se empieza a observar después de aproximadamente cinco días de incubación. Su amplitud es independiente de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , por lo cual no se afecta por los bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  o por quelantes del  $\text{Ca}^{2+}$  como EGTA. Las características de esta corriente de  $\text{K}^+$  son muy distintas a las corrientes de  $\text{K}^+$  transitorias salientes reportadas en diversas preparaciones. Entre las diferencias más importantes se encuentran que la corriente del ovocito sólo se activa con grandes despolarizaciones, su sensibilidad al tetraetilamonio es significativamente menor, y es insensible a

4-aminopiridina. Otra característica inusual de esta corriente de  $K^+$  es que no es bloqueada por  $Ba^{2+}$  o  $Cs^+$ , los cuales generalmente bloquean a estas corrientes rectificadoras tardías.

#### 5.1.4. Canales Activadas por Estiramiento.

Los canales activados por estiramiento (SA) son transductores mecanoeléctricos, los cuales pueden servir como una vía independiente para el transporte de  $Ca^{2+}$  al interior celular. La mayoría de las membranas celulares expresan este tipo de canales iónicos, los cuales se abren cuando aumenta la tensión en la membrana (Sachs, 1988; Morris, 1990). Con base en sus propiedades de permeabilidad los canales SA se clasifican en dos grupos: a) catiónicos no selectivos y b) selectivos a  $K^+$ . Los canales SA no selectivos se bloquean por  $Ca^{2+}$  (Cooper y cols, 1986; Yang y Sachs, 1989) y otros cationes divalentes, como  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  (Rae y Mathias, 1987) y gadolinio (Yang y Sachs, 1988). En contraste, los canales SA selectivos a  $K^+$  son considerablemente más permeables al  $K^+$  que al  $Na^+$  (Sidgursen y cols., 1987, Dings y cols., 1988), y se bloquean por  $Cs^+$  y  $Ba^{2+}$ . En estos canales SA los tiempos de apertura son mayores en presencia de  $Na^+$  que en  $Ca^{2+}$ . Este efecto muestra una clara dependencia de la concentración, y es totalmente independiente del voltaje.

La densidad de canales SA varía entre 0.3 y 2 por  $\mu m^{-2}$  (Sakmann y cols., 1985). Esto indica que los canales activados por estiramiento pueden representar una fracción importante para la entrada del  $Ca^{2+}$ , ya que además estos canales son dependientes de voltaje y se abren con voltajes despolarizantes (Guharay, 1985). A nivel unitario, la actividad de los canales SA se puede confundir con la que muestran los canales  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, por lo cual se utiliza el  $Gd^{3+}$ , el cual bloquea los canales activados por estiramiento en concentraciones de 10  $\mu M$  (Xian-Cneng y cols 1989).

#### 5.1.5 Corriente de $K^+$ Rectificadora Entrante ( $K_{IR-ENDO}$ ).

El primer reporte de la existencia de  $K_{ir-Endo}$  apareció en el trabajo de Kubo y cols. (1993), en el cual presentaron la estructura primaria y la expresión funcional del primer clon de un canal de  $K^+$  rectificador entrante (mIRK1), obtenido a partir de una línea celular de macrófago de ratón. En ese estudio Kubo y cols. reportaron la presencia ocasional de una corriente rectificadora entrante en ovocitos de *Xenopus* sin inyectar (nativos), la cual no fue afectada por la adición de

100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ba}^{2+}$  en la solución externa. En un trabajo más reciente del mismo grupo,  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$  se observó en ovocitos de rana *Xenopus* inyectados con cRNA que codifica para una proteína G exógena ( $\text{G}\alpha_{i2}$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_2$ ) (Kubo et al., 1993b).

Más recientemente, Tzounopoulos y cols. (1995) encontraron que la expresión de BIR9 (miembro no conductor de la familia de los  $\text{K}_{\text{ir}}$ ) induce la expresión de una corriente endógena que despliega un curso temporal muy similar al de  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$ .

Schreibmayer y cols. (1996) reportaron que en ovocitos de *Xenopus* inyectados con los clones de la proteína G acoplada con el canal rectificador entrante GIRK1 y del receptor muscarínico m2R, existe una corriente endógena de  $\text{K}^+$  dependiente del tiempo. En este trabajo, tal corriente se evidenció elevando  $[\text{K}^+]_o$  de 2 a 96 mM y a un potencial de membrana de  $-80$  mV. A pesar de que  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$  se caracteriza por su dependencia temporal, es interesante que dicha corriente no se bloqueara en presencia de 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ba}^{2+}$  en la solución externa, sugiriendo la posibilidad de que se tratara de  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$ .

Hedin y cols. recientemente (1996) clonaron una subunidad de un canal de  $\text{K}^+$  rectificador entrante a partir de ovocitos de *Xenopus laevis*, que por su similitud estructural con  $\text{C}_{\text{IR}}$  se denominó  $\text{X}_{\text{IR}}$ . Esta proteína potencia la expresión de GIRK1 en ovocitos. Si esta subunidad de canal es una parte funcional o constituye  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$  es algo que no se ha estudiado hasta el momento.

Recientemente Amarillo y cols. (1996) presentaron a la Biophysical Society evidencias de la presencia en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, de una corriente de  $\text{K}^+$  rectificadora entrante, transitoria e insensible a  $\text{Ba}^{2+}$  que se potencia con la exposición de los ovocitos a agentes reductores permeantes en la membrana.

Finalmente, Bauer y cols. (1996) describieron por primera vez las propiedades funcionales más importantes de  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$ . Sin embargo, y pese a que en tal estudio se describen la dependencia al  $[\text{K}^+]_o$ , la relación corriente-voltaje, el curso temporal del decaimiento, la inactivación estacionaria, y el efecto de diversos bloqueadores de  $\text{K}_{\text{ir}}$ 's, no se presenta un perfil biofísico completo de las propiedades de permeabilidad y cinética de apertura y cierre del canal  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$ . Por lo que la identidad del canal responsable permanece como una incógnita. Por otro lado, tampoco se dan las bases para suponer la posible estructura de la proteína responsable de esta corriente.

Así, en la presente tesis presentamos el perfil biofísico completo de  $K_{ir-Endo}$ , consistente en:  
a) curso temporal de  $K_{IR-ENDO}$  b) cinética estacionaria de  $K_{IR-ENDO}$ , c) sensibilidad de  $K_{IR-ENDO}$  al bloqueo por  $Ba^{2+}$  externo

## OBJETIVO GENERAL.

Identificar y caracterizar el canal responsable de la corriente rectificadora entrante de  $K^+$  presente en ovocitos maduros de rana *Xenopus laevis*. Para tal fin se registró la corriente a nivel celular mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.

### Objetivos Específicos y Diseño Experimental.

*Objetivo #1. Aislar el componente debido a  $K_{ir-Endo}$  de los componentes lineales por fuga inespecífica y capacidad eléctrica.* Con el fin de describir el perfil funcional de  $K_{ir-Endo}$  fue necesario primero separarla de otros componentes que contribuyen a la corriente de membrana registrada en nuestras condiciones experimentales.

- a) *Corriente capacitiva.*- Debido a la gran amplitud y lento curso temporal que la corriente capacitiva típicamente tiene en los ovocitos, no se pudo eliminar con los métodos tradicionales de resta en línea (p.e. protocolo p/-4). Para evaluar el curso temporal de  $K_{ir-Endo}$ , la corriente capacitiva se eliminó digitalmente, mediante la resta fuera de línea de una función exponencial ajustada a los datos.
- b) *Corriente de fuga.*- No se utilizó el protocolo p/-4, debido a la posibilidad de que  $K_{ir-Endo}$  pudiera estar presente en los prepulsos, generando con ello artefactos de resta. Para eliminar la corriente de fuga se midió la resistencia de la membrana mediante la aplicación de pulsos a diferentes voltajes inmediatamente después de que  $K_{ir-Endo}$  se inactivó completamente.

*Objetivo #2. Definir las propiedades de permeabilidad de  $K_{ir-Endo}$ .* Las propiedades de permeabilidad de  $K_{ir-Endo}$  se definieron con base en el estudio de su rectificación, dependencia al  $[K^+]_o$ , selectividad y mecanismo de conducción iónica a través del canal.

- a) *Propiedades de rectificación.*- La rectificación de  $K_{ir-Endo}$  se evaluó mediante el registro de la corriente con pulsos de voltaje a diversos potenciales de membrana, durante 80 ms, y a partir de un potencial de mantenimiento (HP) de 0 mV. Este valor de HP se estableció con el fin de evitar el registro de los canales cuya inactivación fuera sensible a voltaje. La

determinación de la relación entre la amplitud de la corriente, tanto al pico como al final del pulso (tardía), con el potencial de membrana permitió cuantificar la rectificación de  $K_{ir-Endo}$ .

b) *Dependencia al  $[K^+]_o$* .  $K_{ir-Endo}$  se registró en presencia de diferentes concentraciones de  $[K^+]_o$ . (ver material y metodos).  $K_{ir-Endo}$  se registró con el protocolo descrito anteriormente, en cada una de las concentraciones mencionadas. Asimismo, se evaluó la amplitud de  $K_{ir-Endo}$  tanto al pico como tardía, en función al potencial de membrana.

c) *Selectividad de Conducción*. La comprobación de que  $K_{ir-Endo}$  es en efecto un canal de  $K^+$  se fundamentó en la medición del potencial de inversión aparente y su evaluación en función del  $[K^+]_o$ . Los valores experimentales se compararon con los que predice la ecuación de Nernst para un canal perfectamente selectivo al  $K^+$ .

d) *Conducción del  $K^+$* . El mecanismo de conducción del  $K^+$  a través de  $K_{ir-Endo}$ , se evaluó a partir de la identificación el tipo de función que define la dependencia de la conductancia pendiente (medida sólo en el rango de voltajes en donde la corriente se comporta en forma ohmica) de la  $[K^+]_o$ . La ecuación que mejor describió los datos experimentales nos dió los parámetros de conducción.

*Objetivo #3. Describir la cinética de apertura y cierre de  $K_{ir-Endo}$* . La cinética de apertura y cierre de  $K_{ir-Endo}$  se definió mediante la cuantificación de sus dos parámetros fundamentales: a) curso temporal de los procesos de activación e inactivación; b) su dependencia del voltaje en el estado estacionario.

a) *Curso temporal*.- El curso temporal del proceso de activación se cuantificó mediante la medición de la constante de activación y su dependencia con el voltaje en diferentes  $[K^+]_o$ 's. Similarmente, el curso temporal de la inactivación se analizó ajustando una función exponencial al decaimiento de la corriente, midiendo su constante de tiempo y evaluándola en función al voltaje en diferentes  $[K^+]_o$ 's. Asimismo, el curso temporal de la recuperación del estado inactivado se estudió mediante la medición de la amplitud máxima de  $K_{ir-Endo}$  registrada a intervalos variables después de que se indujo su inactivación.

b) *Dependencia del voltaje en el estado estacionario*.- La dependencia del voltaje del parámetro de activación se determinó mediante el análisis de la relación entre la

conductancia cuerda, medida en diferentes  $[K^+]_o$ 's, y el potencial de membrana. El parámetro de inactivación se evaluó con el tradicional protocolo de doble pulso.

*Objetivo # 4. Determinar la sensibilidad de  $K_{ir-Endo}$  al bloqueo inducido por  $Ba^{2+}$  externo.*- El bloqueo de  $K_{ir-Endo}$  inducido por  $Ba^{2+}$  extracelular se definió en términos de su dependencia del tiempo y del voltaje.

*a) Dependencia del tiempo.*- La dependencia temporal del bloqueo de  $K_{ir-Endo}$  inducido por  $Ba^{2+}$  externo se estudió mediante la medición de la amplitud de la corriente pico y tardía, en presencia de diferentes  $[Ba^{2+}]_o$ 's.

*b) Dependencia del voltaje.*- El comportamiento de la fracción de corriente resistente al bloqueo en función del potencial de membrana a diferentes  $[Ba^{2+}]_o$ 's, permitió evaluar la dependencia del efecto del  $Ba^{2+}$  del voltaje. Este análisis se realizó tanto en la corriente pico como en la tardía.

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

### Obtención de los ovocitos

Los experimentos se realizaron en ovocitos de ranas adultas de *Xenopus laevis*. Las ranas se anestesiaron por inmersión en una solución de MS-222 al 0.17 % (ac.3-aminobenzóico, eter etílico y metano sulfonato, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Se hizo una incisión abdominal de aprox. 1 cm de longitud. Se disecaron los lóbulos ováricos y se colocaron en una solución ND96 (ver tabla 2). Los ovocitos en etapa de maduración entre V y VI (de 50 a 100 por rana) se disecaron, y se colocaron en una solución estéril de ND96, suplementada con gentamicina y estreptomycin (50  $\mu\text{g/ml}$  y 100 unidades/ml, respectivamente) con el fin de evitar la contaminación por bacterias y/o hongos. La capa folicular fue removida mecánicamente mediante la utilización de forceps o pinzas de punta fina. Se les dio un tiempo de recuperación de entre 6 y 8 horas a 18°C en la solución ND96 suplementada.

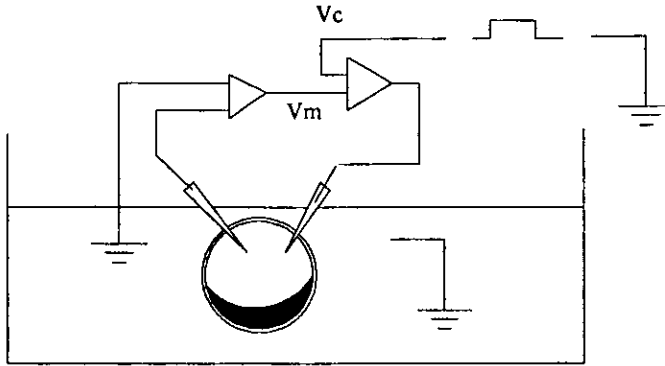
### Registro de $K_{ir-Endo}$ .

La corriente de membrana se registró con la técnica de fijación de voltaje con 2 microelectrodos (Miledi R, 1982), cuyo fundamento se ilustra esquemáticamente en la Figura 6. Los ovocitos se colocaron en una cámara de perfusión continua con solución Ringer (1.5 ml/min a 33-25°C). Los microelectrodos se fabricaron con vidrio de borosilicato (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Las pipetas tuvieron un diámetro en la punta de cerca de 1  $\mu\text{m}$ . Una vez llenos con una solución de KCl 3M, tuvieron una resistencia que varió entre 0.5 - 5 M $\Omega$ . La inserción de los electrodos y la medición de las propiedades pasivas (potencial de reposo y resistencia de la membrana) se llevo a cabo en solución Ringer normal a temperatura ambiente.

La  $I_{K-endo}$  se registró en 55 ovocitos de 8 ranas distintas. La mayoría de los registros se llevaron a cabo en la solución control (ver tabla de soluciones). Para los experimentos de selectividad para el  $K^+$ ,  $K_{ir-Endo}$  se registró en presencia de diferentes  $[K^+]_o$ 's (20, 50, 75, 100 y 125 mM). Para ello el KCl se reemplazó por NaCl. Para explorar el efecto del  $Na^+$  extracelular sobre  $K_{IR-endo}$ , se utilizó una solución sin  $Na^+$ . Para el estudio del bloqueo por el  $Ba^{2+}$  extracelular sobre  $K_{IR-endo}$  se agregaron diferentes concentraciones de  $Ba^{2+}$  (0.3, 0.5, 1, 3, 7 mM) en la solución del baño la cual se perfundió constantemente con la solución control. Para identificar  $K_{IR-endo}$  como



diferente de las corrientes rectificadoras activadas por estiramiento ( $I_{SA}$ ), se utilizó  $GdCl_3$  bloqueador selectivo de  $I_{SA}$ , a concentraciones que variaron entre 10 - 50  $\mu M$  en la solución de perfusión.

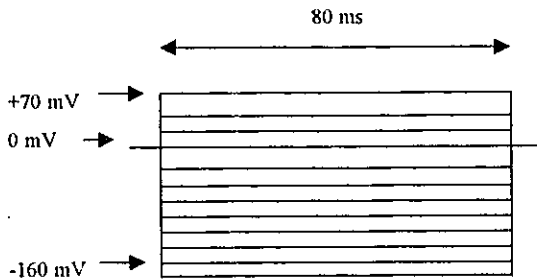


**Figura 6.** Fijación de Voltaje con dos Microelectrodos. Diagrama de la configuración de registro de la corriente de membrana. El microelectrodo de la izquierda midió el potencial membranar ( $V_m$ ), como la diferencia de potencial entre el interior celular y el baño (tierra). El electrodo de la derecha inyectó la corriente necesaria para mantener en cero la diferencia entre  $V_m$  y el potencial comando ( $V_c$ ), esta corriente correspondió a la corriente de membrana.

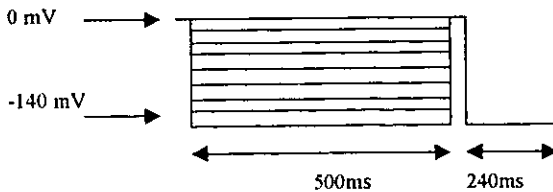
Los electrodos de registro se insertaron al mismo tiempo, preferentemente sobre el polo animal. Una vez insertados, y con el fin de evitar interferencias capacitivas (*stray capacitance*) entre los microelectrodos, se colocó entre ellos un escudo metálico (cobre) conectado a tierra. Con el fin de obtener el máximo blindaje, el escudo se colocó a una altura de 1 - 2 mm de la solución del baño. Los microelectrodos se conectaron al amplificador de registro (Geneclamp 500, Axon Instruments, Inc) mediante pastillas de  $Ag/AgCl$ . Con el fin de evaluar el estado del ovocito, el potencial de membrana se registró continuamente durante el curso del experimento. Para el registro de la corriente de membrana se utilizaron diferentes protocolos de voltaje (ver más adelante) generados con una computadora personal compatible con IBM 486DX2 de 50 MHz. Las señales de corriente y de voltaje se digitalizaron mediante un convertidor digital-analógico/análógico-digital de 12 bits (TLM-1, Labmaster, Axon Instruments, Foster City, CA). Las señales digitalizadas se almacenaron en la computadora personal y analizaron mediante diferentes programas comerciales (pClamp v. 6.0, Excel v. 5.0, y Origin v. 3.5).

## Protocolos de Voltaje Utilizados para el Registro de la Corriente de Membrana.

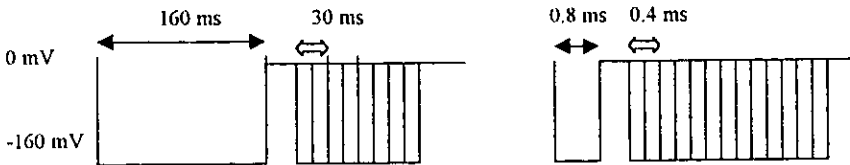
1. *Protocolo para el registro de la corriente con rectificación entrante.* A partir de un potencial de mantenimiento de 0 mV se aplican pulsos despolarizantes de 80 ms de duración desde un potencial de -160 hasta +70 mV en pasos de 10 mV. El propósito de este protocolo es el de activar una corriente de rectificación entrante, observando la corriente al pico y dando un pulso de 80 ms de duración para conocer que tanto decae la corriente durante su estado estacionario.



2. *Protocolo de doble pulso para analizar la inactivación de la corriente entrante dependiente de voltaje.* Este consiste en aplicar un protocolo de doble pulso, partiendo de un potencial de sostenimiento de 0 mV se aplica un prepulso de -140 mV hasta 0 mV en intervalos de 5 mV con una duración de 500 ms. Posteriormente se da un pulso de prueba partiendo nuevamente de 0 mV hasta -140 mV con una duración de 240 ms. Con este protocolo se observa primero la activación de la corriente endógena y una vez activados los canales y que se alcance el estado estacionario se aplica el segundo pulso con el propósito de observar la inactivación en el estado estacionario.



3. *Protocolo de doble pulso para analizar la recuperación de la inactivación de la corriente entrante.* A partir de un potencial de mantenimiento de 0 mV se aplica un pulso despolarizante de -160 mV con una duración de 160 mseg. Posteriormente el prepulso y el pulso de prueba tienen un periodo de recuperación a 0 mV durante 30 ms. El pulso de prueba tiene una duración que va incrementándose en un rango de 30 y 200 ms a un potencial de -160 mV. Con este protocolo de doble pulso se observa la inactivación de los canales y la recuperación de la corriente dependiente de tiempo. Para poder visualizar de manera más completa esta recuperación de la inactivación de los canales en el tiempo se realizó otro protocolo de doble pulso pero ahora con una duración del prepulso de 800 ms y un pulso de prueba de 400 ms, mientras que la duración del interpulso tuvo un rango entre 0.3 y 2.4 seg. Partiendo de un potencial de sostenimiento de 0 mV hasta -160 mV.



**Tabla 2.** Soluciones experimentales (concentraciones expresadas en mM, a menos que se especifique).

COMPOSICION	SOLUCION				
	ND96	Ringer Normal	Control	Sin Na <sup>+</sup>	Sigworth
NaCl	-	117	48	-	-
N-metil-glucamina	-	-	-	48	-
KCl	2	2.5	50	50	10
K DL-Aspartato	-	-	-	-	140
CaCl <sub>2</sub>	1.8	1.8	0.2	0.2	10
MgCl <sub>2</sub>	1	-	1	1	-
HEPES	5	5	5	5	-
Gentamicina	50 (µg/ml)	-	-	-	-
Estreptomina	100 (U/ml)	-	-	-	-

Todas las soluciones se ajustaron a pH = 7.4 y se usaron a temperatura ambiente.

# RESULTADOS

## CAPITULO I

### RESTA DE LOS COMPONENTES LINEALES

#### *Resta Analógica con el Protocolo p/-4.*

Con el fin de restar los componentes iónicos lineales (corriente de fuga) de la corriente de membrana, se probaron dos métodos. El primero consistió en la resta analógica en línea mediante el uso del tradicional protocolo p/-4. La Figura 7 muestra un resultado representativo de uno de estos experimentos.

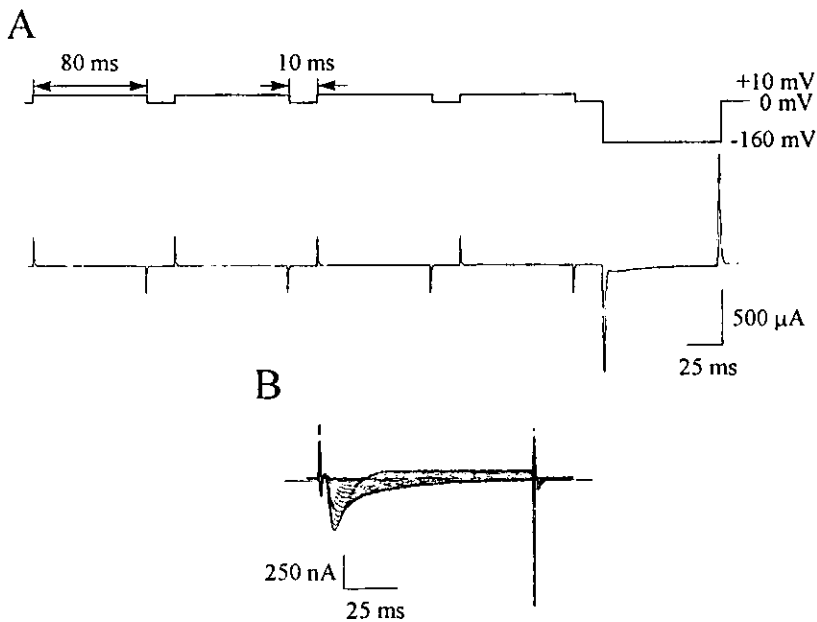


Figura 7. *Resta Analógica de los Componentes Lineales con el Protocolo p/-4.* A. Los componentes lineales capacitivo e iónico se restaron analógicamente con el uso del protocolo ilustrado en la parte superior. Los trazos de corriente obtenidos durante los prepulsos a +10 mV se promediaron, se escalaron por un factor de 4 y el resultado se restó del trazo de corriente obtenido durante el pulso de prueba (-160 mV). B. El resultado de tal resta consistió en una familia de trazos compuestos de corriente iónica no lineal (principalmente  $K_{ir-Endo}$ ).

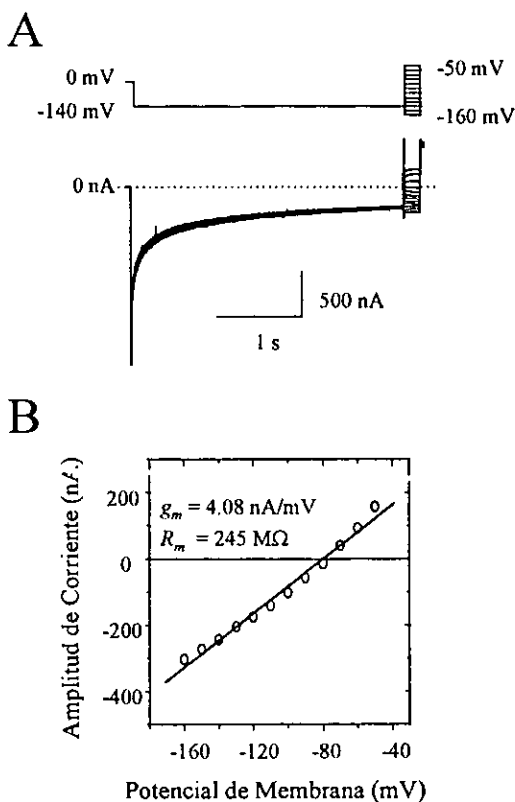
Este protocolo consistió en la aplicación de un tren de 4 prepulsos a partir de un HP de 0 mV, con una amplitud +10 mV, separados entre sí por intervalos de 10 ms, y con una duración igual a la del pulso de prueba (80 ms). Al final de este tren se aplicó un pulso de prueba a diferentes potenciales de membrana. Excepto para el registro que se muestra en la figura, la adquisición de la señal se inició al aplicar el pulso de prueba. La corriente registrada durante el tren de prepulsos se promedió, se escaló por un factor de 4 y se sumó al trazo de corriente adquirida durante el pulso de prueba. El resultado consistió en un trazo de corriente compuesto exclusivamente por corriente iónica no lineal ( $K_{ir-Endo}$ ), eliminándose con este procedimiento la corriente capacitiva lineal y la corriente iónica de fuga.

Desafortunadamente, debido a que la rectificación de  $K_{ir-Endo}$  no fue absoluta (a potenciales por arriba de  $E_K$  siempre se registró corriente saliente) su amplitud fue igual a cero sólo cuando  $V_m$  coincidió con el potencial de inversión de  $K_{ir-Endo}$ . De tal forma, siempre existió la posibilidad de activar alguna fracción de esta corriente al aplicar los prepulsos. Por lo tanto, al restar el promedio de la corriente obtenida durante los prepulsos con la corriente del pulso de prueba, se generaron artefactos que impidieron la correcta interpretación de los resultados. La familia de trazos obtenida con este método de resta que se muestra en el panel B de la Figura 7 confirmó tal suposición. El curso temporal de la activación se vio interrumpido por residuos no lineales de la capacidad del ovocito, cuyo origen no se investigó. Por otro lado, y de mayor impacto para nuestro estudio, fue que el curso temporal del decaimiento de la corriente se deformó a tal grado que cambió su dirección hacia el sentido saliente. Esta observación confirmó la idea de que durante los prepulsos se activó alguna fracción significativa de  $K_{ir-Endo}$ .

### ***Resta Digital de la Corriente de Fuga.***

Con base en lo anterior se decidió probar un método alternativo para restar los componentes lineales de la corriente de membrana. Este método consistió en restar digitalmente y fuera de línea los componentes lineales debidos exclusivamente a la corriente de fuga. Sólo en casos particulares, como en el análisis del curso temporal de  $K_{ir-Endo}$ , se eliminó la corriente capacitiva. La Figura 8 muestra el fundamento de este método.

El registro de la corriente de fuga se realizó con el protocolo de pulsos ilustrado en la parte superior del panel A de la Figura 8. Este protocolo consistió en la aplicación de un prepulso a  $-140$  mV durante 3 s con el fin de activar  $K_{ir-Endo}$  en su totalidad y además permitir su máximo decaimiento (suponiendo que es completo). Inmediatamente después se aplicó un pulso de prueba con una duración de 200 ms, a diferentes potenciales de membrana. Durante este pulso se registró una corriente, cuya amplitud exhibió un comportamiento perfectamente ohmico. Al final del pulso de prueba también se observó la activación de una corriente con propiedades de rectificación saliente. Por este motivo se midió la corriente de membrana inmediatamente después de haberse completado la relajación de la corriente capacitiva transitoria. Su amplitud se graficó en función del potencial de membrana, y el resultado se ilustra en el panel B de la Figura 8.



**Figura 8. Medición del Componente Iónico Lineal de la Corriente de Membrana.** A. La corriente de fuga se registró con el protocolo ilustrado en la parte superior. A partir de un HP de 0 mV se dió un prepulso a  $-140$  mV, durante 3 s, seguido de un pulso de prueba durante 200 ms a diferentes potenciales. B. La amplitud de la corriente en el pulso de prueba medida inmediatamente después de la relajación del transitorio capacitivo, se graficó en función del voltaje. El valor de la  $R_m$  se obtuvo de la pendiente de la recta ajustada a los puntos experimentales.

La pendiente de la recta ajustada a los puntos experimentales reflejó directamente la conductancia de la membrana, la cual tuvo un valor de 4.08 nA/mV (4.08  $\mu$ S). El valor del recíproco de la conductancia fue equivalente a la resistencia de la membrana ( $R_m$ ), y fue de 245 M $\Omega$ . Con este valor y aplicando la ley de Ohm ( $I=V/R$ ) se restó digitalmente una corriente proporcional al  $V_m$ . El resultado de tal procedimiento se ilustra en la familia de trazos mostrada en el panel A la Figura 9. Este método resultó ser significativamente mas confiable, especialmente para evaluar la real amplitud y el curso temporal de  $K_{ir-Endo}$ . Por lo tanto, los resultados que se muestran en la presente tesis se procesaron con este método. Como se mencionó anteriormente, la corriente capacitiva se restó solamente cuando estudiamos el curso temporal de  $K_{ir-Endo}$ . El método de sustracción de la corriente capacitiva se describe en la sección correspondiente.

## CAPITULO II

### PROPIEDADES DE PERMEABILIDAD DE $K_{IR-ENDO}$

#### Rectificación Entrante.

En la Figura 9 se muestra una familia de trazos representativa de la corriente de membrana, registrada en ovocitos de *Xenopus laevis* bajo condiciones de fijación de voltaje y en presencia de 50mM de  $K^+$  en la solución del baño (solución control).

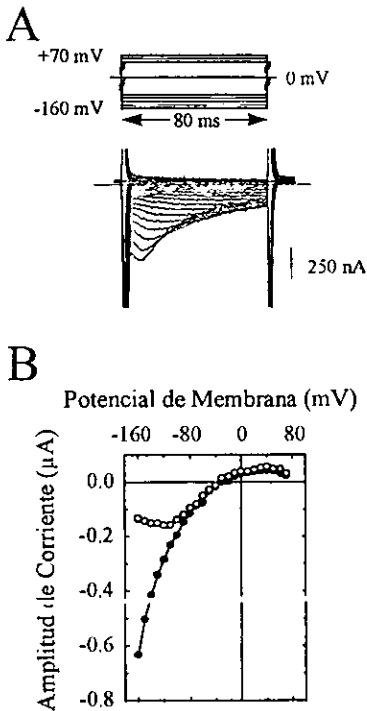


Figura 9. Rectificación Entrante de  $K_{IR-ENDO}$ . A. Familia de trazos obtenida después de restar los componentes lineales de fuga. La corriente de membrana se registró en presencia de 50 mM de  $[K^+]_o$ , a diferentes potenciales, y mediante el protocolo de pulsos ilustrado en la parte superior. B. Relación I - V de las corriente de membrana medida al pico (círculos negros) y al final del pulso (círculos blancos).

Como se mencionó anteriormente, los componentes iónicos lineales se restaron digitalmente mediante el uso de la ley de Ohm y con el valor de  $R_m$ . La parte superior del panel A de la Figura 9, se ilustra el protocolo de pulsos que se utilizó para registrar la corriente, el cual fue

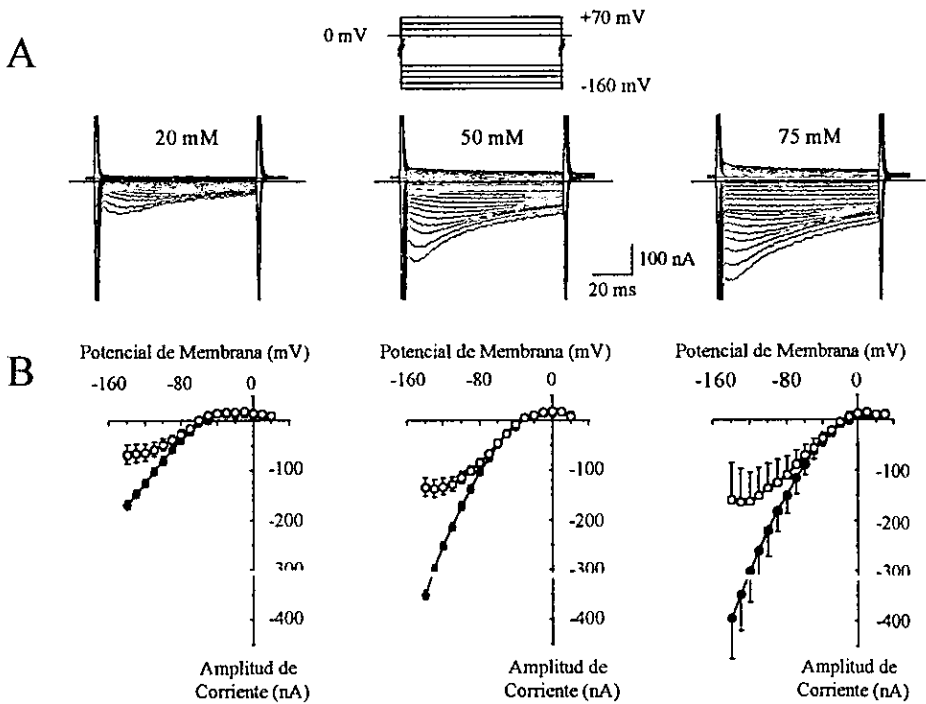


muy similar al utilizado comúnmente para registrar  $K_{ir}$ 's. La corriente se obtuvo a partir de un potencial de mantenimiento de 0 mV y mediante la aplicación de pulsos a diferentes valores de potencial (desde -160 hasta +70 mV, con incrementos de 10mV) y con una duración de 80 ms. El valor del potencial de mantenimiento se fijó en 0 mV con el fin de favorecer la inactivación de las corrientes sensibles a voltaje. Cuando se aplicaron pulsos a potenciales más negativos de -90 mV, y posterior al decaimiento del transitorio capacitivo inicial, se observó una corriente entrante cuya amplitud aumentó de manera dependiente del tiempo, la cual alcanzó un valor máximo después de aproximadamente 12 ms, seguida de un decaimiento más lento. El pico de la corriente ( $\sim 230$  nA) a 70 mV por debajo del potencial de inversión ( $E_R = -25.9$  mV) mostró una amplitud considerablemente mayor que la observada en dirección saliente ( $\sim 80$  nA) a 70 mV por arriba de  $E_R$ , lo cual sugirió que esta corriente correspondía a una de  $K^+$  con propiedades de rectificación entrante, es decir, a  $K_{ir-Endo}$ . La rectificación entrante de  $K_{ir-Endo}$  se ilustra mejor en la relación I-V que se muestra en el panel B de la Figura 9. La corriente al pico, medida como la máxima corriente entrante, desplegó propiedades de rectificación entrante a potenciales de membrana negativos a  $E_R$ . La corriente tardía medida como la corriente al final del pulso de 80 ms, exhibió un comportamiento más complejo, dado por una doble rectificación (nótese la región de pendiente negativa a partir de -100 mV). El decaimiento de la corriente, observado en las curvas I-V como la diferencia entre el pico y la corriente tardía, se evidenció a potenciales negativos a -100 mV. Estos resultados nos indican que la corriente registrada en ovocitos de *Xenopus* en las condiciones experimentales descritas, correspondió a  $K_{ir-Endo}$ .

#### ***Dependencia de la Amplitud de $K_{ir-Endo}$ de la $[K^+]_o$ .***

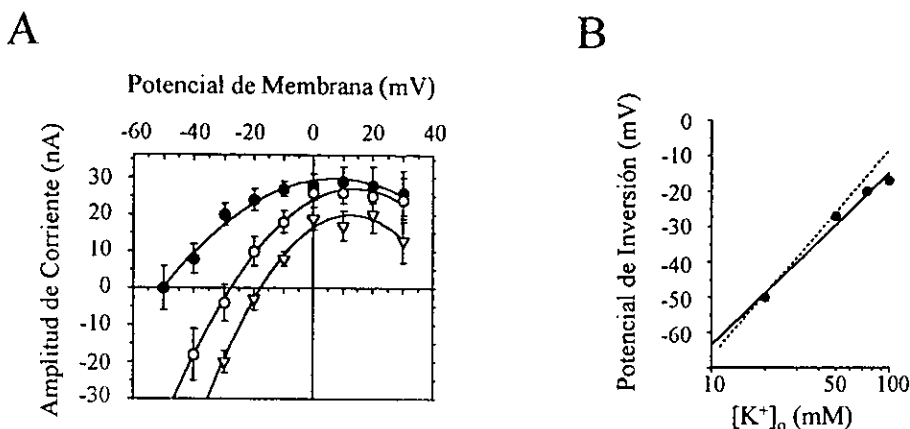
Con el fin de probar la naturaleza iónica de  $K_{ir-Endo}$  se investigó la dependencia de la amplitud de la  $[K^+]_o$ , para lo cual se registró la corriente en presencia de diferentes concentraciones de  $K^+$  externo (20, 50, 75, 100 y 125 mM). Los resultados de los experimentos realizados en algunas de estas concentraciones se muestran en la Figura 10. En el panel A se ilustran las corrientes registradas en 20, 50 y 75 mM de  $[K^+]_o$ , y con el protocolo de pulsos ilustrado en la parte superior (incrementos de 10 mV). Conforme aumentó la  $[K^+]_o$ , la amplitud de  $K_{ir-endo}$  aumentó, el tiempo en alcanzar el valor máximo de corriente (tiempo al pico) fue aparentemente menor, y la velocidad de decaimiento mayor. En el panel B se muestra la relación

I-V de la corriente pico (círculos negros) y tardía (corriente medida al final del pulso, círculos blancos), en las diferentes  $[K^+]_o$ 's utilizadas. Las relaciones I-V permiten observar cómo la amplitud de la corriente en dirección entrante creció y el  $E_R$  se corrió hacia potenciales positivos conforme la  $[K^+]_o$  aumentó. Cabe destacar que la amplitud de la corriente saliente no mostró cambios significativos. Independientemente de la  $[K^+]_o$  utilizada, la amplitud de la corriente saliente permaneció en valores prácticamente despreciables. La amplitud del decaimiento de la corriente (medido como la diferencia entre la corriente pico y la tardía) permaneció prácticamente sin cambios (alrededor de un 60% de decaimiento a  $-140$  mV). Sin embargo, conforme  $[K^+]_o$  aumentó la región de pendiente negativa de la corriente tardía se hizo mas evidente.



**Figura 10.** Dependencia de la Amplitud de  $K_{ir-Endo}$  del  $[K^+]_o$ . A. Familias de trazos de  $K_{ir-Endo}$  registrados en presencia de 20 (izquierda), 50 (centro) y 75 (derecha) mM de  $[K^+]_o$ .  $K_{ir-Endo}$  se registró con el protocolo de pulsos que se ilustra en la parte superior de la figura (incrementos de 10 mV). B. Relación I-V de la corriente pico (círculos negros) y tardía (círculos blancos) correspondiente a cada  $[K^+]_o$ . n=55. Las barras indican el ES.

La selectividad de  $K_{IR-Endo}$  por  $K^+$  se evaluó mediante la medición cuidadosa del  $E_R$  aparente en presencia de 20, 50 y 100 mM de  $[K^+]_o$ . El resultado se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Selectividad de  $K_{IR-Endo}$  por el  $K^+$ . A. Relación I-V obtenida en 20 (círculos negros), 50 (círculos blancos), y 100 (triángulos blancos) mM de  $[K^+]_o$ .  $E_R$  se determinó por el valor de potencial en el cual el ajuste polinomial (línea continua) de los datos experimentales (símbolos) cruzó el eje del voltaje. B.  $E_R$  graficado en función de la  $[K^+]_o$ . La regresión lineal (línea continua) de los datos experimentales (círculos negros) tuvo una pendiente de  $48.5 \pm 4.8$  mV. La predicción de la ecuación de Nernst (línea discontinua) fue de 58 mV.

El valor de  $E_R$  se determinó identificando el punto en el que el ajuste de una función polinomial a los datos experimentales cruzó el eje del voltaje (panel A, Figura 11). El valor de  $E_R$  fue de  $-50 \pm 5.7$  mV en 20 mM ( $n = 9$ ),  $-27 \pm 4.8$  mV en 50 mM ( $n = 25$ ),  $-21 \pm 5.6$  mV en 75 mM, ( $n = 3$ ) y  $-17 \pm 2.6$  mV en 100 mM ( $n = 4$ ) de  $[K^+]_o$ . Es evidente que el valor de  $E_R$  se corrió hacia potenciales menos negativos conforme  $[K^+]_o$  fue mayor. La relación entre  $E_R$  y la  $[K^+]_o$  se definió por una razón de  $48.5 \pm 4.8$  mV por cada decena de cambio en  $[K^+]_o$  (panel B, Figura 11). Este valor fue razonablemente cercano al predicho por la ecuación de Nernst de 58 mV por cada decena de cambio en  $[K^+]_o$  para un electrodo selectivo a  $K^+$ . Este resultado indicó que  $K_{IR-Endo}$  fue acarreada principalmente, pero no exclusivamente por  $K^+$ . Ohmori (1978) y Harvey y Ten Eick (1979) reportaron que posiblemente el ión  $Na^+$  puede pasar por los canales  $K_{IR}$ , lo que explicaría porque la selectividad de  $K_{IR-Endo}$  por  $K^+$  no es predicha totalmente por la ecuación de Nernst.

La conductancia pendiente ( $g_{slope}$ ) en el rango donde  $K_{ir-Endo}$  se comportó linealmente (entre -140 y -80 mV), también mostró una dependencia significativa de la  $[K^+]_o$  (datos no mostrados). Cuando  $g_{slope}$  se analizó como función logarítmica de la  $[K^+]_o$ , los datos experimentales se comportaron de acuerdo con la siguiente expresión:

$$g_{slope} = C \cdot ([K^+]_o)^{\alpha} \quad (1)$$

donde la constante  $C$  tuvo un valor de  $0.36 \pm 0.13$  nS, y el exponente  $\alpha$  fue de  $0.57 \pm 0.07$ . Al igual que para otros  $K_{ir}$ 's, este tipo de mecanismo de conducción iónica indicó que el poro del canal de  $K_{ir-Endo}$  es simultáneamente ocupado por múltiples iones de  $K^+$  (Hille y Schwarz, 1978; Sakmann y Trube, 1984).

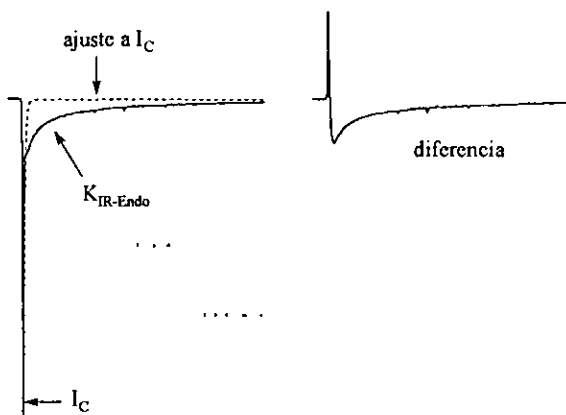
## CAPITULO III

### CURSO TEMPORAL DE $K_{IR-ENDO}$

#### *Fase de Activación.*

Numerosos reportes indican que el proceso de activación de los canales  $K_{IR}$ , se encuentra formado por dos componentes. El primero es un componente instantáneo, independiente del tiempo y del voltaje. Este componente refleja la probabilidad de apertura del canal en el estado estacionario, la cual es diferente de cero. Al cambiar el potencial hacia valores más negativos que el  $E_R$ , se induce un aumento en la fuerza impulsora o también llamada fuerza electromotriz por lo que aumenta la amplitud de su corriente, generando así este componente. El segundo componente es dependiente del tiempo (Leech y Stanfield, 1981; Kurachi, 1985), y refleja la fracción de canales cuya transición hacia el estado abierto desde el cerrado es dependiente del voltaje. Esta transición consume tiempo (independientemente del número de estados cerrados previos al abierto), determinando de esta manera el intervalo entre el inicio del segundo componente y la amplitud máxima de la corriente. En diversas preparaciones como ovocitos de estrella de mar (Hagiwara, Miyazaki y Rosental, 1976), músculo esquelético de rana (Hastrin, 1981; Leech y Stanfield, 1981), y miocitos ventriculares de cobayo (Kurachi, 1985) y de gato (Harvey y Ten Eick, 1988) la porción dependiente del tiempo del proceso de activación sigue un curso temporal exponencial simple, el cual despliega también dependencia de la  $[K^+]_o$ . Con el fin de estudiar el comportamiento de la fase de activación de  $K_{ir-Endo}$ , se exploró su curso temporal en función del potencial de membrana y de la  $[K^+]_o$ . Para tal fin, hubo necesidad de restar de la corriente de membrana el componente debido a la capacidad de la membrana además de la corriente de fuga. Para ello se utilizó el método ilustrado en la Figura 12, el cual consistió en ajustar una función exponencial a la fase de relajación del transitorio capacitivo, extrapolada hasta el valor cero de la amplitud de la corriente (panel de la izquierda). La curva generada de esta manera se restó digitalmente del trazo de corriente de membrana. Sin embargo, y debido al considerable tamaño del ovocito en etapas maduras (etapa V y VI), el valor de la capacidad de la membrana fue muy grande ( $284 \pm 37$  nF;  $n = 28$ ), lo cual indujo corrientes capacitivas de gran amplitud y duración ( $I_c$

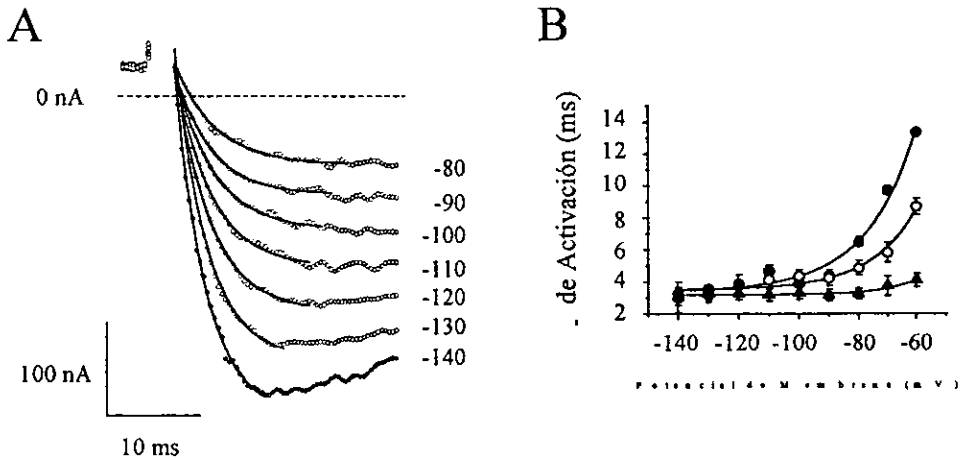
=  $C \, dV/dt$ ). Por otro lado, limitaciones instrumentales inevitables (p.e. poca ganancia de nuestro amplificador) nos impidieron resolver en su totalidad el curso temporal del transitorio capacitivo. Pulsos mayores de  $\pm 40 \, \text{mV}$  en ocasiones indujeron corrientes capacitivas que saturaron el amplificador. Por tal motivo la sustracción no fue perfecta. Los trazos resultantes revelaron la presencia de remanentes que contaminaron el curso temporal de la activación.



**Figura 12.** Resta de la Corriente Capacitiva. Corriente de membrana compuesta por corriente capacitiva ( $I_C$ ) y por  $K_{ir-Endo}$ . El trazo se registró a  $-120 \, \text{mV}$  en presencia de  $50 \, \text{mM}$  de  $[K^+]_o$ .  $I_C$  se eliminó mediante la resta de una función exponencial (línea punteada) ajustada a la fase de decaimiento de  $I_C$  y extrapolada hasta el nivel cero de corriente.

La Figura 13 muestra el curso temporal de la fase de activación de  $K_{ir-Endo}$  una vez que la corriente capacitiva fue removida con el método descrito. La corriente se registró con pulsos hiperpolarizantes a diferentes voltajes ( $-140$  a  $-80 \, \text{mV}$ ), partiendo de un potencial de mantenimiento de  $0 \, \text{mV}$ , en una solución de  $50 \, \text{mM}$  de  $[K^+]_o$ . En el panel A de la Figura 13 se muestran los puntos obtenidos mediante el método de sustracción recién descrito, en donde es evidente un remanente de la sustracción, que se muestra con dirección saliente y con una duración de  $2.7 \, \text{ms}$ . La cuantificación de la fase de activación de  $K_{ir-Endo}$  se llevó a cabo mediante el ajuste de una función exponencial simple (línea continua). No obstante el curso temporal de  $K_{ir-Endo}$  durante los primeros  $3 \, \text{ms}$  de la fase de activación se vio contaminado por el remanente de la sustracción, se puede observar, que los datos describen un curso temporal de tipo exponencial con bastante exactitud. Tal observación se puede interpretar de cualquiera de las siguientes maneras: a) la activación de  $K_{ir-Endo}$  no presenta componente instantáneo; b) si existe, pero su amplitud es muy pequeña; c) los artefactos de sustracción impiden su visualización. Cuando los valores de la constante de tiempo de activación se graficaron en función del potencial de

membrana en presencia de diferentes  $[K^+]_o$  (panel B, Figura 13), fue evidente que la velocidad de activación mostró una dependencia de voltaje monoexponencial, siendo más rápida a potenciales negativos. Asimismo, se observó claramente que tal relación se desplazó hacia la derecha conforme  $[K^+]_o$  fue mayor, sin detectarse cambios significativos en la forma de la curva. De hecho, cuando se graficó el valor de la constante de activación en función a la fuerza impulsora ( $V_m - E_R$ , datos no mostrados) el ajuste exponencial para diferentes  $[K^+]_o$ 's fue idéntico. Estos resultados indican que la dependencia del curso temporal de la  $[K^+]_o$  se debió fundamentalmente a desplazamientos en el valor de  $E_R$ , y no a una genuina dependencia de la concentración de  $K^+$ .

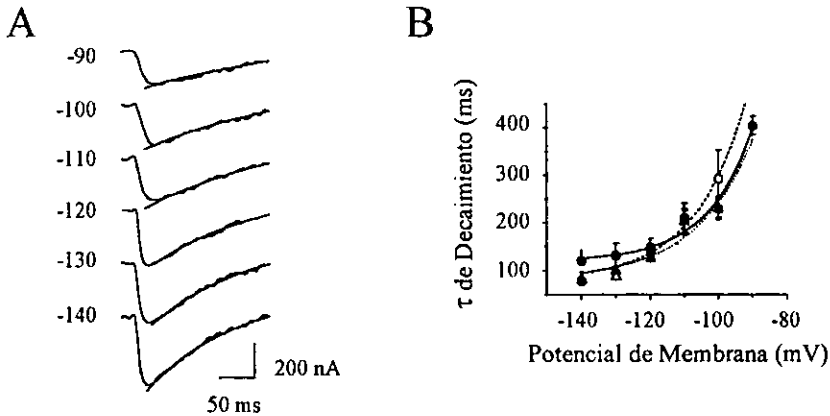


**Figura 13. Curso Temporal de la Fase de Activación de  $K_{ir-Endo}$ .** A. Fase de activación registrada en 50 mM de  $[K^+]_o$ , a los potenciales indicados a la derecha. La corriente cero se indica por la línea horizontal punteada. Los datos experimentales (círculos) se ajustaron con una función exponencial simple (línea continua). B. Dependencia del potencial de la constante de activación obtenida en 20 (círculos negros), 50 (círculos blancos) y 75 (triángulos negros) mM de  $[K^+]_o$ . Los datos se ajustaron con una función exponencial simple, cuya  $\tau$  fué de  $17.1 \pm 2.8$ ,  $15.8 \pm 2.6$ , y  $12.2 \pm 4.1$  ms, para 20, 50, y 75 mM de  $[K^+]_o$ , respectivamente.

### Fase de Inactivación.

A potenciales de membrana muy negativos con respecto a  $E_R$  otros  $K_{ir}$ 's exhiben un decaimiento dependiente del potencial y del tiempo, el cual resulta en una región de pendiente negativa en la relación I-V de la corriente estacionaria (Ohmori, 1978; Sakmann y Trube, 1984). Como se observa en el panel A de la Figura 14  $K_{ir-Endo}$  exhibió tal decaimiento, caracterizado por un curso temporal monoexponencial, sin embargo su magnitud fue significativamente mayor que

la reportada para otros  $K_{ir}$ 's. De hecho, cuando se utilizaron pulsos suficientemente largos ( $> 200$  ms), el decaimiento de la corriente fue prácticamente completo (panel A, Figura 8). Como se observa en el panel B de la Figura 14, la velocidad de la relajación de  $K_{ir-Endo}$  mostró una dependencia monoexponencial del potencial de membrana ( $\tau = 3.1 \pm 3.6$  mV,  $n = 6$ ), pero fue independiente de la  $[K^+]_o$ . Esto resulta evidente por la similitud de las curvas exponenciales ajustadas a los datos obtenidos en 50, 75, y 100 mM de  $[K^+]_o$ . Existen reportes que indican que el decaimiento de la corriente de  $K_{ir}$  que sigue a la activación se explica al menos parcialmente, por un bloqueo dependiente de voltaje y de tiempo inducido por el  $Na^+$  extracelular (Ohmori, 1978; Harvey y Ten Eick, 1989). Este mecanismo parece improbable que opere en  $K_{ir-Endo}$ , ya que la velocidad de decaimiento de la corriente y la región de pendiente negativa no mostraron diferencias significativas cuando  $[Na^+]_o$  fue baja o ausente.



**Figura 14. Curso Temporal de la Fase de Inactivación.** A. Decaimiento de  $K_{ir-Endo}$  registrada en 50 mM de  $[K^+]_o$ , a los potenciales indicados a la izquierda. Cada trazo se ajustó con una función exponencial simple. B. Dependencia del potencial de la constante de inactivación obtenida en 50 (círculos negros), 75 (círculos blancos) y 100 (triángulos negros) mM de  $[K^+]_o$ . Los datos se ajustaron a con una función exponencial simple, cuya  $\tau$  fué de  $13.1 \pm 3.6$ ,  $15.1 \pm 2.5$ , y  $16.8 \pm 5.8$  mV, para 50, 75, y 100 mM de  $[K^+]_o$ , respectivamente.

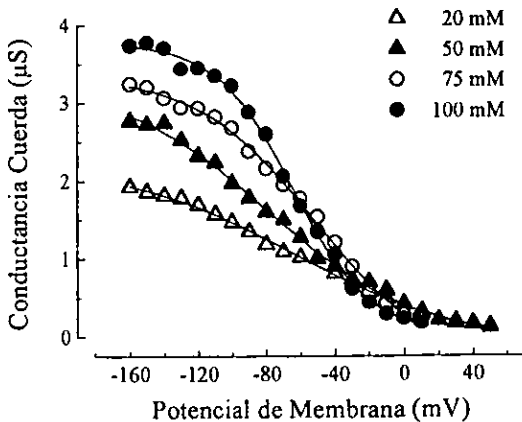


## CAPITULO IV

### CINETICA ESTACIONARIA DE $K_{IR-ENDO}$

#### *Dependencia del Voltaje y de la $[K^+]_o$ de la Activación.*

Como ha sido descrito para los canales  $K_{ir}$ 's, la conductancia cuerda que refleja la activación de los canales en el estado estacionario, es altamente dependiente del potencial de membrana y de la  $[K^+]_o$  (Harvey y Ten Eick, 1988). Con el fin de comparar con otros  $K_{ir}$ 's, se estudió la dependencia del potencial de membrana de la conductancia cuerda de  $K_{IR-Endo}$  en presencia de distintas  $[K^+]_o$ 's. En la Figura 15 se muestra la conductancia cuerda de  $K_{IR-endo}$  graficada en función al potencial de membrana y obtenida en presencia de 20, 50, 75 y 100 mM de  $[K^+]_o$ .



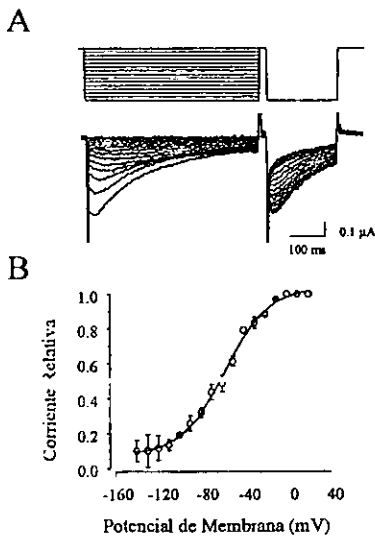
**Figura 15.** *Dependencia de Voltaje y de  $[K^+]_o$  de la Activación de  $K_{IR-endo}$ .* La conductancia cuerda se calculó con la ecuación  $g_{cuerda} = I / (V_m - E_K)$ , en donde  $I$  correspondió al pico de  $K_{ir-Endo}$  (excepto para potenciales más positivos a  $E_K$ ). Los datos experimentales (símbolos) se ajustaron con una función sigmoide (curvas continuas). La mejor descripción de los datos se obtuvo cuando  $V_{1/2}$  fue de -62.7, -78.6, -51.1, y -64.4, y  $k$  tuvo un valor de 50.1 mV, 43.9 mV, 34.3 mV, y 22.2 mV, para 20 (triángulos blancos, n=9), 50 (triángulos negros, n=25), 75 (círculos blancos, n=4) y 100 (círculos negros n=2) mM de  $[K^+]_o$ , respectivamente. El valor promedio de  $V_{1/2}$  fue de  $-64.2 \pm 5.6$  mV y de  $k$  fue de  $37.6 \pm 6.1$  mV.

El comportamiento de la conductancia cuerda exhibió una relación sigmoide con respecto al potencial de membrana, aumentando su valor a potenciales de membrana más negativos. Como resulta lógico, el valor máximo de la conductancia aumentó conforme la  $[K^+]_o$  fue mayor. Sin embargo, y en contraste con lo reportado para otros  $K_{IR}$ 's, las curvas no se desplazaron

significativamente hacia potenciales más positivos conforme la  $[K^+]_o$  fue mayor. Este resultado indicó que la conductancia cuerda de  $K_{ir-Endo}$  dependió básicamente del potencial de membrana y no de la fuerza impulsora (diferencia entre  $V_m$  y  $E_R$ ). Este tipo de comportamiento podría implicar la existencia de una cinética intrínseca de apertura y cierre dependiente de voltaje, similar a la de los canales activados por voltaje.

### Dependencia del Voltaje de la Inactivación.

En diferentes tejidos, el decaimiento de la corriente que los canales  $K_{ir}$ 's despliegan se ha atribuido a la combinación de una depleción de  $[K^+]_o$ , bloqueo inducido por  $Na^+$  externo, y a proceso de inactivación dependiente de voltaje. Con el fin de investigar el mecanismo responsable del decaimiento de la corriente, se estudió la inactivación en el estado estacionario de  $K_{ir-Endo}$ , mediante el uso del tradicional protocolo de doble pulso. En la Figura 16 se muestra el resultado de tal estudio.



**Figura 16.** Dependencia del Voltaje de la Inactivación en el Estado Estacionario. **A.** Familia de trazos de  $K_{ir-Endo}$  registrada en presencia de 50 mM  $[K^+]_o$ , y obtenida con un protocolo de doble pulso que se ilustra en la parte superior. **B.** Dependencia del voltaje del parámetro  $h_{\infty}$ . Los datos se ajustaron (línea continua) con la ecuación  $h_{\infty} = 1/1 + \exp [(V_m - V_{1/2})/k_h]$ . El mejor ajuste se obtuvo cuando  $V_{1/2}$  fue  $-60 \pm 1.5$  mV, y  $k = 20.5 \pm 1.6$  mV.

El protocolo de voltaje para registrar  $K_{ir-Endo}$  consistió en la aplicación de un prepulso a diferentes valores de potencial de membrana (entre -140 y 0 mV, con incrementos de 5 mV), durante 500 ms y a partir de un potencial de sostenimiento de 0mV. La duración del prepulso se

determinó con el objetivo de inducir el componente estacionario de la corriente. A fin de cuantificar la variable de inactivación ( $h_x$ ), se aplicó un pulso de prueba a  $-140$  mV y con una duración de 240 ms. El valor máximo de la corriente obtenida durante este pulso de prueba se midió y normalizó con respecto a la obtenida cuando la amplitud del prepulso fue igual al HP (0 mV). El panel B de la Figura 16 muestra el comportamiento de  $h_x$  en función del potencial de membrana. El resultado muestra una relación sigmoideal que revela la fracción de la corriente resistente a la inactivación para cada valor de potencial del prepulso. Los datos promediados de 9 ovocitos se ajustaron con la siguiente expresión:

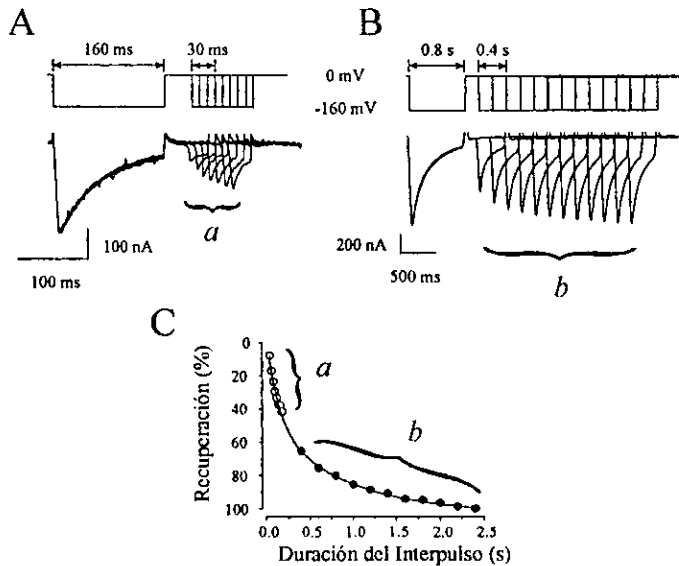
$$h_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{1/2}}{k_h}\right)} \quad (2)$$

donde  $V_m$  es el potencial del prepulso,  $V_{1/2}$  es el potencial de membrana al cual el 50% de la corriente se inactivó, y  $k_h$  es el factor que define la pendiente de la parte lineal de la curva (Hodgkin y Huxley, 1952). El mejor ajuste a los datos se obtuvo cuando  $V_{1/2}$  fue de  $-60 \pm 1.5$  mV, y  $k_h$  fue  $20.5 \pm 1.6$  mV. Estos resultados indicaron que un 90% de la corriente se inactiva cuando el potencial del prepulso es más negativo que  $-120$  mV. Es decir, cerca del 10% de la corriente fue resistente a la inactivación y por lo tanto, nunca alcanzó la total inactivación. La amplitud máxima de la corriente se alcanzó cuando el potencial del prepulso tuvo valores más positivos de  $-10$  mV. La interpretación de este comportamiento es que gran parte de la disminución de la corriente de  $I_{RK-endo}$  se debió a un proceso de inactivación dependiente del voltaje.

### ***Curso Temporal de la Recuperación de la Inactivación.***

Con el fin de determinar el proceso mediante el cual  $K_{ir-Endo}$  se reactiva (salida del estado inactivado) se estudió el curso temporal de la recuperación de la inactivación a 0 mV. Para tal fin se utilizó un protocolo de doble pulso como el ilustrado en la parte superior del panel A, de la Figura 17. Dicho protocolo consistió en dar un prepulso hiperpolarizante a  $-160$  mV, durante 160 ms con el fin de activar  $K_{ir-Endo}$  y permitir su inactivación. Posteriormente se aplicó un pulso de prueba al mismo potencial de membrana pero con una duración de 30 ms. El prepulso y el pulso

de prueba se separaron por un intervalo de recuperación a 0 mV, cuya duración varió entre 30 y 200 ms. Con el fin de cuantificar la extensión y curso temporal de la recuperación, se graficó la amplitud máxima de la corriente registrada durante el pulso de prueba (expresada en %) y se graficó en función de la duración del interpulso (círculos blancos, panel C, Figura 17).



**Figura 17. Curso Temporal de la Recuperación de la Inactivación.** A. El componente rápido de la recuperación (*a*) se registró con el protocolo ilustrado en la parte superior (duración del interpulso entre 30 y 200 ms). B. El componente lento de la recuperación (*b*) se registró con pulsos más largos (duración del interpulso entre 0.3 y 2.4 s). C. Valor máximo de  $K_{ir-Endo}$  registrada durante el pulso de prueba y graficada en función de la duración del interpulso. El curso temporal de los componentes rápido (*a*, círculos blancos) y lento (*b*, círculos negros) se ajustó mediante una función exponencial doble, cuyas constantes de tiempo fueron  $\tau_1 = 134.1$  ms y  $\tau_2 = 891.7$  ms.

El resultado de tal análisis mostro una recuperación con un curso temporal exponencial definido por una  $\tau = 134.1$  ms. Sin embargo, con el protocolo de pulsos descrito no fue posible resolver la totalidad de la recuperación. Por tal motivo, se utilizó un protocolo de pulsos más largos (panel B, Figura 17), en donde la duración del prepulso fue de 700 ms, la del pulso de prueba de 450ms, y la del intervalo de recuperación varió entre 0.3 y 2.4 s. Cuando el pico de la corriente registrada durante el pulso de prueba se graficó en función de la duración del interpulso, se observó un componente exponencial más lento, definido por una  $\tau = 891.73$  ms (círculos negros, panel C, Figura 17). Este resultado reveló un comportamiento de  $K_{ir-Endo}$  distinto al

reportado para otros  $K_{IR}$ , en los que la recuperación de la inactivación sigue un curso temporal monoexponencial (Harvey y Ten Eick, 1988). La interpretación cinética del curso temporal de la recuperación, se fundamenta en los siguientes aspectos: a) el canal abandona el estado inactivado mediante un mecanismo dependiente del voltaje (no se cuantificó) y del tiempo; y b) la recuperación de la inactivación posiblemente implique la existencia de dos salidas distintas del estado inactivado.

## CAPITULO V

### SENSIBILIDAD DE $K_{ir-Endo}$ AL BLOQUEO INDUCIDO POR EL $Ba^{2+}$ EXTERNO

#### *Efecto Sobre la Amplitud y Curso Temporal.*

Una propiedad característica de los  $K_{IR}$ 's es su alta sensibilidad al bloqueo inducido por cationes extracelulares, como el  $Na^+$  (Hagiwara y cols., 1978),  $Ba^{2+}$  (Standen y Standfield, 1978), y  $Cs^+$  (Harvey y Ten Eick, 1988). Esta característica ha sido ampliamente utilizada como herramienta farmacológica, para la identificación de las diferentes clonas de canales  $K_{ir}$  expresados heterológicamente en ovocitos de *Xenopus laevis* (Kubo y cols., 1993; Périer, Radeke y Vandenberg, 1994; Ashen y cols., 1995). Con el fin de comparar con los reportes para los  $K_{ir}$ 's, se estudió la sensibilidad de  $K_{ir-Endo}$  al bloqueo inducido por el  $Ba^{2+}$  extracelular.

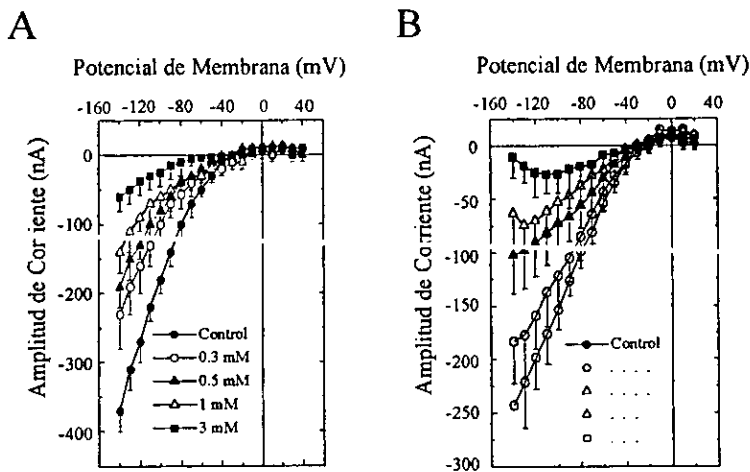
En la Figura 18 se muestra el efecto de diferentes  $[Ba^{2+}]_o$ 's sobre la amplitud y curso temporal de  $K_{ir-Endo}$ . Para el registro de  $K_{ir-Endo}$  se utilizó un protocolo de pulsos como el ilustrado en la parte superior de la Figura 18. Dicho protocolo consistió en la aplicación de pulsos a diferentes potenciales de membrana, desde -160 hasta +70mV, con incrementos de 10 mV, a partir de un HP de 0mV. Las familias de trazos de  $K_{ir-Endo}$  obtenidas con tal protocolo (antes y después de la adición de 0.3, 0.5, 1, 3 y 7 mM de  $Ba^{2+}$  a la solución del baño) revelaron una disminución creciente en la amplitud, tanto de la corriente pico como de la tardía (al final del pulso de 80 ms). Tal efecto fue claramente dependiente de la concentración de  $[Ba^{2+}]_o$ . El bloqueo de  $K_{ir-Endo}$  fue revertido en su totalidad cuando el  $Ba^{2+}$  se removió de la solución del baño. Contrario a lo reportado para otros  $K_{ir}$ 's, en los que el  $Ba^{2+}$  extracelular acelera dramáticamente la velocidad del decaimiento de la corriente por afectar principalmente el componente estacionario (Matsuda y cols., 1987, Hagiwara y cols., 1978, Standen y Stanfield, 1988, Kubo y cols., 1993), el efecto del  $Ba^{2+}$  externo sobre el curso temporal de  $K_{ir-Endo}$  fue más bien discreto. Lo cual denotó un efecto prácticamente independiente del tiempo. El curso temporal de la activación aunque oscurecida por la presencia del transitorio capacitivo, no reveló cambios ostensibles como consecuencia de la adición del  $Ba^{2+}$  extracelular.

Sin embargo, el efecto del  $Ba^{2+}$  sobre la amplitud de la corriente pico fue mayor, contrario a lo reportado para otros  $I_{RKA}$ , donde lo que principalmente se afecta es la corriente en el estado estacionario. La sensibilidad al  $Ba^{2+}$  fue menor a la reportada para otros rectificadores entrantes,

donde concentraciones de 300 $\mu$ M de Ba<sup>2+</sup> bloquean completamente la corriente (Hagiwara y cols, 1978). En nuestros experimentos, la concentración más alta de Ba<sup>2+</sup> (7mM) no llegó a bloquear totalmente la corriente (trazo no mostrado).

### Dependencia del Voltaje.

En la Figura 19 se muestra la relación I-V de la corriente pico (panel A) y tardía (panel B), registrada en presencia de 50mM de K<sup>+</sup> (control), y diferentes concentraciones de Ba<sup>2+</sup> en la solución del baño. En la relación I-V de la corriente pico muestra que el bloqueo inducido por Ba<sup>2+</sup> se manifestó como una disminución en la amplitud de manera proporcional a la [Ba<sup>2+</sup>]. Asimismo, la fracción de corriente bloqueada por el Ba<sup>2+</sup> no mostró cambios aparentes con respecto al potencial de membrana, sugiriendo que el efecto sobre la corriente al pico fue independiente del voltaje. Tampoco se observaron cambios significativos en la amplitud de la corriente saliente, ni cambios evidentes en el valor del E<sub>R</sub>. La relación I-V de la corriente tardía (panel B, Figura 19), reveló que a concentraciones mayores de Ba<sup>2+</sup> externo, la región de pendiente negativa se hizo más evidente, a potenciales entre -100 y -140 mV. Este comportamiento sugirió un efecto dependiente del voltaje, de manera similar a la reportada para otros K<sub>IR</sub>'s.



**Figura 19. Efecto del Ba<sup>2+</sup> Sobre la Amplitud de K<sub>ir-Endo</sub>.** Amplitud de K<sub>ir-Endo</sub> registrada en 50 mM de [K<sup>+</sup>]. A. Relación I-V de la corriente pico en presencia de diferentes concentraciones de Ba<sup>2+</sup> externo (n = 9). B. Relación I-V de la corriente tardía en presencia de diferentes concentraciones de Ba<sup>2+</sup> externo (n = 9).

Con el fin de cuantificar la dependencia del voltaje del bloqueo de  $K_{ir-Endo}$  inducido por  $Ba^{2+}$  externo, se midió la fracción de corriente resistente al bloqueo y se graficó en función del potencial de membrana. El resultado se muestra en la Figura 20. En el panel A se muestra la fracción de la corriente pico resistente al bloqueo inducido por diferentes  $[Ba^{2+}]_o$ 's (0.3, 0.5, 1, 3, y 7 mM), y registrada en presencia de 50 mM de  $[K^+]_o$ . Fue evidente que la fracción de corriente resistente al bloqueo no mostró cambios significativos conforme el potencial fue más negativo, demostrando con ello que el bloqueo de la corriente pico fue independiente del voltaje. De manera análoga, se realizó el mismo análisis para la corriente tardía. El resultado se ilustra en el panel B de la Figura 20. Se observa que la fracción de corriente resistente al bloqueo desplegó un dependencia del voltaje significativa ya que a potenciales negativos la magnitud del bloqueo fue mayor.

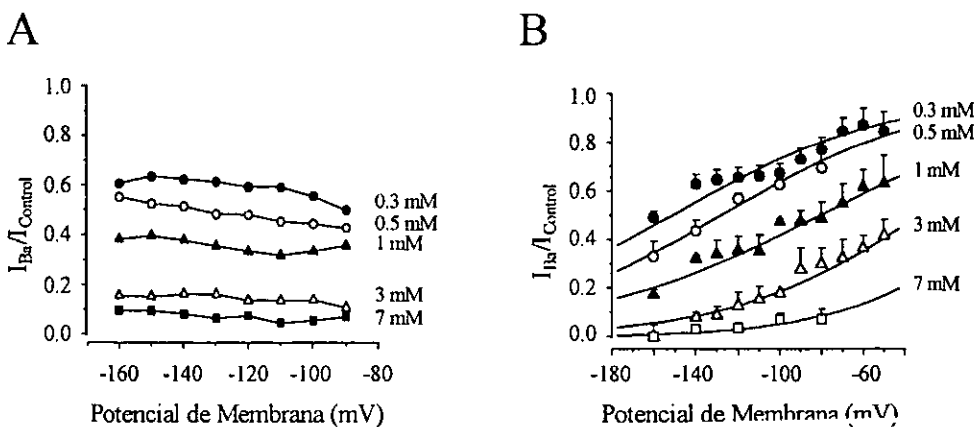


Figura 20. Dependencia del Voltaje del Bloqueo de  $K_{ir-Endo}$  Inducido por  $Ba^{2+}$ . A. Fracción de corriente pico resistente al bloqueo después de agregar diferentes concentraciones de  $Ba^{2+}$  externo (para fines de claridad se omitió SE). B. Fracción de corriente tardía resistente al bloqueo en presencia de diferentes concentraciones de  $Ba^{2+}$  externo. Los datos corresponden al promedio de 9 células.

La interpretación de nuestros datos experimentales se fundamentó en la suposición de que el bloqueo de  $K_{ir-Endo}$  sigue una isoterma de adsorción bimolecular (Hagiwara y cols, 1978), con una constante de disociación ( $K_d$ ) dependiente del potencial de membrana, la cual se definió con la siguiente expresión :



$$y = \frac{K_d(0) \exp \frac{\delta zFV}{RT}}{K_d(0) \exp \frac{\delta zFV}{RT} + [Ba^{2+}]_o} \quad (3)$$

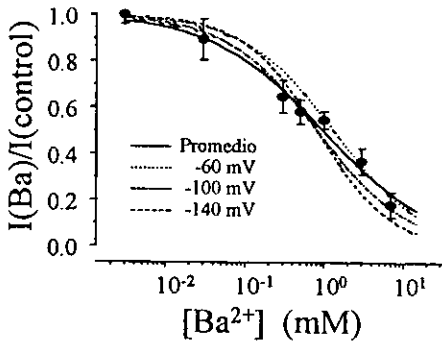
donde  $K_d(0)$  fue la constante de disociación a 0mV,  $z$  la valencia del ión bloqueador ( $Ba^{2+}$ );  $RT/F$  tuvo un valor de 25mV a 22°C, y  $\delta$  correspondió a la fracción del campo eléctrico transmembranal a nivel del sitio de unión del  $Ba^{2+}$  (Hagiwara y cols., 1978; Standen y Stanfield, 1988). Las líneas continuas se generaron con la ecuación (3), asumiendo los siguientes valores  $K_d(0) = 5.6\text{mM}$  y  $\delta = 0.26$ . Como se observa en la figura, los datos experimentales se describieron razonablemente bien con este modelo, lo que sugirió que la unión dependiente de voltaje del  $Ba^{2+}$  con su sitio de unión en el canal se lleva a cabo a un del 26% del campo eléctrico transmembranal, es decir, plenamente en el interior del poro de conducción iónica.

Adicionalmente, la dependencia del voltaje se estudió graficando la fracción de la corriente resistente al bloqueo calculada a diferentes valores de potencial de membrana, en función de  $[Ba^{2+}]_o$ . El resultado se muestra en la Figura 21, en donde el promedio de 9 ovocitos se ajustó con la siguiente ecuación:

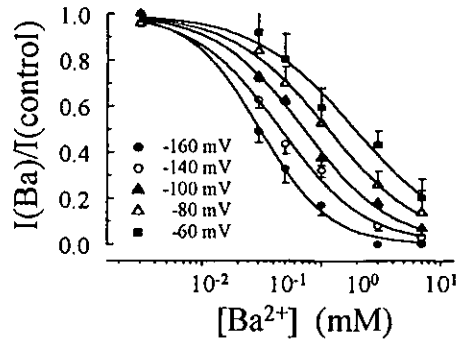
$$y = \frac{1}{1 + \left( \frac{[Ba^{2+}]}{K_d} \right)^n} \quad (4)$$

donde  $K_d$  es la constante de disociación aparente, y  $n$  es el coeficiente de Hill. Para el caso de la corriente pico (panel A), el mejor ajuste al promedio de los datos (línea continua) se obtuvo con los siguientes valores  $K_d = 0.91 \pm 0.12 \text{ mM}$ , y  $n = 0.73 \pm 0.06$ .

A



B

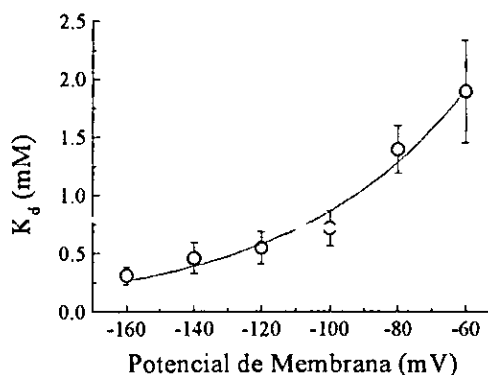


**Figura 21.** Sensibilidad al  $\text{Ba}^{2+}$  Externo en Diferentes Potenciales de Membrana. A. Fracción de corriente pico resistente al bloqueo obtenida a diferentes potenciales (indicados en la leyenda) y graficada en función del  $[\text{Ba}^{2+}]_o$ . B. Fracción de corriente tardía resistente al bloqueo obtenida a diferentes potenciales (indicados en la leyenda) y graficada en función de la  $[\text{Ba}^{2+}]_o$ .

En ninguna de las concentraciones de  $\text{Ba}^{2+}$  (0.3, 0.5, 1 y 3 mM) se observaron diferencias significativas en las curvas obtenidas para los tres potenciales de membrana probados (-60, -100, -140 mV), confirmando la independencia del voltaje observada para el efecto del  $\text{Ba}^{2+}$  externo sobre la corriente pico. Estos resultados difirieron con los reportados para otros  $\text{K}_{\text{IR}}$ s, ya que el acuerdo general es que tales canales despliegan una sensibilidad significativamente mayor que  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$  y una clara dependencia del voltaje. La interpretación de nuestros resultados giró en torno a que la afinidad del sitio de unión por el  $\text{Ba}^{2+}$  fuera independiente del potencial. Dos posibles explicaciones se podrían postular para explicar este comportamiento: a) que la unión del  $\text{Ba}^{2+}$  con el canal no es de naturaleza electrostática (poco probable); o b) que dicha unión se lleva a cabo fuera del plano de la membrana, de tal forma que los cambios en el potencial transmembranal no sean percibidos por dicho sitio. La existencia de un sitio de unión al  $\text{Ba}^{2+}$  en el vestibulo externo del canal podría generar un comportamiento como el observado sobre la corriente pico.

Una característica bien conocida del efecto del  $\text{Ba}^{2+}$  sobre otros  $\text{K}_{\text{IR}}$ s, es que acelera la velocidad de decaimiento de la corriente, de una manera dependiente del voltaje. Para explorar este fenómeno en  $\text{K}_{\text{ir-Endo}}$  se llevó a cabo un análisis similar al realizado para evaluar el efecto del  $\text{Ba}^{2+}$  sobre la corriente pico, pero sobre la corriente tardía. El panel B de la Figura 21 ilustra el

resultado de este análisis. La gráfica muestra la fracción de corriente tardía resistente al bloqueo inducido por  $Ba^{2+}$  externo. Es evidente que las curvas se desplazaron hacia concentraciones mayores de  $Ba^{2+}$  conforme el valor del potencial de membrana se hizo menos negativo. Es decir, entre más negativo fue el potencial, menos concentración de  $Ba^{2+}$  se requirió para inducir un bloqueo en  $K_{it-Endo}$  de similar magnitud. Este comportamiento generó un apoyo más sólido a la idea de que el efecto del  $Ba^{2+}$  externo sobre la corriente tardía fue claramente dependiente del potencial. Lo cual fue muy sugestivo de que la unión del  $Ba^{2+}$  con su sitio en el canal se localiza dentro del campo eléctrico de la membrana, de tal forma que conforme el potencial se vuelve más negativo, la atracción interna sobre el  $Ba^{2+}$  externo crece y por lo tanto se requieren menores concentraciones efectivas de  $Ba^{2+}$ . Las curvas ajustadas con la ecuación (4) a los datos experimentales indicaron un valor para el coeficiente de Hill  $>1$  (1.5 a -160 mV), lo cual podría indicar la existencia de más de un sitio de unión para el  $Ba^{2+}$ , y además con algún grado de cooperatividad entre ellos. Esto se hizo más evidente conforme el voltaje se volvió más negativo, el valor de  $K_d$  decreció de 1.9 a 0.31 mM cuando el potencial de membrana cambió de -60 a -160 mV, respectivamente. Esta relación se ilustra mejor en la Figura 22, en donde los valores de  $K_d$  se graficaron en función del potencial de membrana.



**Figura 22.** Dependencia del Voltaje del Bloqueo Inducido por  $Ba^{2+}$  Externo Sobre la Corriente Tardía.  $K_d$  graficada en función del potencial de membrana (n = 9).

El valor de la  $K_d$  mostró un comportamiento monoexponencial ( $\tau = 50.3$ ) en función del potencial de membrana, disminuyendo conforme el potencial se hizo más negativo. Este resultado confirmó la dependencia de voltaje observada con los análisis previos.

8

## DISCUSION

Los resultados mostrados en esta tesis nos permiten concluir en los siguientes aspectos: a)  $K_{IR-Endo}$  es acarreada principalmente por iones  $K^+$ ; b) su proceso de activación depende fuertemente de voltaje, ya que se induce mediante hiperpolarización de la membrana; c) el curso temporal de  $K_{ir-Endo}$  se caracteriza por con una activación rápida seguida de una inactivación casi completa la cual depende de voltaje; y d)  $K_{ir-Endo}$  presenta menor sensibilidad al bloqueo inducido por  $Ba^{2+}$  externo con respecto a otros  $K_{ir}$ 's. El conocimiento de estas propiedades de  $K_{IR-Endo}$ , puede evitar interpretaciones erróneas del comportamiento funcional de los canales de  $K^+$  rectificadores entrantes exógenos y puede permitir una manipulación experimental de sus propiedades para estudiar y diseccionar mejor las corrientes rectificadoras entrantes de interés.

### Corrientes de Rectificación Entrante Endógenas

Los ovocitos de *Xenopus laevis*, presentan una gran diversidad de corrientes iónicas. Actualmente se conocen: canales de  $Cl^-$  activados por  $Ca^{2+}$  (Miledi y Parker, 1984), canales de  $Cl^-$  activados por hiperpolarización, independientes de  $Ca^{2+}$  (Parker y Miledi, 1988, Kowley y cols, 1994). canales de  $Ca^{2+}$  activados por despolarización (Miledi, 1982; Barish, 1983; Leonard y cols., 1987) y por hiperpolarización (Parker y cols, 1984; Parker y Miledi, 1987), canales de sodio (Baud y cols., 1982; Parker y Miledi, 1987b), canales de  $K^+$  (Peres y cols., 1985), canales activados por estiramiento (Yang y Sachs, 1990). Algunas de estas corrientes se encuentran casi siempre presentes en el ovocito inmaduro y probablemente tienen una función en el desarrollo y maduración de los ovocitos o durante el estado embrionario, como es el caso de la corriente de  $Cl^-$  activada por  $Ca^{2+}$  que esta involucrada durante la fertilización (Whitaker y Steinhardt, 1982).

La identificación de esta nueva corriente de  $K^+$  con propiedades de rectificación entrante ( $K_{IR-endo}$ ) en ovocitos de *Xenopus laevis* presenta algunas diferencias con respecto a otros rectificadores entrantes reportados para ovocitos de *Xenopus*. Uno de los rectificadores entrantes más abundante en ovocitos de *Xenopus* es  $I_{Cl-endo}$  (corriente de  $Cl^-$  independiente de  $Ca^{2+}$  activada por hiperpolarización) (Parker y Miledi, 1988, Kowley y cols, 1994). Esta corriente se activa a voltajes entre -100 a -110 mV e incrementa de forma lineal (ohmica) a voltajes más negativos

(Kowdley y cols , 1994); mientras que el umbral de activación de  $K_{IR-endo}$  se encuentra entre -60 y -70 mV. Otra característica de  $I_{Cl-endo}$  es que muestra una inactivación pequeña con pulsos de varios segundos de duración (Parker y Miledi, 1988).  $I_{Cl-endo}$  se bloquea con  $Ba^{2+}$  externo, mostrando una  $IC_{50}$  de 0.18 mM. Estas propiedades contrastan con las mostradas por  $K_{ir-Endo}$ : gran inactivación (Figs. 9, 10, y 14) y menor sensibilidad al bloqueo inducido por el  $Ba^{2+}$  externo ( $IC_{50}$  de 1 mM; Figs. 18 y 19).

Otro canal que exhibe esta característica de rectificación entrante en ovocitos de *Xenopus* es el canal activado por estiramiento ( $I_{SA}$ ), el cual se activa principalmente por cambios en la tensión de la membrana celular inducidos por modificaciones en el volumen celular, y por hiperpolarización ( $> -50$  mV) de la membrana (Yang y Sachs, 1990). La posibilidad de que  $K_{IR-endo}$  correspondiera a  $I_{SA}$  se descartó con base en las siguientes observaciones: a)  $K_{IR-endo}$  presenta una rectificación entrante de gran magnitud (Figs. 9, 10 y 11); b)  $I_{SA}$  presenta muy baja selectividad entre cationes monovalentes como el  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Li^+$ ; c) el  $GdCl_3$  (bloqueador selectivo de  $I_{SA}$ ) no modificó las propiedades de  $K_{ir-Endo}$  (datos no mostrados).

### Propiedades de Permeabilidad.

$K_{IR-endo}$  muestra una gran dependencia de  $[K^+]_o$ , puesto que a medida que se aumenta la concentración de  $K^+$  de 20 a 75 mM, la amplitud de la corriente aumenta de 185 a 375 nA respectivamente (Fig. 10). El potencial de inversión también cambia en relación a la concentración de  $K^+$ , adquiriendo valores más positivos conforme se aumenta la concentración (Fig. 11-A), el ajuste de estos valores comparado con los valores predichos por la ecuación de Nernst para un canal selectivo puramente a  $K^+$ , nos indica que  $K_{IR-endo}$  es acarreada principalmente (pero no exclusivamente) por iones  $K^+$  (Fig. 11-B). Esto nos indica que algún otro ión puede pasar por este mismo canal. Una posibilidad es el ión  $Na^+$  (Ohmori, 1978; Harvey y Ten Eick, 1989). Por lo tanto, se utilizó una solución sin  $Na^+$  (ver métodos) para remover el  $Na^+$  externo; sin embargo se observó que no cambió la amplitud de la corriente ni el potencial de inversión de  $K_{IR-endo}$ , lo que indica que el  $Na^+$  tiene muy poco o ningún efecto sobre  $K_{IR-endo}$ .

Esto demuestra que  $K_{IR-endo}$  se comporta como un canal selectivo a  $K^+$  de forma similar a otros canales rectificadores entrantes de  $K^+$ , con propiedades de permeación muy semejantes.

### Activación de $K_{ir-Endo}$

Para determinar el efecto del voltaje sobre  $K_{IR-endo}$  y conocer su cinética de activación, se aplicaron pulsos hiperpolarizantes, observándose que la corriente se activa rápidamente, con una velocidad que depende del voltaje (Fig. 13-A). Para demostrar esta dependencia de voltaje y de  $[K^+]_o$ , se graficó la conductancia cuerda (Fig. 15), mostrando una curva sigmoideal que se incrementa conforme el potencial de membrana se hace más negativo. Esta conductancia en diferentes concentraciones de  $K^+$  alcanza valores mínimos y máximos aproximadamente a los mismos voltajes (-40 mV y -160 respectivamente). Este comportamiento es similar a los reportados para otros rectificadores entrantes. (Harvey y Ten Eick, 1988; Hagiwara y cols, 1976; Standen y Stanfield, 1981). Estos resultados muestran que la activación depende básicamente del potencial de membrana.

### Inactivación de $K_{ir-Endo}$

La inactivación de  $K_{IR-endo}$  se exploró mediante la utilización de un protocolo de doble pulso (Fig. 14-A). El resultado muestra una curva sigmoideal que indica la fracción de canales resistentes a la inactivación, donde un 10% del total de la corriente es resistente a la inactivación (Fig. 14, panel B). Estos resultados difieren de otros  $K_{ir}$ 's. Por otro lado, se estudió la inactivación de los canales  $K_{IR-endo}$  dependiente de tiempo, utilizando el protocolo de doble pulso pero con una mayor duración. Esta inactivación dependiente de tiempo decae completamente después de 2.5 s (Fig. 17), lo cual difiere de los  $K_{IR}$ 's, donde la inactivación no es total. La inactivación de los  $K_{IR}$ 's se explica por la presencia de cationes externos monovalentes ( $Na^+$ ) o divalentes ( $Ca^{2+}$ ). Se conoce que el  $Na^+$  participa en la regulación de la corriente entrante de  $K^+$  (Harvey y Ten Eick, 1988) modificando el pH intracelular a través del intercambiador Na-H. Sin embargo,  $K_{IR-endo}$  no se puede explicar por este mecanismo, ya que se utilizaron soluciones sin  $Na^+$  (ver métodos) las cuales no alteraron los resultados. Por otro lado, se conoce que el  $Ca^{2+}$  puede influir en la conductancia de la corriente de  $K^+$  rectificadora entrante, ya que puede participar en la regulación del pH<sub>i</sub> a través del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ . Este mecanismo también fue descartado, ya que se utilizaron concentraciones bajas de  $Ca^{2+}$  en la solución (ver métodos). Los experimentos con el protocolo de doble pulso sugieren una disminución de  $K_{IR-endo}$  por un mecanismo diferente. Al igual que otros canales de  $K^+$  dependientes de voltaje, la disminución de

$K_{IR-endo}$  puede explicarse por la existencia de un mecanismo de inactivación en el extremo amino terminal, en el cual esta partícula bloquea el poro del canal (Hoshi y cols, 1990).

### **Bloqueo de $K_{ir-Endo}$ por $Ba^{2+}$ Externo.**

Los resultados indican que al igual que lo reportado para otros  $K_{ir}$ 's la adición de  $Ba^{2+}$  a la solución externa indujo un bloqueo reversible de  $K_{ir-Endo}$ . Este bloqueo por  $Ba^{2+}$  externo sobre  $K_{IR-endo}$ , (Fig. 18) es dependiente de la concentración, ya que al aumentar la concentración de  $Ba^{2+}$  disminuyó la corriente tanto en su componente transitorio (corriente al pico) como en el estacionario (corriente al final del pulso), predominando el bloqueo de éste último. Al igual que para el resto de los  $K_{ir}$ 's el cambio en el curso temporal de  $K_{ir-Endo}$  resultó de inducir un aumento en la velocidad de inactivación (Fig. 18). Sin embargo, encontramos algunas desviaciones del comportamiento de  $K_{ir-endo}$  en presencia de  $Ba^{2+}$  con respecto a lo reportado para otros canales. La sensibilidad de  $K_{ir-Endo}$  al bloqueo por el  $Ba^{2+}$  fue menor, ya que se requirieron mayores concentraciones de  $Ba^{2+}$  para lograr un bloqueo de la corriente, la cual nunca fue totalmente bloqueada. Al analizar el bloqueo por  $Ba^{2+}$  de la corriente al pico y de la corriente al final del pulso (80 ms) se encontró que el  $Ba^{2+}$  ejerce un efecto diferente para cada una de estas condiciones (Fig. 19). Cuando se midió el efecto del  $Ba^{2+}$  a diferentes concentraciones (0.3, 0.5, 1, 3 mM), sobre la corriente al pico se observó que el bloqueo de la corriente fue prácticamente independiente del voltaje (Fig. 19 A). Esto se comprobó cuando se graficó la fracción de corriente no bloqueada [ $I(Ba)/I(control)$ ] en diferentes potenciales de membrana (Fig. 20 A), encontrando que no hay cambios significativos. La independencia del voltaje del efecto del  $Ba^{2+}$  sobre la corriente al pico sugiere una interacción de los iones  $Ba^{2+}$  con un sitio específico del vestíbulo externo del canal, el cual se halla fuera del campo eléctrico de la membrana, tal y como se ha propuesto para algunos canales rectificadores tardíos de  $K^+$  (Taglialatela y cols, 1993). El análisis de la fracción de la corriente no bloqueada en función de la concentración de  $Ba^{2+}$  (Fig. 21 A), mostró un coeficiente de Hill igual a 1, lo cual sugiere la unión entre un ión  $Ba^{2+}$  con un sólo sitio receptor, efecto similar al reportado en otros  $K_{IR}$ 's (Standen y Stanfield, 1978).

Por otro lado, se midió el efecto del  $Ba^{2+}$  sobre  $K_{IR-endo}$  en el estado estacionario (corriente tardía), donde se observó una gran dependencia del voltaje (Fig. 19 B). Esto se confirmó al



graficar la fracción de corriente resistente al bloqueo en función del potencial de membrana, donde se observó cómo cambia tal fracción conforme se modifica el potencial, independientemente de la concentración de  $Ba^{2+}$  utilizada (0.3, 0.5, 1, 3, 7 mM) (Fig. 20 B). Al calcular la fracción del campo eléctrico transmembranal al que se encuentra el sitio de unión al  $Ba^{2+}$  ( $\delta$ ), se encontró un valor del 26% ( $\delta = 0.26$ ), por lo que se supondría que cambios en el potencial afectan la cinética de unión entre el  $Ba^{2+}$  y sus sitios de unión (diferente al reportado para  $K_{IR}$  de músculo esquelético de rana, donde  $\delta = 0.6$ , Standen y Stanfield, 1978), donde al incrementar la concentración de  $Ba^{2+}$  disminuyó la corriente al final del pulso, así cualquier cambio en el potencial de la membrana puede afectar la cinética de unión para el  $Ba^{2+}$ , de tal forma que cuando el potencial se vuelve más negativo, la atracción interna sobre el  $Ba^{2+}$  externo crece y por lo tanto la afinidad del sitio aumenta (Fig. 22;  $K_d = 0.31$  mM a -160 mV), mientras que a potenciales menos negativos la afinidad disminuye (Fig. 22;  $K_d = 1.9$  mM a -60 mV). Calculando el coeficiente de Hill con los datos obtenidos de la Fig. 20 B se obtuvo un valor  $>1$  ( $n=1.5$  a -160 mV). Esto nos indica que puede existir más de un sitio de unión interno para el  $Ba^{2+}$  con cierto grado de cooperatividad entre estos sitios. Por otro lado, el hecho de que la corriente al final del pulso mostrara una clara dependencia del voltaje, permite suponer que tales sitios se localizan profundamente en el poro de conducción iónica del canal.

En la Fig. 23 se resumen de manera esquemática las anteriores consideraciones mecanísticas del efecto del  $Ba^{2+}$  sobre el canal. En el panel A se ilustra la existencia de un sólo receptor interno para el  $Ba^{2+}$ , tal como se ha propuesto para otros  $K_{ir}$ 's (Hagiwara y cols, 1978; Standen y Stanfield 1978). Alternativamente, en el panel B, se muestra nuestra propuesta basada en la existencia de múltiples sitios internos (al menos dos, que determinarían el bloqueo de la corriente al final del pulso de manera dependiente de voltaje y de tiempo), aunados a un sitio presente en el vestibulo externo, responsable del bloqueo de la corriente al pico.

Es claro que la respuesta a estas interrogantes relacionadas con el efecto del  $Ba^{2+}$  sobre la  $K_{ir-endo}$  requerirá de mayor experimentación, para lo cual es necesario la clonación del canal, lo cual permitirá posteriormente la realización de estudios de la relación estructura-función mediante mutagénesis dirigida.

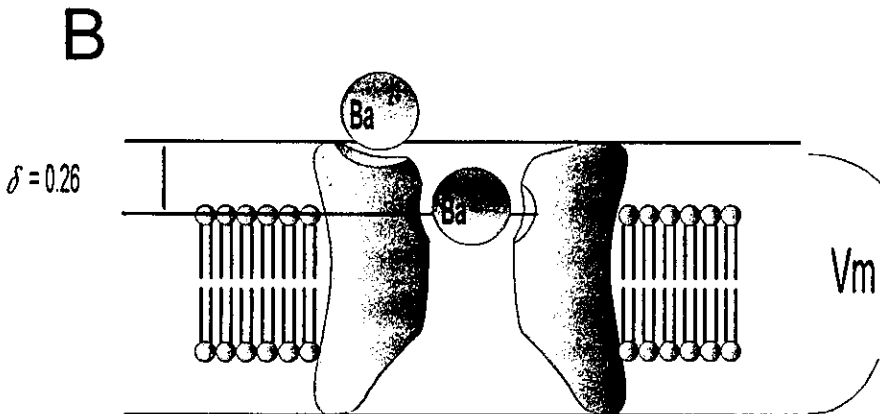
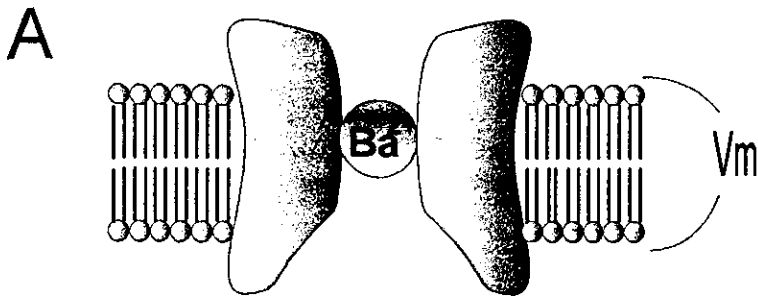


Figura 23. Posibles sitios de unión para el  $Ba^{2+}$ . **A.** Modelo de un sitio de unión para explicar el el bloqueo del  $Ba^{2+}$  sobre  $K_{ir}$ 's. **B** Modelo de multiples sitios de unión, propuesto para explicar el efecto del  $Ba^{2+}$  externo sobre  $K_{ir}$ .

endo.

## · Comparación con Otras Corrientes de $K^+$ con Propiedades de Rectificación Entrante.

Se han observado diferencias significativas con otros  $K_{IR}$  reportados anteriormente. Una de las principales diferencias es la baja sensibilidad al  $Ba^{2+}$  de  $K_{IR-endo}$  con respecto a otros  $K_{IR}$ , ya que aún utilizando  $[Ba^{2+}]_o$  altas (7mM) no se logró un bloqueo completo de  $K_{IR-endo}$ , mientras que otros reportes indican que con  $[Ba^{2+}]_o$  de 300  $\mu M$  sobre  $I_{K1}$  (Kubo y cols, 1993), 0.18 mM sobre  $I_{C-endo}$  (Gopal y cols, 1994) ó 2.0 mM sobre músculo esquelético (Standen y Stanfield, 1978), se bloquea completamente la corriente. Estos datos son ampliamente utilizados como una herramienta experimental para poder disecar las corrientes endógenas de los ovocitos de *Xenopus laevis* de alguna corriente exógena que se pretenda expresar en este tipo de células ampliamente utilizadas en la biología molecular para la clonación de este tipo de proteínas que expresan canales de  $K^+$ . Por lo que esta corriente endógena es de gran importancia, es por su cinética de compuerta la cual es dependiente solamente de voltaje, lo que representa una característica única entre los  $K_{IR}$ . Esta característica diferente al resto de los  $K_{ir}$ , refleja variaciones importantes en la estructura de la proteína formadora del canal. Mientras que los canales rectificadores entrantes de  $K^+$  son caracterizados por tener solamente dos segmentos hidrofóbicos transmembranales (M1 y M2) en cada subunidad, los canales de  $K^+$  activados por voltaje presentan seis segmentos transmembranales (S1 - S6) con un segmento S4 el cual se ha postulado ser el sensor voltaje. De esta manera, la activación de  $K_{IR-endo}$  la cual parece depender de voltaje pudiese tener un dominio semejante a S4. Además, como la activación de  $K_{IR-endo}$  es dependiente de pulsos hiperpolarizantes, esto podría implicar la existencia de un funcionamiento inverso o de una región semejante a S4 cargada negativamente. Para poder dilucidar esta hipótesis es necesario la clonación de esta proteína y poder hacer estudios de su relación estructura-función para poder entender las bases físicas de las propiedades funcionales de este canal endógeno de rectificación entrante de  $K^+$ .

## B I B L I O G R A F I A

- 1) Adelman J.P, Shen K.Z, Kavanaugh M.P; Warren R.A, Wu Y.N, Lagrutta A. (1992) *Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs*. *Neuron*, 9:209-216.
- 2) Adrian RH, Candker WK, Hodgkin AL (1970) *Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle*. *Journal of Physiology* 208:645-668.
- 3) Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP IV, Boyd AE III. (1995) *Cloning of the  $\beta$  cell high affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion*. *Science* 268:423-426.
- 4) Almers W (1972a) *The decline potassium permeability during extreme hyperpolarization in frog skeletal muscle*. *Journal of Physiology* 225:57-83
- 5) Almers W (1972b) *Potassium conductance changes in skeletal muscle and the potassium concentration in the transverse tubules*. *Journal of Physiology* 225:33-56.
- 6) Ammala C, Moorehouse A, Glibo F, Ashfield R, Proks P. (1996) *Promiscuous coupling between the sulfonylurea receptor and inward rectifier potassium channels*. *Nature* 379:545-548.
- 7) Arellano R.O, Woodward R. M, Miledi R. (1995) *A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes*. *Journal of Physiology (Lond)*; 484: 593-604.
- 8) Ashen DM, O'Rourke B, Kluge KA, Johns DC, Tomaselli GF. (1995) *Inward rectifier K channels from human heart and brain: cloning and stable expression in a human cell line*. *American Journal Physiology* 268:H506-H511.
- 9) Ashford MLJ, Bond CT, Blair TA, Adelman JP (1994) *Cloning and functional expression of a rat heart  $K_{ATP}$  channels*. *Nature* 370:456-459.
- 10) Barish ME (1983) *A transient calcium dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte*. *Journal of Physiology* 342:309-325.

- 11) Baud C, Kado R.T, Marcher K (1982) *Sodium Channels induced by despolarization of the Xenopus laevis Oocyte*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA **79**:3188-3192.
- 12) Bauer CK, Meyerhof W, Schwarz JR, (1990) *An inward rectifying K current in clonal rat cell and its modulation by thyrotrophin releasing hormone*. Journal of Physiology **129**:169-189.
- 13) Bauer KC, Falk F, Schwarz JR. (1996). *An endogenous inactivating inward-rectifying potassium current in oocytes of Xenopus laevis*. Pflügers Archives **432**:812-820.
- 14) Biermans G, Vereecke J, Carmeliet E (1987) *The mechanism of the inactivation of the inward rectifying K current during hiperpolarization steps in guinea-pig myocytes*. Pflügers Archives **410**:604-613.
- 15) Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block, JH (1995) *ROMK inwardly rectifying ATP sensitive K channel. II. Cloning and distribution of alternative forms*. American Journal of Physiology **268**: F1132-1140.
- 16) Bond CT, Pessia M, Xia XM, Lagrutta A, Kavanaugh NP, Adelman JP (1994) *Cloning and expression of a family of inward rectifying potassium channels*. Receptor and Channels. **2**:183.191.
- 17) Calleweart G, Vereecke J and Carmeliet E (1986) *Existence of a calcium-dependent potassium channel in the membrane of cow cardiac Purkinje cells*. Pflügers Archives **406**:424-426.
- 18) Chang H, Jan YN, Jan LY (1996) *A strongly inwardly rectifying K channels modulated by M1 acetylcholine receptor*. Biophysics Journal **70**:A73.
- 19) Chesnoy-Marchais D. (1982) *Characterization of a chloride conductance activated by hiperpolarization in Aplysia neurons*. Journal of. Physiology.(Lond), **342**: 277-408.
- 20) Chesnoy-Marchais D y Evans M.G. (1986) *Chloride channels activated by hyperpolarization in Aplysia neurons*. Pflügers Archives. **407**: 694-696.
- 21) Clark R.B., Nakajima T., Giles W., Kanai K., Momose Y. and Szabo G. (1990): *Two distinct types of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in bull-frog atrial myocytes*. Journal of Physiology. **424**: 229-251.

- 22) Cooper KE, Tang JM, Rae JL, Eisenberg RS. (1986) *A cation channel in frog epithelia responsive to pressure and calcium*. Journal of Membrane Biology. **93**:259-269.
- 23) Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, DiMugno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, y cols (1993) *Atrial G protein activated K<sup>+</sup> channels: expression cloning and molecular properties*. Proceedings National Academy Science USA, **90**:10235-10239.
- 24) Dumont J.N. (1970) *Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin) Stages of oocyte on the development in laboratory maintains animals*. Journal of Morphology. **136**: 153-180.
- 25) Duprat F, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Hugnot J, Bigay J, Lazdunsky M, Romey G, Barham (1995) *Heterologous multimeric assembly is essential for K<sup>+</sup> channels activity of neuronal and cardiac G-protein activated inward rectifiers*. Biochemical Biophysical Reserch Communication **212**:657-663.
- 26) Eyring H, Lumry R, Woodbury JW (1949) *Some aplications of modern rate theory to physiological systems*. Rec Chem Prog **10**:100-114.
- 27) Fakler B, Brandle U, Glowatski E, Zenner HP, Ruppertsburg JP (1994) *Kir 2.1 inward rectifie K channels are regulated independently by protein kinase and ATP hidrlysis*. Neuron **13**:1413-1420.
- 28) Fakler B; Blande U; Glowatzki E; Koning C; Adelman JP; Zenner HP and Ruppertsberg JP. (1995) *Strong voltage-depend inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine* Cell. **80**: 149-154.
- 29) Ferrer J, Nichols CG, Makhina EN, Salkoof L, Bernstein J. (1995) *Pancreatic islet cells express a family of inwardly rectifyier K<sup>+</sup> chamels subunits which interact to form G<sub>i</sub> protein-activated channels*. Journal Biochemical Chemistry. **270**:26086-26091.
- 30) Frankenhaeuser B, Hodkin AL (1957) *The action of calcium on the electrical proprieties of squid axon*. Journal of Physiology **137**:218-244.
- 31) French RJ, Worley JF, Wonderlin WF, Kruger RK (1994) *Ion premeation divalent ion block and chemical modification of single sodium channels*. Journal general of Physiology **103**:447-470.
- 32) Ficker E, Tagliatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM (1994) *Spermine and spermedine as gating molecules for inward rectifier K channels*. Science **266**:1068-1072.

- 33) Fukushima Y (1982) *Blocking kinetics of the anomalous potassium rectifier of tunicate egg studied by single channel recording*. Journal of Physiology **331**:311-331.
- 34) Gilbert DL, Ehrenstein G. (1969) Effect of divalent cation on potassium conductance of squid axon. Biophysics J. **9**:447-463.
- 35) Glowatzky E, Flecker G, Brandle U, Rexhausen U, Zenner HP. (1995) *Subunit dependent assembly of inward rectifier K<sup>+</sup> channels*. Procs. R. Soc London Ser. **B261**:251-261.
- 36) Gopal CW, Ackerman SJ, Adward Jhon III, Jones LR, Moorman JR (1994) *Hiperpolarization activated chloride currents in Xenopus oocytes*. Journal General Physiology. **103**:217-230.
- 37) Guharay F, Sachs F. (1985) *Mechanotransductor ion channels in chick skeletal muscle: effects of extracellular pH*. Journal of Physiology (Lond) **353**:319.
- 38) Gurdon J.B, Lance C.D, Wooland H.R and Marbaix G. (1971) *Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells*. Nature **233**:177-182.
- 39) Hagiwara S, Takahashi K. (1974) *The anomalous rectification and cation selective of the membrane of starfish egg cell*. Journal Membrane Biology. **18**:61-80.
- 40) Hagiwara S, Miyazaki S, Rosenthal NP. (1976) *Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish*. Journal. General Physiology. **67**: 621-638.
- 41) Hagiwara S, Miyazaki S, Moddy W, Patlak J. (1978) *Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg*. Journal of Physiology, **279**:167-185.
- 42) Hagiwara S, Yoshii (1975) *Effects of internal potassium and sodium the anomalous rectification starfish eggs as examined by internal perfusion*. Journal of Physiology. (Lond) **292**:251-265
- 43) Harvey R.D, Eick Ten R.E. (1988) *Characterization of the inward rectifying potassium current in cat ventricular myocytes*. Journal General Physiology. **91**:593-615.
- 44) Harvey R.D, Eick Ten R.E. (1989) *Voltage dependent block of cardiac inward rectifying potassium current by monovalent cations*. Journal General Physiology. **94**:349-361.

- 45) Hartzell HC (1988) *Regulation of cardiac ion channel by catecholamines acetylcholine and second messenger systems*. Prog. Biophysics Molecular Biology **52**:167-245.
- 46) Hedin KE, Lim NF, Clampham DE. (1996) *Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel subunit that permit GIRK1 expression of I<sub>KACH</sub> currents in oocytes*. Neuron, **16**:423-429.
- 47) Heginbotham L, Abramson T, Mackinnon R (1992) *A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K channels*. Science **258**:1151-1155.
- 48) Henry P, Pearson WL, Nichols CG. (1996) *Protein Kinase C inhibition of cloned inward (HRK1/Kir 2.3) K<sup>+</sup> channels*. Journal of Physiology. In press
- 49) Hestrin S. (1981) *The interaction of K<sup>+</sup> with the activation of anomalous rectification of frog muscle membrane*. Journal of Physiology **317**:497-508.
- 50) Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanizirska MV, Hebert SC. (1993) *Cloning and expression of an inward rectifying ATP-regulated potassium channel*. Nature, **362**:31-38.
- 51) Hodgkin, A.L., Huxley A.F. 1952. *A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve*. Journal of Physiology. (Lond.) **117**:500-544.
- 52) Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW (1990) *Biophysical and molecular mechanisms of shaker potassium channels inactivation*. Science. **250**:533-538.
- 53) Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY. (1995) *Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G-protein gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is important for channel activation*. neuron **15**:1133-1143.
- 54) Inagaki N, Tsuura Yn Namba N, Masuda K, Gono T. (1995). *Cloning and functional characterization of a novel ATP sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including, pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle and heart*. Journal Biochemical Chemistry **270**: 5691-5694.
- 55) Ishihara K, Mitsurge T, Noma A, Takano M (1989) *The Mg block and intrinsic gating underlying inward rectification of the K current in the guinea pig cardiac myocytes*. Journal of Physiology **419**:297-320.



- 56) Ishihara K, Hiraoka M (1994) *Gating mechanism of the cloned inward rectifier potassium channels from the mouse heart*. Journal Membrane Biology 142:55-64
- 57) Josephson IR, Brown AM (1986) *Inwardly rectifying single channel and whole cell K<sup>+</sup> current in rat ventricular myocytes*. J. Memb. Biol. 94:19-35
- 58) Kameyama M, Kiyosue T & Soejima M (1983) *Single channel analysis of the inward rectifier K current in the rabbit ventricular cells*. Japanese Journal of Physiology. 33:1039-1056.
- 59) Karschin C Schreibley W, Dascal N, Lester H, Davidson N, Karschin A. (1994) *Distribution and localization of a G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in rat*. FEBS letters 348:139-144.
- 60) Katz B. (1949) *Les constantes électriques de la membrane du muscle*. Archives Science of Physiology. 2: 285-299.
- 61) Kell MJ, DeFelice LJ (1988) *Surface charge near the cardiac inward rectifier channels measured from single channel conductance*. Journal Membrane Biology. 102:1-10.
- 62) Kenna S, Roper J, Ho K, Hebert S, Ashcroft SJ, Ashcroft FM. (1994) *Differential expression of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels ROMK1 in rat brain*. Molecular Brain Reserch 24:353:356.
- 63) Kowdley GC, Ackerman SI, Eduard Jhon II, Jones LR, Moorman JR (1994) *Hiperpolarization activated chloride currents in Xenopus oocytes*. Journal General of Physiology 103:217-230.
- 64) Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE (1995). *The protein G gated atrial K<sup>+</sup> channels IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel proteins* Nature 374:135-141.
- 65) Krapivinsky G, Krapivinsky L, Wickman K, Clapham DE (1995). *G beta gamma binds directly to the protein G gated K<sup>+</sup> channel, IKACH*, Journal Molecular Chemistry. 270:29059-62.
- 66) Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY: (1993a) *Primary structure and functional expression of mouse inward rectifier potassium channel*. Nature (Lond); 362:127-133.

- 67) Kubo, Y., E. Reuveny, P.A. Slesinger, Y.N. Jan, Jan L.Y. (1993b). Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature (Lond.)*. **364**:802-806.
- 68) Kurachi Y (1985) *Voltage dependent activation of the inward rectifier potassium channel in the ventricular cell membrane of the guinea pig heart*. *Journal of Physiology* **366**:365-385.
- 69) Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. (1982) *Cholinergic and catecholaminergic receptor in the Xenopus oocytes membrane*. *Journal of Physiology* **328**:143-170.
- 70) Leech CA, Stanfield PR. (1981) *Inward rectification in frog skeletal muscle fibers and its dependence on membrane potential and external potassium*. *Journal of Physiology (Lond)* **354**:253-272.
- 71) Leonard JP, Nargeot J, Snutch TP, Davidson N, Lester HA (1987) *Ca channels induced in Xenopus oocytes by rat brain mRNA*. *Journal Neuroscience* **7**:875-881.
- 72) Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. (1994) *Potassium channel block by cytoplasmatic polyamines as the mechanisms of intrinsic rectification*. *Nature* **372**:366-369.
- 73) Lopatin AN, Makhina EN, Nichols C. J (1995) *The mechanism of inward rectification of potassium channels*. *Journal General Physiology*. **106**: 923-955.
- 74) Lu Z, McKinnon R. (1994). *Conductance maximum observed in an inward rectifying potassium channels*. *Journal General Physiology*. **104**:477-486.
- 75) Makhina EN, Kelly AJ, Lopatin AN, Mercer RW, Nichols CG (1994) *Cloning and expression of a novel human brain inward rectifying potassium channels*. *Journal Biological Chemistry*. **269**: 20468-20474.
- 76) McKinnon R. (1991) *Determination of the subunit stoichiometry of a voltage activated potassium channel* *Nature* **350**:232-235.
- 77) McNicholas CM, Cuggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME. (1996) *Sensitivity of a renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound, glibenclamide, is enhanced by coexpression with the ATP binding cassette transporter CFTR*. *Proceedings National Academy Science USA* In press.
- 78) Matsuda A, Sperelakis N. (1993) *Inwardly rectifying potassium current in rat fetal and neonatal ventricular cardiomyocytes*. *American Journal Physiology* **265**:H1107-H1111.

- 79) Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. (1987) *Ohmic conductance through the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel and blocking by internal Mg<sup>2+</sup>*. Nature (Lond) **325**: 156-159.
- 80) Matsuda H, Matsuura H, Noma A (1989) *Triple-barrel structure of inward rectifying K<sup>+</sup> channels revealed by Cs<sup>+</sup> and Rb<sup>+</sup> block in guinea-pig heart cells*. Journal of Physiology **413**:139-157.
- 81) Mazzanti M, DiFrancesco D (1989) *Intracellular Ca modulated K inward rectification in cardiac myocytes*. Pflugers Archives **413**:322-324.
- 82) Metshfeel C, Witzemann V, Sakman B, Takahashi T, Mishina M, Numa S. (1986) *Patch clamp measurements on Xenopus laevis oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptors and Na channels*. Pflugers Archives. **407**: 557-588.
- 83) Miledi R (1982) *A calcium-dependent transient outward current in Xenopus laevis oocytes*. Proc R Soc (Lond), **215**:491-497.
- 84) Miledi R, Parker I: (1984) *Chloride current induced by injection of calcium into Xenopus oocytes*. Journal of Physiology (Lond), **357**:173-183.
- 85) Moorman JR, Palmer CJ, John JE, Duriex ME, Jones LR (1992) *Phospholeman expression induces a hyperpolarization activated chloride current in Xenopus oocytes*. The Journal Biological Chemistry. **267**:14551-14554.
- 86) Morris CE (1990) *Mechanosensitive ion channels* Journal of membrane Biology **133**:93-101.
- 87) Ohmori H (1978) *Inactivation kinetics and steady state current noise in the anomalous rectifier of the tunicate egg cell membrane*. Journal of Physiology **281**: 77-79.
- 88) Ohmori H (1980) *Dual effect of K<sup>+</sup> ions upon the inactivation of the anomalous rectifier of the tunicate egg cell membrane* Journal of Membrane Biology. **53**: 143-150.
- 89) Parker I, Gundersen C B, Miledi R (1984) *A transient inward current elicited by hyperpolarization during serotonin activation in Xenopus oocytes*. Proc. R. Soc. Lond. **B223**:279-292.
- 90) Parker I y Miledi R (1987a) *Inositol triphosphate activates a voltage dependent calcium influx in Xenopus oocytes*. Proceedings. Royal. Society. Lond. **B231**:27-36.
- 91) Parker I, Miledi R. (1987b) *Tetrodotoxin-sensitive sodium currents in native Xenopus oocytes*. Proceedings. Royal. Society. Lond. **B232**: 289-296.

- 92) Parker I, Miledi R: A (1988) *calcium-independent chloride current activated by hyperpolarization in Xenopus oocytes*. Proceedings National Academy Science USA; **91**:6240-6244.
- 93) Parker I, Ivorra I (1990) *A slowly inactivating potassium current in native oocytes of Xenopus laevis*. Proceedings. Real. Society Lond **238**:369-381.
- 94) Peres A, Bernardini G (1983) *A hiperpolarization-activated chloride current in Xenopus laevis oocytes under voltage clamp*. Pflugers Archives **399**: 157-159.
- 95) Peres A y Bernardini G, Mancinelli E, Ferroni A. (1985) *A voltage dependent K channel controlling the membrane potential in frog oocytes* Pflugers Archives **403**:41-46.
- 96) Perier F, Radeke CM, Vandenberg CA. (1994) *Primary structure and characterization of a small conductance inwardly rectifying potassium channel*. Proceedings National Academy Science USA **91**:6240-6244.
- 97) Raab-Graham KF, RadekeCM, Vanderberg CA. (1994) *Molecular cloning and expression in the human heart inward rectifier K<sup>+</sup> channel*. Neuroreport **5**:2501-2505.
- 98) Sachs F (1988) *Mechanical transduction in biological systems*. CRC Critical Review of Biomedical Engineering **16**:141-169.
- 99) Sakmann B., Noma A, Trautwein W. (1983): *Acetylcholine activation of single muscarinic K<sup>+</sup> channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart*. Nature **303**: 250-253.
- 100) Sakmann B, Trube G (1984a) *Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart*. Journal of Physiology **387**:227-250.
- 101) Sakmann B, Trube G (1984b) *Voltage-dependence inactivation of inward rectifying single channel current in the guinea-pig heart cells membrane*. Journal of Physiology **347**:659-683.
- 102) Sakmann B, Methfessel C, Meshina M, Takahashi T, Takai T, Kurasaki M, Numa S (1985) *Role of acetylcholine receptor subunits in gating of the channel*. Nature **318**:538-543.
- 103) Schreibmayer W, Dessauer CW, Voroboiv D, Gilman AG, Lester HA (1996) *Inhibition of a inwardly rectifying K channel by G protein a subunits*. Nature **80**:624-627.

- 104) Selyanko A. (1984)  $Ca^{2+}$  suppresses a time dependent  $Cl$  current in rat sympathetic neuron. *Journal of Physiology (Lond)* **350**: 49p.
- 105) Shimoni Y, Clark RB, Gies WR (1992) *Role of a inwardly rectifying potassium current in the rabbit ventricular action potential*. *Journal of Physiology* **448**:709-727.
- 106) Shing SL, Clement JP IV, Bryan J, Nichols CG (1996) *Cloned  $K_{ATP}$  channels show mild inward rectification resulting from voltage dependent block by  $Mg^{2+}$  and polyamines*. *Journal of Physiology (Abstr)* **494**:51-52.
- 107) Shioya T (1990) *Development of a fast and large capacity data sampling program in BASIC*. *Journal of Physiology Society Japanese* **52**:345-354.
- 108) Shuck ME, Bock JH, Benjamin CW, Tsai TD, Lee KS. (1994) *Cloning and characterization of multiple forms of the human kidney ROMK-K potassium channel*. *Journal of Biological Chemical*. **269**:24261-24270.
- 109) Sigurdson WJ, Bedard E, Morris CE. (1987) *Stretch activated  $K^+$  channels in molluscan neurons*. *Biophysical Journal*. **51**:50a.
- 110) Silver M. R, DeCoursey T.E. (1990) *Intrinsic gating of inward rectifier in bovine pulmonary artery endothelial cells in the presence or absence of internal  $Mg^{2+}$* . *Journal. General of Physiology* **96**: 109-133.
- 111) Sperelakis N, Schneider MF, Harris EJ (1967) *Decreased  $K^+$  conductance preceded by  $Ba^{+2}$  in frog sartorius fiber*. *Journal of General Physiology* **50**:1565-1583.
- 112) Standen NB, Stanfield PR (1980) *Rubidium block and rubidium permeability of inward rectifier of the frog skeletal muscle fibers*. *Journal of Physiology* **304**:415-435.
- 113) Standen NB, Stanfield PR: (1978) *A potential and time dependent blockade in inward rectification in frog skeletal muscle fibers by barium and strontium ions*. *Journal of Physiology* **280**:169-191
- 114) Tagliatela M, Wible BA, Caporaso R, Brown BM (1994) *Specification of pore properties by the carboxyl terminus of inward rectifying channels*. *Science*. **264**: 844-847.
- 115) Takahashi T, Neher E, Sakman B. (1987) *Rat brain serotonin receptor in Xenopus oocytes are coupled to endogenous channels*. *Proceedings National Academy Science USA*, **84**:5063-5067.

- 116) Tzounopoulos T, Mayle J, Adelman JP. (1995) *Induction of endogenous channel by high levels of heterologous membrane proteins in Xenopus oocytes*. Biophysical Journal **69**:904-908.
- 117) Vandenberg CA. (1987) *Inward rectification of a potassium channels in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions*. Proceedings. National Academy Science. USA **84**: 2560-2564.
- 118) Weber WM, Asher C, Garti H, Clauss W (1992) *Expression of amiloride sensitive Na channels of hen lower intestine in Xenopus oocytes*. Biochemistry Biophysical Acta. **111**:158-164.
- 119) Whaler GM (1992) *Developmental increases in the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current of rat ventricular myocytes*. American Journal of Physiology **262**:C1266-C1272.
- 120) Wible BA, Tagliatela M, Ficker E, Brown AM. (1994) *Gating of inward rectifying K<sup>+</sup> channels localized to a single negatively charged residue*. Nature. **371**: 246-249.
- 121) Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Tagliatela M, Brown AM. (1995) *Cloning and functional expression of a inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels from human atrium*. Circulation Reserch **76**:343-350.
- 122) Xu ZC, Yanf Y, Hebert SC (1996) *Phosphorilation of the ATP sensitive inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, ROMK, by cyclic AMP dependent protein kinase*. Journal Biological Chemistry. **271**:9313-9319.
- 123) Yang XC, Sachs F (1988) *Stretch-activated ion channels in Xenopus oocytes: permeation and block*. Biophysical Journal **53**:412.
- 124) Yang XC, Sachs F (1989) *Block of Stretch-Activated Ion Channels in Xenopus Oocytes by Gadolinium and Calcium Ions*. Science **245**: 1068-1071.
- 125) Yang XC, Sachs F (1990) *Characterization of stretch-activated ion channels in Xenopus oocytes*. Journal of Physiology. (Lond) **431**:103-122.
- 126) Yang XC, Guharay F, Sachs F (1996) *Mechanotransducing ion channel: ionic selectivity and coupling to viscoelastic elements of the cytoskeleton*. Biophysical Journal **51**:252a
- 127) Yang J, Jan YN, Jan LY. (1995) *Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel*. Neuron **15**:1441-1447.

- 128) Yano H, Philipson LH, Kugler JL; Tokoyuma Y, Davis EM (1994) *Alternative splicing in human inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel ROMK1 mRNA*. *Molecular Pharmacology*. **45**:854-860.
- 129) Zhou H, Tate SS, Palmer LG. (1994) *Primary structure and functional properties of an epithelial K<sup>+</sup> channel*. *American Journal of Physiology* **266**:C809-824.