

00581

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR Y

BIOESTRUCTURA

Estudio de la relación estructura-función entre el canal de potasio

HERG y una toxina del alacrán *Centruroides noxius*: Ergtoxina

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA

M. EN C. LILIANA PARDO LOPEZ

COMITÉ TUTORAL

Dr. Lourival D. Possani Postay

Dr. Froylán Gómez Lagunas

Dr. Joel Osuna Quintero

JURADO DE EXAMEN

Presidente Dra. Alejandra Bravo

Secretario Dr. Lourival D. Possani Postay

Vocal Dr. David Naranjo

Vocal Dr. Ricardo Felix

Vocal Dr. Lorenzo Segovia

Suplente Dra. Claudia Treviño

Suplente Dr. Baltazar Becerril Luján

Cuernavaca Morelos México

Marzo 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la asesoría del Dr. Lourival D. Possani Postay. Asimismo, parte de los experimentos se hicieron en estancias cortas en las siguientes Universidades: University of Wisconsin-Madison U.S.A. bajo la asesoría de la Dra. Gail Robertson y, Virginia Commonwealth University U.S.A. bajo la asesoría de la Dra. Gea-Ny Tseng.

Este trabajo contó con la ayuda financiera de las siguientes instituciones:

Howard Hughes Medical Institute, donativo No. 55000574, DGAPA-Universidad Nacional Autónoma de México, donativo No. IN216900, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), donativos No. 31691-N y Z-005 al laboratorio del Dr. L. Possani.

Beca crédito de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con No. de registro 96124 y beca complemento de DGEP-Universidad Nacional Autónoma de México

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN.....	6
TOXINAS	6
CANALES IÓNICOS.....	7
ACTIVACIÓN, CIERRE E INACTIVACIÓN DEL CANAL HERG	11
REGIÓN DEL PORO.....	13
ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN ENTRE UN CANAL DE POTASIO Y UNA TOXINA.	14
ANTECEDENTES	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
RESULTADOS.....	26
ESPECIFICIDAD	26
DOSIS RESPUESTA DE LA ERGTOXINA.....	29
EFECTO DE LA ERGTX EN DIFERENTES QUIMERAS.	30
LOCALIZACION DEL SITIO DE INTERACCION DE LA ERGTX MEDIANTE EL USO DE MUTAGENESIS DE CISTEINAS.....	33
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE POTASIO EXTERNO.....	36
EFECTO DE LAS FUERZAS ELECTROSTÁTICAS EN EL BLOQUEO DE ERGTX.	38
DEPENDENCIA DE VOLTAJE EN EL BLOQUEO DE LA ERGTX.....	40
EFECTO DEL TEA EN EL CANAL HERG.....	42
TOXINAS TIPO ERG.....	44
DISCUSIÓN.....	46
MODO DE ACCIÓN DE LA ERGTOXINA	51
LA VOLTAJE DEPENDENCIA DE LA TOXINA.....	52
MODELO DE INTERACCIÓN TOXINA-CANAL.....	53
CONCLUSIONES.....	61
PERSPECTIVAS	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXO I.....	71
ANEXO II	77

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación esquemática en una dimensión de una subunidad α de un canal de potasio dependiente de voltaje.</i>	9
<i>Figura 2. Corrientes típicas del canal HERG.</i>	12
<i>Figura 3. Secuencias comparativas de la región P representativas de diferentes familias de canales voltaje dependientes.</i>	14
<i>Figura 4. Interacción entre un canal de potasio y una toxina de alacrán.</i>	15
<i>Figura 5. Estructura tridimensional representativa de las toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de potasio.</i>	16
<i>Figura 6. Alineamiento de secuencias de toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de potasio representativas de cuatro familias.</i>	18
<i>Figura 7. La ErgTx es específica para el canal HERG.</i>	27
<i>Figura 8. Efecto de la ErgTx en canales de la subfamilia EAG.</i>	28
<i>Figura 9. La inhibición de la amplitud de la corriente del canal HERG usando ErgTx es dosis dependiente y reversible al lavado.</i>	29
<i>Figura 10. Efecto de la ErgTx en quimeras hechas entre el canal m-EAG y HERG.</i>	31
<i>Figura 11. Efecto de la ErgTx en la quimera HMH.</i>	31
<i>Figura 12. Efecto de la ErgTx en la quimera MHM.</i>	32
<i>Figura 13. Efecto de la ErgTx en la quimera M382H.</i>	33
<i>Figura 14. Efecto del bloqueo de la ErgTx en las sustituciones por cisteínas de las asas S5 y S6 del canal HERG.</i>	35
<i>Figura 15. Efecto del potasio externo en el bloqueo de la ErgTx.</i>	37
<i>Figura 16. Efecto del cambio de pH_o en el bloqueo de ErgTx usando canales HERG WT y mutantes en el sistema de ovocitos de Xenopus.</i>	39
<i>Figura 17. Dependencia del voltaje en el bloqueo del canal HERG por la ErgTx a pH 6.5 y 8.5.</i>	41
<i>Figura 18. Efecto del TEA en diferentes mutantes del canal HERG.</i>	43
<i>Figura 19. Curva dosis-respuesta de varias Ergtoxinas.</i>	45
<i>Figura 20. Carencia de correlación entre los cambios inducidos en la función del canal HERG y la potencia de la ErgTx.</i>	49
<i>Figura 21. Modelo stereo tridimensional de la interacción de un canal de potasio con una toxina de alacrán obtenida a partir de las estructuras cristalográficas por separado.</i>	55
<i>Figura 22. Estructura primaria de la ErgTx.</i>	56
<i>Figura 23. Medidas del vestibulo externo del poro.</i>	57
<i>Figura 24. Esquema de una estructura hipotética de α-hélice que comprende la región 583-594 del asa S5-P del canal HERG.</i>	59
<i>Figura 25. Modelo del canal HERG y específicamente del vestibulo externo del poro.</i>	60

RESUMEN

En el presente trabajo se analiza la relación estructura-función de la Ergtoxina (ErgTx), obtenida a partir del veneno del alacrán *Centruroides noxius* y el canal de potasio ERG (*ether a-go-go* related gene) de hipocampo humano, mediante la combinación de técnicas de biología molecular y electrofisiología.

Se demuestra que la ErgTx es un bloqueador específico del canal HERG, porque no altera ni modifica las corrientes iónicas de otros siete canales de potasio, incluyendo dos canales de la misma familia del HERG: *ether a-go-go* (EAG) y *ether a-go-go* like potassium channel (ELK).

Para localizar el sitio de unión de la ErgTx al canal, se construyeron tres quimeras utilizando el canal m-EAG y el canal HERG. La quimera HMH que contiene el segmento de la región P (asa S5-poro-asa S6) de m-EAG insertado en el canal HERG abolió completamente el efecto bloqueador de la ErgTx. Por otro lado, dos quimeras que contienen la región P del canal HERG en el canal m-EAG, recobraron la sensibilidad por la ErgTx.

Posteriormente se investigó el sitio específico de unión a la toxina utilizando mutagénesis puntual en las asas extracelulares S5 y S6 del canal HERG. Cada uno de los 51 aminoácidos de esta región fue sustituido por el aminoácido cisteína y expresado en ovocitos de *Xenopus*. Asimismo se estudió el bloqueo de las corrientes de cola obtenidas de cada una de las mutantes probando 10 nM de ErgTx. De este estudio se identificaron tres aminoácidos (W585, G590 y I593) en la posición media del asa S5 y uno en el asa S6 (P632), los cuales se piensa están participando en la unión con la toxina. Estos aminoácidos son muy diferentes a los encontrados en los canales de potasio voltaje dependientes que interaccionan con otras toxinas de alacrán, sugiriendo que la unión de la ErgTx al canal HERG es diferente a la forma comúnmente reportada.

Utilizando los resultados de la mutagénesis sitio específica y los resultados de predicción de estructura secundaria, se propone que la parte media del asa S5-P del canal HERG forma una hélice α anfipática y junto con el asa P-S6 forman un sitio de unión hidrofóbico para la ErgTx.

ABSTRACT

This thesis reports the study of the mechanism and site of action whereby a HERG-specific scorpion peptide toxin Ergtoxin (ErgTx) suppresses HERG current. We show here that ErgTx is a bona fide, specific blocker of the human *ether-a-go-go*-related gene (HERG) channels. It does not affect the function of either m-EAG or m-ELK channels. A chimeric construction containing a segment of the P-region of m-EAG channel inserted into the HERG channel drastically diminished the inhibitory effect of ErgTx, whereas chimeras of the P-region of HERG channel into M-eag channels rescued the blocking effect. We apply cysteine scanning mutagenesis to the S5-P and P-S6 linkers of HERG and examine the resulting changes in ErgTx potency. ErgTx binds to the outer vestibule of HERG channels, but do not completely occlude the pore. In contrast to AgTx/*Shaker* interaction, elevating $[K]_o$ (2 to 98 mM) does not affect ErgTx potency, and through-solution electrostatic forces only play a minor role in influencing ErgTx/HERG interaction. Cysteine mutations of three residues in S5-P linker (W585, G590 and I593) and one residue in P-S6 linker (P632) induced severe changes in ErgTx binding ($\Delta\Delta G > 2$ kcal/mol). We propose that the long S5-P linker of the HERG channel forms an amphipathic α -helix that, together with the P-S6 linker, forms a hydrophobic ErgTx binding site. This study paves the way for future mutant cycle analysis of interacting residues in the ErgTx/HERG complex which, in conjunction with NMR determination of the ErgTx solution structure, will yield information about the topology of HERG's outer vestibule.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

TOXINAS

Las toxinas peptídicas constituyen la familia más importante de los componentes encontrados en los venenos de muchos organismos (alacranes, moluscos, anémonas, arañas, peces, serpientes etc.) (Possani y cols. 1999, MacIntosh y cols. 1999, Kem y cols. 1999, Grishin 1999). La mayoría de las toxinas descritas tienen como moléculas receptoras una gran variedad de canales iónicos (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^-). Esto sugiere que durante la evolución de las toxinas, éstas se diversificaron hasta cubrir una gran variedad de moléculas receptoras, asegurando que el veneno inhibiera una fracción importante de los diferentes canales iónicos de su presa.

Específicamente, del veneno de alacrán se han reportado 200 diferentes toxinas que afectan canales iónicos, esto representa sólo el 0.02% de péptidos que contiene el veneno. Existen más toxinas aisladas que aún no se ha identificado su molécula receptora, y esto se debe a la falta de ensayos biológicos donde una toxina pueda probarse en la mayor cantidad de canales iónicos representativos de las diferentes familias y subfamilias.

Con la metodología existente (cromatografías, espectrometría de masas, clonación y expresión de genes, ensayos de unión, electrofisiología etc.) se ha podido identificar toxinas que afectan canales de potasio. Entre las toxinas más estudiadas se encuentran la caribdotoxina (ChTx), la noxiustoxina (NxTx), la agiotoxina (AgTx) (Possani y cols. 1999), cuya característica principal como explicaremos posteriormente con más detalle, es que son bloqueadoras del poro del canal.

También se han identificado toxinas que afectan canales de sodio, como la toxina II de *Androctonus australis* Hector (AaHII), la toxina II de *Centruroides suffusus suffusus* (CssII), y la toxina 2 de *Centruroides noxius* (Cn2) (Gordon y cols. 1998, Possani y cols. 1999). Las toxinas que afectan a los canales de sodio fueron inicialmente clasificadas en toxinas α siendo las que enlentecen la inactivación y toxinas β las que desplazan el voltaje de activación a potenciales más negativos (Possani y cols. 1999). Actualmente existe una nueva clasificación que divide las toxinas en 11 subfamilias de acuerdo a las similitudes y diferencias en la estructura primaria, los efectos fisiológicos y en la especificidad preferencial hacia diversas especies de animales

(Possani y cols. 1999).

Para los canales de cloro sólo se ha reportado la clorotoxina (ClTx), la cual a diferencia de todas las demás toxinas, actúa intracelularmente (Debin y cols. 1993).

Por último las toxinas que afectan canales de calcio sensibles a rianodina representadas por la Imperatoxina (IpTx1) (Valdivia y cols. 1998), y la kurttoxina que afecta la función de los canales de calcio tipo T, aunque esta última también bloquea a los canales de Na⁺ sensibles a voltaje (Chuang y cols. 1998).

En nuestro laboratorio se estudia la relación estructura función de toxinas extraídas del veneno de alacrán. Recientemente se descubrió un nuevo tipo de toxina (Ergtoxina) que altera la función de los canales de potasio tipo HERG. A continuación presento una introducción de los canales iónicos con especial énfasis en el canal de K⁺ HERG.

CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que tienen como función mantener el potencial de membrana durante el reposo, generar señales eléctricas mediante el cambio transitorio de la concentración de sodio y potasio, facilitar el flujo de iones de calcio (segundo mensajero), controlar el volumen celular y regular el flujo neto de los iones a través de la membrana plasmática.

Los canales iónicos controlan procesos fisiológicos como el inicio de la contracción muscular, la conducción del impulso nervioso, la transmisión sináptica, la secreción de hormonas y neurotransmisores, también participan en la fecundación y en la generación del latido cardiaco. Existen canales altamente selectivos a iones K⁺, Na⁺, Ca²⁺ y Cl⁻, y en base a esta selectividad se han clasificado en diferentes superfamilias (Hille 2001).

Los canales de potasio representan al grupo más diverso de los canales iónicos, posiblemente como resultado de la duplicación génica y/o “splicing” alternativo de los genes; son proteínas ubicuas y están presentes en todos los tipos celulares. En las células eucariontes, los canales de potasio están involucrados en la señalización neuronal, en la generación del ritmo cardiaco y actúan como efector en la vía de transducción de señales involucrando receptores acoplados a proteínas G. También

son blanco de varios mecanismos intracelulares, de tal suerte que una mala regulación puede desencadenar una condición patológica (Hille 2001). En las células procariontes, los canales ayudan a mantener la homeostasis iónica y son cruciales para su crecimiento (Armstrong y cols. 1998, Choe 2002).

Los canales de potasio están constituidos por cuatro subunidades que se agrupan en la membrana para formar una vía de permeabilidad a iones entre el exterior y el interior de una célula. Esta vía está incluida en una región llamada 2TM/P formada por dos hélices transmembranales y una región P (asa S5-poro-asa S6) (figura 1A y 1B). La región 2TM/P es característica de todos los canales de potasio, pero dependiendo de la subfamilia del canal pueden llegar a tener 1 o 2 regiones 2TM/P (Lu y cols 2001). Por ejemplo, un canal dependiente de voltaje tiene cuatro hélices transmembranales (S1-S4) que preceden a una región 2TM/P (figura 1A). La hélice S4 de los canales voltaje dependientes está cargada positivamente (figura 1A y B) y tiene la capacidad de responder a cambios en el potencial de membrana, posiblemente moviéndose hacia fuera en la depolarización (apertura del canal) causando un cambio conformacional (Cha y cols. 1999, Glauner y cols. 1999). La selectividad iónica es controlada por el filtro de selectividad (Bezanilla y Armstrong 1972), el cual se ubica en la región P (figura 1A y 1B). El filtro de selectividad está formado por los oxígenos carbonilos de las cadenas principales de algunos aminoácidos (marcados en negro en la figura 3) y mide 12 Å de largo y 2.5 Å diámetro (Doyle y cols. 1998). Los canales también cuentan con un dominio de tetramerización (T1) formado por los primeros 130 aminoácidos que anteceden a la hélice S1 (figura tridimensional 1B ubicado en la parte inferior). Este dominio es importante para la tetramerización de los canales y está muy conservado dentro de los canales de potasio voltaje dependientes provocando que se formen heterotetrameros entre subfamilias de ellos (Li y cols. 1992, Shen y cols. 1993, Bixby y cols. 1999, Zerangue y cols. 2000, Kreuzsch y cols. 1998). A los primeros 30 aminoácidos del canal se les conoce como la bola de inactivación (Fig. 1A señalado con flechas). Esta bola está unida al dominio T1 a través de un asa flexible de aproximadamente 30 aminoácidos llamada cadena (figura 1B marcado con la letra A). La bola y la cadena forman una estructura capaz de ocluir físicamente el lado intracelular de poro, inactivando así al canal (Antz y cols. 1997).

A principios de los años noventas se identificó una nueva familia de canales de potasio denominada EAG. El primer canal (del mismo nombre) fue identificado en mutantes de mosca *Drosophila*, las cuales exhibían espontáneamente ráfagas de potenciales de acción repetitivas en los axones motores de las uniones neuromusculares, provocándoles un temblor de las extremidades similar al efecto que les provoca el éter, por esta razón se les llamó *ether-a-go-go* (EAG) (Drysdale y cols. 1991, Warmke y cols. 1991, Zhong y Wu 1991, Robertson y cols. 1996).

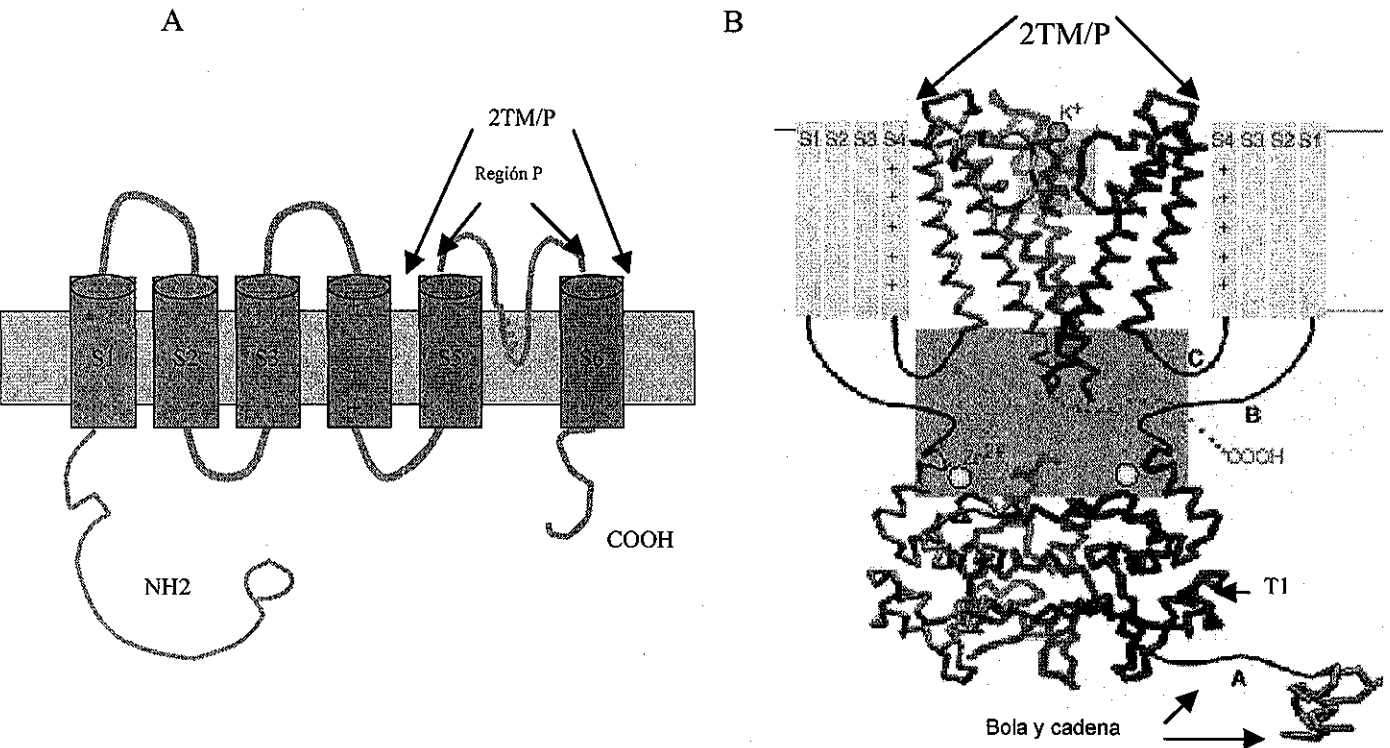


Fig 1. Representación esquemática en una dimensión de una subunidad α de un canal de potasio dependiente de voltaje.

A) La región 2TM/P y la región P están señaladas con flechas, y el sensor del voltaje con signos +. B) Representación tridimensional de un canal de potasio voltaje dependiente corte transversal. La parte superior del dibujo muestra el dominio transmemembranal formado por la región 2TM/P representada por las hélices y el filtro de selectividad a los iones potasio (estructura obtenida del canal bacteriano *KcsA*). Los segmentos S1-S4 están representados en rectángulos grises. La hélice S4 está cargada de residuos básicos. La parte inferior muestra el dominio citoplásmico formado por el dominio de tetramerización TI (estructura tridimensional obtenida del canal *Kv 3.1*) y el segmento N terminal que forma la cadena y la bola responsables de la inactivación. Tomado de Choe 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La identificación de este canal llevó a una búsqueda de canales relacionados y actualmente la familia EAG ha sido dividida en tres subfamilias: EAG, *ERG* (*ether a-go-go* related gene) y ELK (*ether a-go-go* like K⁺ channel). Los tres miembros de la familia EAG guardan un 49% de similitud y tienen una estructura similar a los canales dependientes de voltaje (ver la figura 1A), pero a diferencia de estos canales la familia EAG cuenta con un dominio de unión a nucleótidos cíclicos en la región C-terminal citoplasmática, similar al que presentan los canales catiónicos modulados por nucleótidos (Warmke y Ganetzky 1994).

El gen de *ERG* codifica para una subunidad α del canal, que al ensamblarse como tetrámeros en la membrana forma el componente mayoritario de la corriente I_{kr} , la cual es muy importante en la repolarización ventricular cardiaca (Trudeau y cols. 1995, Sanguinetti y cols. 1995). Mutaciones en el gen del canal *ERG* causan el síndrome QT2 largo. Este desorden genético es caracterizado por una prolongación de la onda QT en el electrocardiograma causando una arritmia ventricular polimórfica conocida como “torsades de pointes”. Estas arritmias frecuentemente se relacionan a un incremento de la actividad adrenérgica. Por ejemplo, el ejercicio o el estrés emocional pueden causar paros cardiacos, fibrilación ventricular o muerte súbita (Roden y cols 1989, Curran y cols. 1995, Kiehn y cols. 1996, Sanguinetti y cols. 1996, Kagan y cols. 2000). Se ha reportado que el canal *ERG* humano (*HERG*) puede suprimir latidos extras (esta característica se la confiere su rectificación entrante de la que se hablará más adelante) lo cual explicaría la muerte cardiaca repentina en pacientes que carecen de corrientes *HERG* (Miller y cols. 1996).

Existe un tipo de Síndrome LQT adquirido, el cual es causado como un efecto colateral de tratamientos con medicamentos comunmente usados: antiarrítmicos, antihistamínicos, antibióticos, fármacos psicoactivos, agentes procinéticos gastrointestinales etc. El síndrome LQT adquirido está asociado a una reducción de los niveles de potasio en el suero (hipokalemia), causado por los fármacos que bloquean o modifican los canales de potasio dependientes de voltaje. Aún no se conocen todos los elementos que hacen al canal *HERG* (y no a otro canal) un blanco

fácil de estos fármacos, esto representa el mayor obstáculo para el desarrollo de fármacos nuevos y seguros (Chouabe y cols. 2000; Drici y cols. 2000, Vandenberg y cols. 2001). Mitcheson y cols. (2000) proponen que ciertos fármacos como los antihistamínicos, antiarrítmicos o procinéticos gastrointestinales forman interacciones con los residuos aromáticos exclusivos del canal HERG que se encuentran en la región del poro y del dominio S6.

El estudio de la estructura función del canal HERG ha sido realizado básicamente usando mutaciones sitio dirigidas, deleciones de fragmentos del canal, construcción de quimeras, cristalización de un segmento del canal, así como la utilización de algunos agentes que modifican la actividad de los canales. A continuación resumiré algunos de los hallazgos más importantes que se han obtenido con el estudio de este canal.

ACTIVACIÓN, CIERRE E INACTIVACIÓN DEL CANAL HERG.

La activación de este canal es lenta y existe evidencia de que el asa S4/S5 de la región citoplasmática está implicada en dicho mecanismo; esto se dedujo debido a que mutaciones puntuales en esa región y en la mitad del C-terminal del S6 tienen efectos en la voltaje dependencia y en la cinética de activación y cierre del canal (Sanguinetti y cols. 1999, Sanguinetti y Xu 1999). El mecanismo de cierre también es lento y se ha reportado que está modulado por la región amino terminal del canal HERG mediante un mecanismo similar a la inactivación tipo N del canal *Shaker*. Esto se comprobó al eliminar el fragmento 2-354 del N-terminal lo cual da como resultado la aceleración del cierre del canal (Wang y cols. 1998). Otro hallazgo en este sentido ha sido la delimitación de un péptido de 14 aminoácidos del N-terminal (2-16), el cual al ser adicionado en el lado citoplasmático del canal puede estabilizarlo en el estado abierto, (Wang y cols 2000). Una región hélice-vuelta-hélice fue identificado cristalográficamente y se le llamó dominio PAS “Per-Arnt-Sim”, esto corresponde a los primero 135 aminoácidos del canal (Morais Cabral y cols. 1998). Esta estructura sugiere que la superficie hidrofóbica del motivo PAS puede ser el sitio de interacción

con otras regiones del canal y de esta forma estabiliza la unión del dominio N-terminal en el estado abierto. Cuando se mutan aminoácidos en este dominio, se acelera el cierre del HERG probablemente porque afecta la estructura del dominio PAS y se desestabiliza la unión con el sitio involucrado en la activación (Chen 1999).

La rectificación entrante (una característica del canal HERG que limita las corrientes salientes a potenciales despolarizados) es debida a una rápida inactivación y no está acoplada al cierre ni a la apertura del canal, ver figura 2 (Spector y cols. 1996; Schonherr y cols. 1996; Wang y cols. 1998, Schonherr y cols. 1999). Los rectificadores entrantes son un tipo de canales de potasio que conducen preferencialmente corrientes entrantes de potasio a voltajes negativos cercanos al potencial de equilibrio del potasio. A voltajes despolarizados estos canales se cierran y así ayudan a mantener el potencial de reposo. En el corazón, estos canales también tienen pequeñas conductancias salientes que regulan el potencial de reposo y contribuyen a la fase terminal de la repolarización.

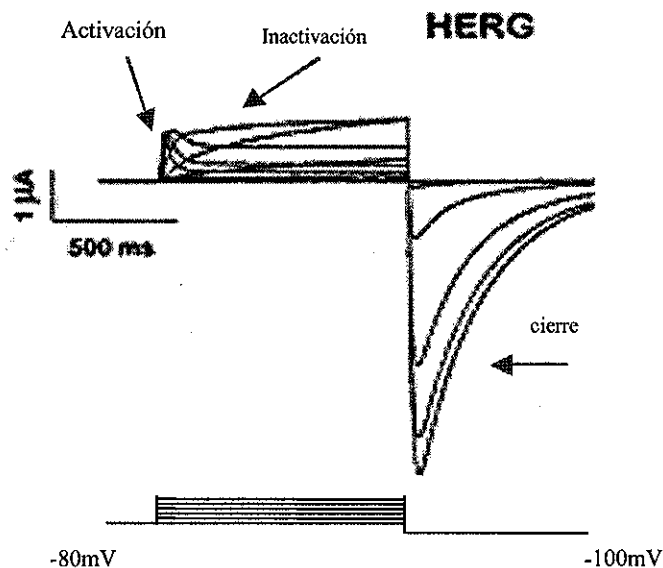


Figura 2. Corrientes de K^+ típicas a través del canal HERG.

Las corrientes se obtuvieron mediante depolarizaciones de -80 mV hasta $+60\text{ mV}$ y repolarizando a -100 mV , con un potencial de mantenimiento de -80 mV . Las diferentes estados del canal se señalan con flechas

El canal HERG tiene un mecanismo de inactivación que atenúa el flujo de iones durante la depolarización haciéndolo similar a los rectificadores entrantes de dos

segmentos transmembranales. Es importante mencionar que esta característica de rectificador hace reaccionar al canal cuando hay un latido prematuro, es decir, ayuda al potencial de acción cardíaco a regresar rápidamente al potencial de reposo, impidiendo de esta manera que se de una arritmia cardíaca (Trudeau y cols. 1995, Smith y cols. 1996).

La inactivación puede perderse si se mutan algunos residuos de la región P y del N-terminal del dominio S6, algunos de ellos son equivalentes a los residuos importantes para la inactivación tipo C del canal *Shaker*, sugiriendo un mecanismo similar en estos dos procesos de inactivación (Hoshi y cols. 1991, Smith y cols. 1996, Schonherr y cols. 1996, Hezberg y cols. 1998, Zou y cols. 1998). La cinética de inactivación del HERG es más rápida que la del *Shaker* y se ha propuesto que es debido a que la boca externa del poro del canal HERG es más estrecha y flexible, de este modo los rearreglos durante el proceso de inactivación del HERG requieren movimientos más pequeños y son mucho más rápidos (Dun y cols. 1999).

REGIÓN DEL PORO

La región del poro de canal HERG también ha sido estudiada y se ha encontrado diferencias entre este canal y otros canales dependientes de voltaje que tienen secuencias consenso. El canal *Shaker* tiene dos triptofanos (WW) en la región del poro y una tirosina (Y) en el filtro de selectividad del canal (GYG) señalados con asteriscos en la figura 3. De acuerdo a la estructura cristalográfica del canal KcsA, se pueden formar puentes de hidrógeno alrededor de la boca externa del poro entre los nitrógenos de los WW y los grupos hidroxilos de la Y de las cuatro subunidades (Doyle y cols 1998). En el canal HERG los WW son reemplazados por YF (carentes de nitrógenos) y la Y es reemplazada por fenilalanina (carente de grupos hidroxilos) ver figura 3, por lo tanto los puentes de hidrógeno en HERG se pierden y esto hace más estrecha, pero más flexible la boca del poro (Tseng 2001).

El asa S5-P del HERG comprende 43 aminoácidos, este tamaño de asa es mucho más grande que mayoría de las asas S5-P de los canales dependientes de voltaje (10-18

aminoácidos ver figura 3). El asa S5-P del canal HERG juega un papel importante en la función del canal, estudios de mutaciones hechas en el centro de la misma sugieren que esta asa puede interactuar con la boca externa del poro y participar en procesos de inactivación y selección iónica (Dun y cols. 1999). Diecisiete mutaciones que causan el síndrome QT largo se encuentran en el asa S5-P del HERG, dichas mutaciones pueden causar defectos en la maduración del canal y su correcto transporte a la superficie celular, o pueden causar alteraciones en la función del canal que está correctamente ensamblado en la membrana (Zhou y cols. 1998, Splawaki y cols. 2000, Keating y cols. 2001).

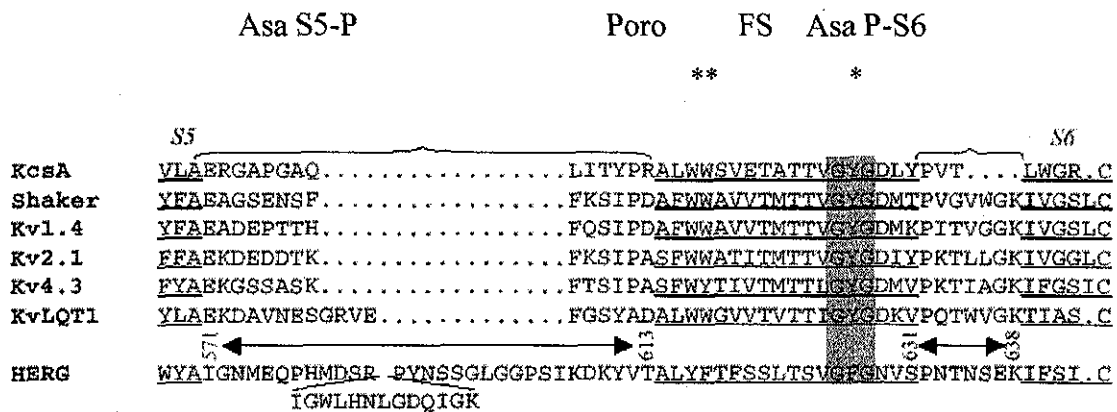
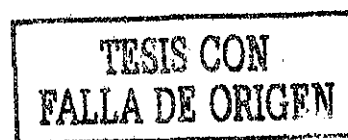


Figura 3. Comparación de secuencias de la región P representativas de diferentes familias de canales voltaje dependientes. Las llaves horizontales señalan las asas extracelulares, la región subrayada señala el poro de los canales. La región sombreada representa el filtro de selectividad y los asteriscos los aminoácidos que forman puentes de hidrógeno.

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN ENTRE UN CANAL DE POTASIO Y UNA TOXINA.

En la actualidad las interacciones toxina-canal más estudiadas han sido las formadas entre las toxinas que afectan canales de potasio y los canales de potasio voltaje dependientes, probablemente debido a que estas toxinas se han usado ampliamente como herramientas farmacológicas en la identificación de subunidades de canales y como bloqueadoras de corrientes de potasio en el estudio de otros canales.



De acuerdo a su interacción con los canales de potasio las toxinas pueden clasificarse en: bloqueadoras del poro de canal y modificadoras del mecanismo de apertura, cierre e inactivación del canal. Las primeras se unen al vestíbulo externo del poro con una estequiometría 1:1 ocluyéndolo físicamente e impidiendo el paso de iones, éste es el caso de todas las toxinas de alacrán que afectan canales de potasio: Noxiustoxina (NxTx), Caribdotoxina (ChTx), Agiotoxina (AgTx) figura 4 (Possani y cols 1999b). Cabe mencionar que estas toxinas bloqueadoras pueden ser o no, dependientes de voltaje. Las segundas se unen al canal modificando el mecanismo de apertura y cierre. Un ejemplo es la Hanatoxina obtenida del veneno de araña, que actúan en el asa extracelular S3-S4 y tiene una estequiometría de 1:4 (canal:toxina), el sitio de unión está marcado con la flecha superior en la figura 4 (Swartz y MacKinnon 1997a y 1997b, Li-Smerin y Swartz 1998, Takahashi y cols. 2000).

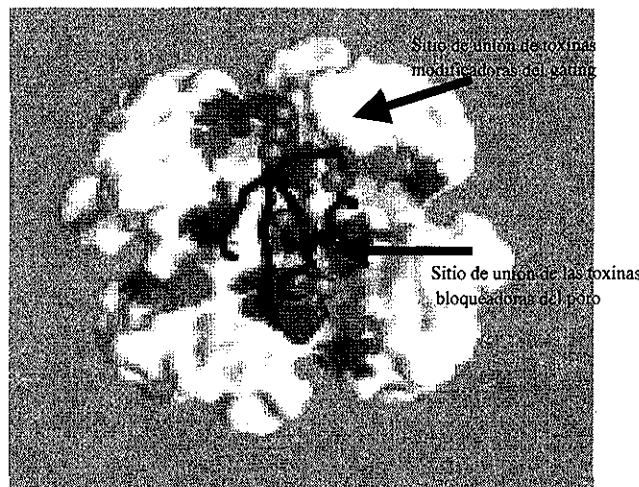


Figura 4. Interacción entre un canal de potasio y una toxina de alacrán.

La parte en color blanco representa el tetrámero de un canal de potasio, la figura en color negro representa una toxina de alacrán que bloquea el poro del canal. La flecha de arriba indica el sitio donde se unen las toxinas modificadoras del mecanismo de compuerta de un canal de potasio y que tiene una estequiometría 1:4, es decir, 4 moléculas de toxina pueden estar unidas al mismo tiempo en un canal, mientras que las bloqueadoras se unen 1:1. La figura representa la unión de la AgTx al canal Kv 1.3.

Las toxinas de alacrán que bloquean canales de potasio (α -KTx) contienen de 23-42 aminoácidos con 6 u 8 cisteínas que forman 3 ó 4 puentes disulfuro (Tytgat y cols. 1999, Batista y cols. 2000). Todas las estructuras tridimensionales de toxinas de alacrán reportadas a la fecha forman una familia estructural denominada α/β

estabilizada por puentes disulfuro (ver figura 5). La estructura representativa de esta familia tiene tres hojas β antiparalelas unidas a una α -hélice por puentes disulfuro lo cual la hace una molécula muy compacta donde todos los residuos están expuestos al solvente excepto las cisteínas (Martins y cols. 1990, Botems y cols. 1992, Jonson y Sugg 1992, Menuier y cols. 1993, Fernández y cols. 1994, Duplais y cols. 1995, Krezel y cols. 1995, Blanc y cols. 1996, Delepierre y cols. 1997, Tenenholz y cols. 1997, Kharrat y cols. 1997).

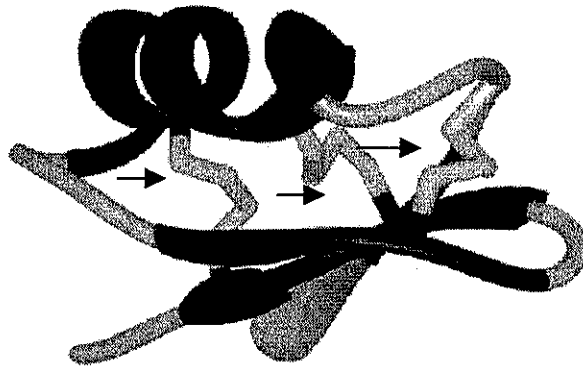


Figura 5. Estructura tridimensional representativa de las toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de potasio.

El modelo corresponde a la Margatoxina (Kharrat y cols 1997). Los puentes disulfuro se señalan con flechas.

El estudio del complejo toxina-canal se ha abordado desde diferentes enfoques entre los que se encuentran estudios farmacológicos, bioquímicos, electrofisiológicos y de biología molecular. Los estudios de biología molecular y bioestructura han avanzado significativamente en las últimas dos décadas debido a la clonación y expresión funcional tanto de las toxinas como de los canales iónicos. Entre los hallazgos más relevantes de estos estudios encontramos:

- A) La determinación de la composición tetramérica de los canales de potasio demostrando que el canal *Shaker* puede tener 4 sitios de unión para la ChTX, energéticamente equivalentes, pero sólo uno de ellos puede ocuparse a un tiempo (MacKinnon y Miller 1988 y 1989, MacKinnon 1990).
- B) La identificación de la región formadora del poro del canal por donde fluyen los iones. Varias observaciones contribuyeron a esta identificación. Un resultado

clave fue la desestabilización de la unión de la toxina al canal ocasionada por cationes monovalentes aplicados por el lado citoplasmático de la célula. La pérdida de afinidad por el canal sugiere que los iones permeantes ocupan un lugar cercano al sitio de unión de las toxinas en la vía de la conducción (poro), causando así una repulsión electrostática con las cargas positivas de la toxina. La carga positiva que media este efecto ha sido localizada en la cadena lateral de la lisina 27 en la caribdotoxina o su equivalente en otras toxinas que se unen al poro de los canales de potasio (Park and Miller 1992, Goldstein y Miller 1993). Un resultado que corroboró que las toxinas se unen al poro del canal fue el desplazamiento de la ChTx (unida al canal *Shaker*) por un bloqueador de canales de K^+ (TEA). Este bloqueador se une al residuo T449 ubicado en la entrada de la boca externa del poro, esto sugiere que el sitio de unión tanto de la toxina como del TEA se sobreponen (Miller 1988, MacKinnon y Yellen 1990)

- C) Mediante el uso de mutaciones sitio específicas tanto de la toxina como del canal, y ciclos de dobles mutantes se obtuvieron las primeras evidencias directas de la dimensión de la región del vestíbulo externo del poro del canal. Estos estudios fueron basados en la triangulación física de la distancia entre residuos de la toxina que se unen a residuos del canal, dando como dimensiones 30 Å de ancho y 4-6 Å de profundidad (Stampe y cols 1994, Stocker y Miller cols 1994, Goldstein y cols 1994, Hidalgo y MacKinnon 1995, Ayar y cols 1996, Ranganathan y cols 1996, Naranjo y Miller 1996, Gross y MacKinnon 1996). Todas estas aproximaciones fueron corroboradas en 1998 cuando se obtuvo la primera estructura tridimensional de un canal de potasio (Doyle y cols. 1998). Cabe mencionar que a la fecha sólo se ha obtenido la estructura tridimensional de dos canales de potasio: el KcsA de *Streptomyces lividans* el cual cuenta con dos segmentos transmembranales similares a la región 2TM/P de los canales dependientes de voltaje (Doyle y cols 1998) y el MscL, un canal mecanosensible de *Mycobacterium tuberculosis* cuya estructura es similar a las proteínas de barriles β (Chang y cols 1998). Recientemente se reportaron las estructuras tridimensionales dos canales de cloro obtenidos de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Dutzler y cols 2002).

ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio fue aislada una toxina del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* a la cual se llamó Ergtoxina (ErgTx). La ErgTx tiene 42 aminoácidos entre los que se encuentran 8 cisteínas que forman 4 puentes disulfuro (Scaloni y cols. 2000). Su estructura primaria es diferente a las toxinas bloqueadoras de canales de K⁺ reportadas hasta el momento (ver figura 6), incluyendo las de alacrán, anémona, caracol, serpiente y araña (secuencias no mostradas).

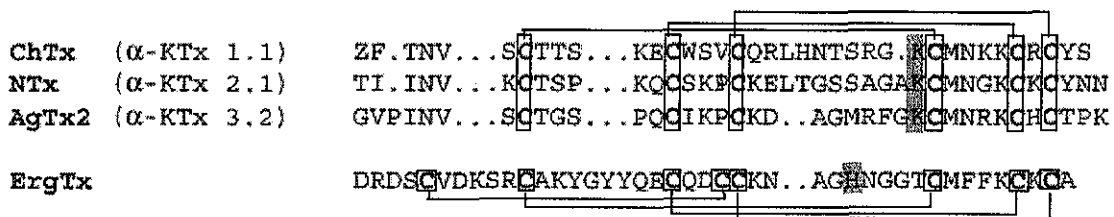


Figura 6. Alineamiento de secuencias de toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de potasio representativas de cuatro familias.

ChTx=caribdotoxina, Ntx=noxiustoxina, AgTx2= agiotoxina, ErgTx= ergtoxina. Los puentes disulfuro están representados con líneas y la lisina 27 o 28 está sombreada, nótese que la ergtoxina no cuenta con un resíduo equivalente a éste.

La ErgTx fue ensayada en corrientes de varios tipos de canales de potasio: corriente rectificadora entrante clásica (I_{RK1}), rectificadora tardía lenta (I_{ks}), rectificadora entrante débil ($I_{K(ATP)}$), rectificadora tardía (I_{EAG}) y corrientes entrantes de ERG (I_{herg}). La ErgTx aplicada extracelularmente inhibió específicamente las corrientes del canal ERG ($IC_{50} = 16 \pm 1$ nM), convirtiéndola así en la primera toxina reportada que bloquea dichos canales (Gurrola y cols. 1999).

Estudios electrofisiológicos realizados en células derivadas de neuroblastomas de ratón, indican que la ErgTx no está afectando el mecanismo de activación y cierre del canal ERG (Gurrola y cols. 1999). Estos resultados sugieren que la ErgTx podría estar afectando el mecanismo de permeabilidad funcionando como un péptido bloqueador.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

HIPÓTESIS

Nosotros proponemos que la interacción de la ErgTx con el canal HERG es diferente a los modelos reportados con otras interacciones toxina-canal, y esta hipótesis la apoyamos fundamentalmente en dos evidencias:

1. La estructura tridimensional de todas las α -KTx conocidas es muy similar, pero existen variaciones en la secuencia de aminoácidos, en el tamaño de las hebras β , del tipo de vuelta β y/o el tipo de hélice (α -hélice vs. 3_{10} hélice) que las hacen tener diferente selectividad por el poro de diferentes canales de potasio. Aunque todavía no conocemos la estructura tridimensional de la ErgTx creemos que es similar a las reportadas para otras toxinas (tipo α/β estabilizada por puentes disulfuro), pero debido a que su secuencia primaria es diferente esto podría afectar la localización de las cadenas laterales haciendo que las interacciones con la boca externa del poro sean diferentes.
2. Por otro lado, existe una variabilidad complementaria entre los residuos de las subunidades α que forman los canales de potasio tetraméricos y con la ayuda de la estructura tridimensional del canal de potasio bacteriano (KcSA) se pueden hacer inferencias de que residuos podrían estar participando en la unión de las toxinas. Sin embargo, esto se complica cuando la secuencia primaria del poro del canal es mucho más grande que la reportada para el KcSA. Este es el caso de la región P del canal HERG el cual cuenta con un asa S5-P de 43 aminoácidos, es decir 27 aminoácidos más que el asa S5-P promedio de un canal voltaje dependiente.

Estos datos favorecen el estudio a detalle de la relación estructura-función del canal HERG y la ErgTx. En un futuro esperamos que los resultados obtenidos en este trabajo aporten datos para el conocimiento y diseño racional de moléculas con potencial farmacológico para el tratamiento del síndrome QT largo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación estructura función entre el canal de potasio HERG y la toxina de *Centruroides noxius* Ergtoxina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la ErgTx nativa en el poro del canal usando quimeras hechas entre el canal HERG y el canal m-EAG.
2. Diseñar, clonar y expresar mutantes sitio dirigidas del poro del canal de potasio HERG para dilucidar los aminoácidos que están participando en la unión de la toxina.
3. Análizar las propiedades de las mutantes del poro del canal.
4. Estudiar las propiedades de bloqueo de la ErgTx nativa en cada una de las mutantes del canal.
5. Proponer un modelo de interacción entre la ErgTx y el canal HERG.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta sección está dividida en tres partes, metodología bioquímica, metodología de biología molecular y metodología de electrofisiología.

-Bioquímica

Purificación de la ErgToxina

El veneno fue purificado del alacrán *Centruroides noxius* como se describe previamente en Gurrola (1999). El veneno crudo fue disuelto en agua y centrifugado a 10,000 x g por 15 minutos. El sobrenadante fue liofilizado y guardado a -20 °C. Posteriormente el veneno fue pasado por una columna de Sephadex G-50 para una filtración en gel. La fracción número II de esa cromatografía fue aplicada directamente a una columna C18 (Vydac, Hisperia, CA) para una cromatografía líquida de fase reversa. La columna se eluyó con un gradiente lineal de 5% de solvente A (ácido trifluoroacético 0.12% en agua) a 60% de solvente B (ácido trifluoroacético 0.10% en acetonitrilo) por 90 min. El componente eluido al minuto 30 se usó para una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) usando una columna analítica C18 de fase reversa. Finalmente se obtuvo un componente mayoritario (ErgTx), cuya estructura primaria fue obtenida por secuencia directa de aminoácidos y espectrometría de masas.

-Biología Molecular

Construcción de quimeras

La nomenclatura que usamos para denominar a las quimeras fue usando la primera letra de cada canal (H para el canal HERG y M para el canal m-EAG). De este modo la quimera HMH fue construida con la región S1-S5 de HERG, la región P de m-EAG y el S6 de HERG (ver figura 9). La estrategia para construir esta quimera fue basada en dos reacciones de cadena de la polimerasa (PCR) para obtener la región P (asa S5-P-asa S6) del canal m-EAG (ver esquemas de abajo). En la primer PCR se utilizó un oligo 3' (oligo 1 ver abajo) que empalma con el N-terminal del poro de m-EAG y contiene además 20 nucleótidos del canal HERG, y el oligonucleótido 5' (oligo 2) que

empalma con el C-terminal del poro de m-EAG y contiene una mutación silente para quitar el sitio de restricción de *Bgl* II. Se obtuvo un producto del tamaño esperado y éste se usó para una segunda PCR donde se tenía como templado el canal HERG, además del oligonucleótido 3' que empalma con el poro del m-EAG (oligo 2) y un oligonucleótido nuevo (oligo 3) que empalma con el canal HERG y que incluye el sitio para *BstE* II. El producto final (asa S5-S6 de m-EAG con un fragmento 5' del HERG) y el canal HERG (clonado en el vector pCDNA3 y al que se le eliminó un sitio interno de *Bgl* II) fueron digeridos con las enzimas *Bgl* II y *BstE* II. Finalmente el producto de PCR fue subclonado en el sitio correspondiente al cDNA de HERG. Este cDNA codifica para una proteína quimérica compuesta de la secuencia de HERG desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido C566 donde cruza con el aminoácido I396 del canal m-EAG. El canal m-EAG continua hasta el aminoácido K577 donde vuelve a cruzar con el aminoácido K638 de HERG.

Las quimeras MHM y M382H fueron construidas usando la técnica recombinante *in vitro* descrita por Hezberg y cols 1998. La quimera MHM está compuesta por el aminoácido 1 al V449 del canal m-EAG, donde cruza con el aminoácido V611 de HERG. El fragmento del canal HERG continua hasta el aminoácido L650 donde se inserta el carboxilo terminal del canal m-EAG a partir del residuo L482.

La quimera M382H está formada de dos partes, la primera del canal m-EAG del aminoácido 1 al 382 y la segunda por el canal HERG del aminoácido 619 en adelante.

Oligo 1

5' CTA GCC TGC ATC TGG TAC GCC ATC GGC GAC TAT GAA ATC TTT GAT 3'

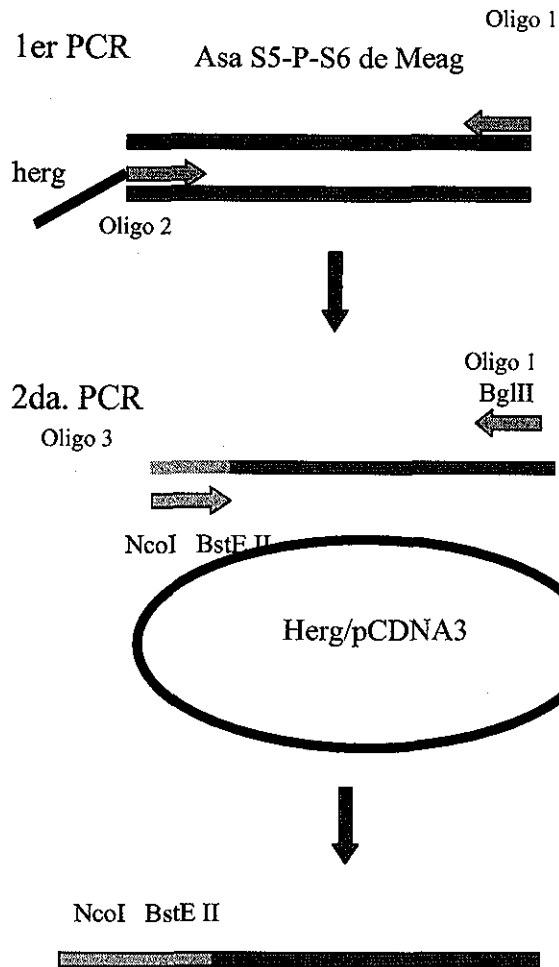
Región que hibridiza con el canal HERG

Oligo 2

5' GTT GAG CAT CTC GTG GAT CCT 3'

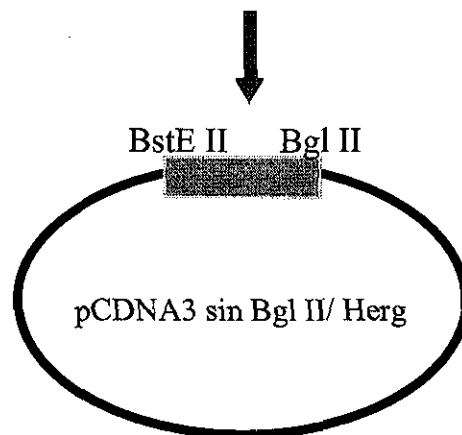
Oligo 3

5' GGA CGA AGT GAC AGC CAT GG 3'



Asa S5-P-S6 de Meag con un fragmento de Herg

Digerir con *BstE II* y *Bgl II* tanto el asa S5-P-S6 de m-EAG, como el canal HERG y ligar



Selección de colonias positivas
Purificación de plásmido
Secuencia

Mutantes sitio específicas.

Para las mutaciones sitio específicas se utilizaron dos técnicas: el primer método fue mediante el solapamiento de oligonucleótidos donde se usaron oligonucleótidos que correspondían a extremos 5' y 3' alejados de la región que se iba a mutar. En la primera PCR se amplificó la mitad de cada ADNc de interés usando un oligonucleótido mutagénico y un oligo alejado de la mutación en dos reacciones de PCR separadas. Así se amplificó el ADNc con el tamaño esperado en dos mitades y cada una contenía la mutación deseada. Se purificaron los productos a partir de un gel de agarosa al 1% y se procedió a hacer la segunda PCR, ya que la región mutada es complementaria se permitió que se alinearan en tres ciclos y después se añadieron los oligos de los extremos 3' y 5' que amplificaron todo el fragmento con la mutación incluida. Se obtuvo el tamaño esperado para las mutantes. Después de subclonar en el plásmido pCDNA3 se seleccionaron las colonias positivas (selección por antibiótico) y se secuenciaron las clonas usando un secuenciador automático. El segundo método fue dirigido por oligonucleótidos usando el sistema de mutagénesis *in vitro* Altered Site II, Promega. Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación de DNA alrededor de los sitios mutados.

Síntesis de ARN. Los transcritos fueron sintetizados a partir del promotor T7 en un templado de ADN linearizado por el sitio de *Eco* R1 y *Pvu* I. Se usó el paquete mMMESSAGE mMACHINE, AMBION TX. Todas las muestras de ARNc fueron cuantificadas por geles desnaturalizantes de ARN usando densitometría (ChemImager model 4400, a-Innotech Corp).

-Electrofisiología

Preparación de ovocitos. Para esta preparación se utilizó la técnica previamente reportada por Tseng-Crank (1990), la cual se describe resumidamente. Los ovocitos fueron obtenidos de ranas hembras (*Xenopus laevis*) anestesiadas por inmersión en una solución de tricaina (0.15%) durante 20 min. Se hizo una pequeña incisión de 1 cm en el abdomen de la rana justo a la altura de los ovarios. Los ovocitos fueron sacados y colocados en una solución estéril (OR-2) libre de calcio ([mM]: 82.5 NaCl, 1 MgCl₂, 2 KCl, 5 HEPES-NaOH pH 7), se desfolicularon manualmente y fueron

incubados en una solución de colagenasa 1 mg/ml. Posteriormente se lavaron con OR-2 y se incubaron en ND96 (solución con calcio).

Inyección de ARN. Se obtuvieron los ARN complementarios (ARNc) de todos los canales, quimeras y mutantes utilizados. Se inyectó el ARNc al citoplasma de los ovocitos, aproximadamente 50 nl (0.1mg/ml) y se incubaron de 24 a 96 hrs dependiendo del canal a una temperatura de 18°C.

Registros electrofisiológicos. Las corrientes fueron registradas usando el sistema de fijación de voltaje con dos microelectrodos, con un amplificador Dagan CA-1B High Performance Oocyte Clamp. La resistencia de las pipetas fue de 0.3-1.0 MΩ para el electrodo de corriente y 1-2 MΩ para el electrodo de potencial cuando se llenaron con una solución 3 mM de KCl. La solución de baño contenía ((mM): 96 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 0.3 CaCl₂, 5 HEPES-NaOH pH 7.4), en la mayoría de los registros aunque se hicieron algunos experimentos con alto K⁺ (98mM) y bajo K⁺ (2mM). Durante los registros con ErgTx no se usó perfusión, pero se vigiló que la solución de baño siempre tuviera 1 ml de buffer. La ErgTx fue disuelta en BSA (0.1 mg/ml) obteniendo una solución 2 μM, se congeló en pequeñas alícuotas. Cada alícuota fue descongelada y usada para dos días de experimentos. Después de registrar la corriente control añadimos a la solución del baño (1 ml) la cantidad de ErgTx necesaria para tener la concentración deseada. La generación del protocolo de voltage clamp y la adquisición de datos fueron controlados por pClamp 5.5 (Axon Instruments). Para el análisis de los datos se usó pClamp 6 u 8, Excel (Microsoft), and PeakFit (Jandel Scientific). Los protocolos usados están descritos en los pies de figura. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA, seguido de la prueba de Dunn (SigmaStat 2.0, SPSS).

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo de tesis doctoral se encuentran contenidos en dos artículos científicos, uno publicado y otro en prensa.

1. Pardo-lópez, Jesús García-Valdés, Georgina B. Gurrola, Gail Robertson, Lourival D. Possani. Mapping the receptor site for Ergtoxin, a specific blocker of ERG channels. 2002. FEBS Lett. 10, 45-49.

Se adjunta al final de la tesis una copia del artículo como: Anexo 1

2. Liliana Pardo-Lopez, Mei Zhang, Jie Liu, Min Jiang, Lourival D. Possani and Gea-Ny Tseng. Mapping the binding site of a HERG-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule, en prensa en el Journal of Biological Chemistry.

Se adjunta al final de esta tesis como: Anexo 2.

Adicionalmente se incluyen algunos datos no publicados y todavía no enviados a publicación que fueron obtenidos con variantes naturales de la ErgToxina.

ESPECIFICIDAD

Nosotros demostramos la especificidad de la toxina ensayándola en otras familias de canales de potasio que contienen un número de aminoácidos variables en las asas S5 y S6 (ver figura 3). La figura 7 compara los efectos de la ErgTx en los canales HERG, Kv 1.4, Kv 4.3, Kv 2.1 y KvLQT1. La ErgTx inhibe la corriente de HERG a partir de 1 nM, pero no afecta a canales que tienen asas S5-S6 cortas cuando se ensaya la Ergtx 50nM.

Para demostrar la selectividad de la toxina Gurrola y cols. (1999) probaron su efecto en el canal EAG (miembro de la misma familia y 50% homólogo al HERG). Los ensayos electrofisiológicos se realizaron en corrientes intrínsecas de células de neuroblastoma humano y no se observó modificación de la corriente al adicionar (240 nM) de ErgTx. Nosotros decidimos expresar heterológicamente en ovocitos de *Xenopus* las subunidades α del canal m-EAG (*ether a-go-go* de ratón) y m-ELK (*ether a-go-go like K⁺ channel* de ratón) y ensayar la ErgTx en las corrientes iónicas obtenidas, para corroborar los resultados obtenidos a partir de tejidos nativos (Pardo-López 2002).

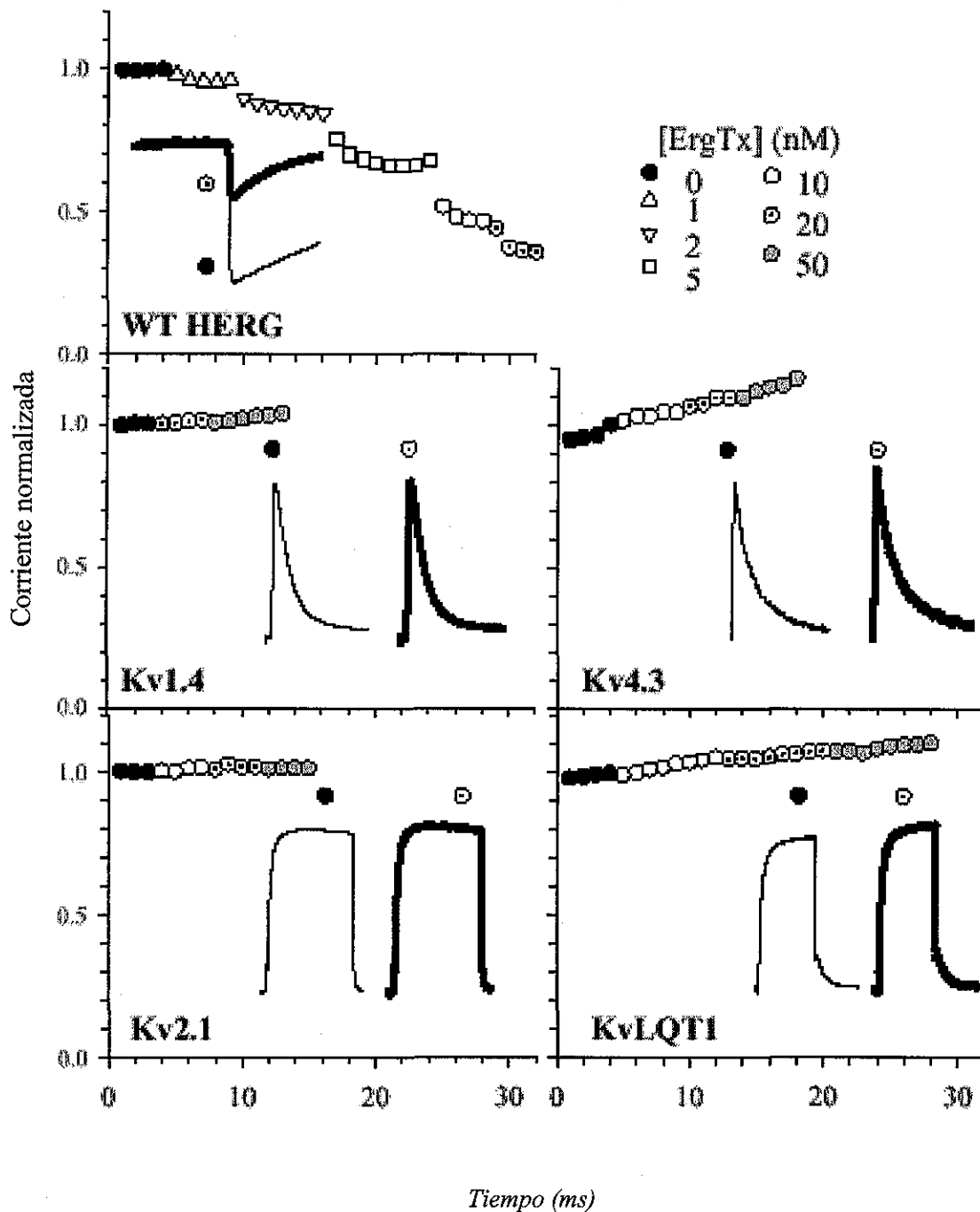


Figura 7. La ErgTx es específica para el canal HERG.

La figura muestra los cambios de la amplitud de las corrientes obtenidas de diferentes subunidades α de canales Kv a través del tiempo y en presencia de diferentes concentraciones de la ErgTx (marcados con diferentes símbolos mostrados en la parte superior derecha). Se muestran en cada panel dos trazos de corrientes registradas en ausencia (trazo delgado) y en presencia (trazo fuerte) de 20 nM de ErgTx. Las condiciones de registro fueron: HERG, 98 mM [K]_o, corriente de cola medida a -80 mV después de un pulso de 1-s a +20 mV; Kv1.4 y Kv4.3, 2 mM [K]_o, corriente al pico medida con un pulso a +60 mV; Kv2.1 y KvLQT1, 2 mM [K]_o, corriente medida al final de un pulso de 1-s a +20 mV.

La ErgTx no mostró efecto en ninguno de los dos canales aún ensayándola a altas concentraciones (200 nM) ver figura 8A y 8B. Nuestros resultados sugieren que la secuencia de aminoácidos de la región P (asa S5-P-S6) del HERG, aunque es similar en tamaño a la secuencia de los canales de la misma familia (m-EAG y m-ELK), contiene información específica que lo hace diferente y la ErgTx puede sentir esa diferencia. Estos datos nos facilitaron la tarea de diseñar una estrategia para dilucidar el sitio de unión de la toxina; nos propusimos hacer combinaciones de fragmentos de los genes que codifican para los canales m-EAG y HERG y obteniendo como resultado final proteínas quiméricas funcionales.

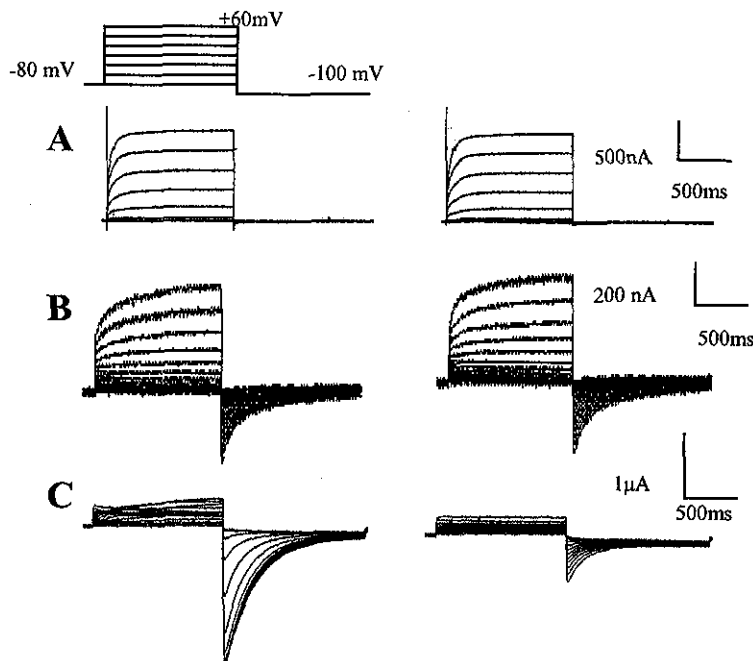


Figura 8. Efecto de la ErgTx en canales de la subfamilia EAG

A) Corrientes salientes del canal m-EAG obtenidas en ovociots de *Xenopus*, las corrientes control se muestran en el lado izquierdo y las corrientes en presencia de 200nM de ErgTx en el lado derecho. B) Corrientes del canal m-ELK, lado izquierdo corriente control y lado derecho en presencia de 200 nM de ErgTx. C) Corrientes del canal HERG sin toxina (lado izquierdo) y en presencia de ErgTx (lado derecho). Todas los experimentos fueron realizados utilizando el protocolo de pulsos que se muestra en la parte superior.

DOSIS RESPUESTA DE LA ERGTOXINA

Como primer paso en el estudio del canal HERG estandarizamos las condiciones para obtener registros de corrientes del canal silvestre usando la técnica de fijación de voltaje. Nosotros obtuvimos el ARN a partir del ADN complementario (cDNA) que codifica para el canal HERG, este ARN fue inyectado en el citoplasma de ovocitos de rana *Xenopus laevis* y los canales se expresaron en la superficie de membrana a partir de las 24 horas.

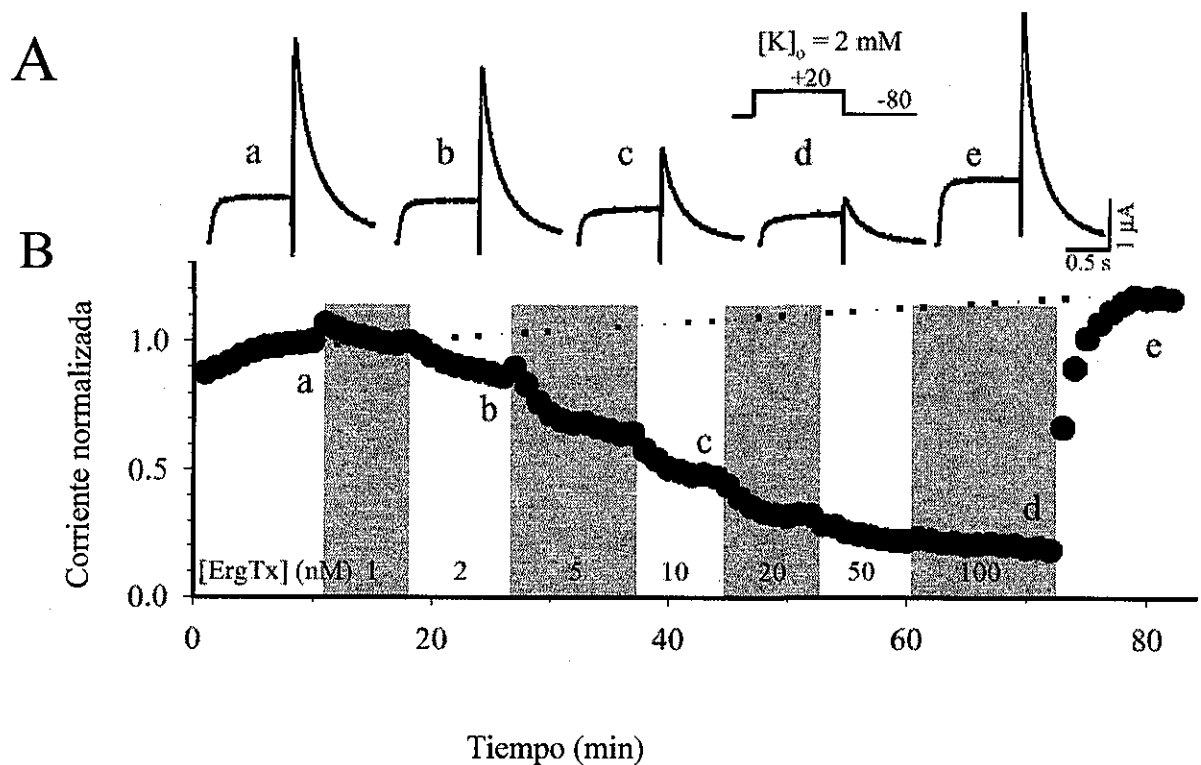


Figura 9. La inhibición de la amplitud de la corriente del canal HERG usando ErgTx es dosis dependiente y reversible al lavado.

A) Se muestran los trazos de corrientes realizados en 2 mM $[K]_o$, usando el protocolo de pulsos dibujado en la parte de arriba de la figura, aplicando uno por minuto. La letra a corresponde a la corriente control, las letras b, c y d corresponden a las concentraciones 2, 10 y 100 nM de ErgTx respectivamente, y la letra e corresponde a la corriente obtenida después de lavar la cámara de registro. B) La amplitud de la corriente al pico fue medida y normalizada por la amplitud de la corriente control justo antes de la aplicación de la ErgTx y esto se graficó vs. el tiempo de registro. Las concentraciones de toxina se indican en la parte inferior de la figura.

Usando un protocolo de pulsos depolarizantes de -80 a +20mV y repolarizando -80mV, las corrientes iónicas muestran características típicas del canal HERG ya mencionadas en la introducción: activación lenta, inactivación rápida y cierre lento (ver figura 2). Cuando se probaron diferentes concentraciones de ErgTx sobre las corrientes del canal HERG (1 nM hasta 100 nM, n=7), se observó un bloqueo dependiente de concentración (Fig. 9a-d) y este efecto fue completamente reversible cuando se lavó la toxina de la cámara de registro (figura 9e parte superior). De la curva dosis respuesta se obtuvo una Kd de 7 ± 1 nM usando la siguiente ecuación: $I_{tx}/I_c = A_{max}/(1+[ErgTx]/Kd) + (1-A_{max})$. Siendo $A_{max} = 0.93 \pm 0.03$

EFEECTO DE LA ErgTx EN DIFERENTES QUIMERAS.

Resultados preliminares basados en la carencia de modificación de la cinética de cierre del canal y de la activación en estado estacionario en corrientes de ERG en presencia de la ErgTx, muestran que la toxina no modifica el mecanismo de compuerta (apertura y cierre del canal), pero si reduce la corriente al pico lo cual sugiere que el sitio de unión de la toxina al canal se encuentra en la región del poro (Gurrola y cols. 1999). En otras palabras la ErgTx puede ser una toxina bloqueadora. Para identificar la región donde se está uniendo la toxina se construyeron tres quimeras a las que llamamos HMH, MHM, M382H (figura 10). A continuación se resumen los resultados, los experimentos se describen más ampliamente en el Anexo1.

En la primera quimera se reemplazó una región que comprende el asa S5, la región P y el asa S6 del canal HERG por la región equivalente del canal m-EAG (es preciso puntualizar que la ErgTx no tiene efecto en las corrientes del canal m-EAG) y esta quimera lleva por nombre HMH. Los experimentos realizados con la quimera HMH mostraron que quitándole la región P al canal HERG y sustituyéndola por la misma región del canal mEAG, ésta se vuelve completamente insensible al bloqueo de la toxina (ver figura 11). Esto sugiere fuertemente que la región del poro es importante para la unión de la toxina. Nosotros quisimos corroborarlo haciendo una quimera inversa, confiriéndole al canal mEAG sensibilidad al bloqueo por la ErgTx y así surgió la segunda quimera llamada MHM.

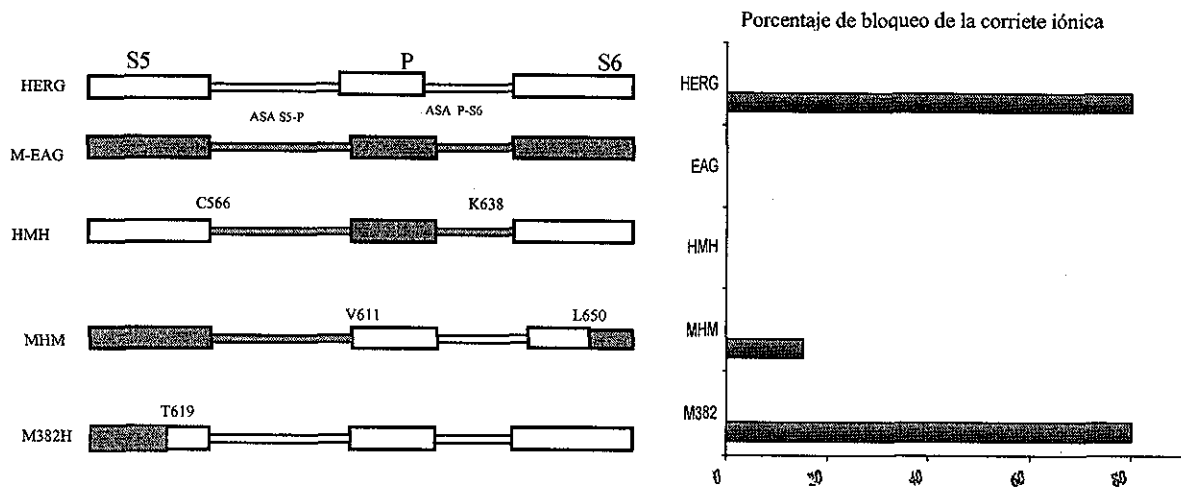


Figura 10. Efecto de la ErgTx en quimeras hechas entre el canal m-EAG y HERG. Del lado izquierdo se representa el diseño de las quimeras, los rectángulos blancos representan al canal HERG y los sombreados al canal m-EAG, los números indican la posición del aminoácido a partir de la cual se insertó y se terminó un fragmento de canal. Del lado derecho se grafica el porcentaje de bloqueo que causa 100 nM de Ergtx en cada una de las corrientes iónicas obtenidas de las quimeras n=3.

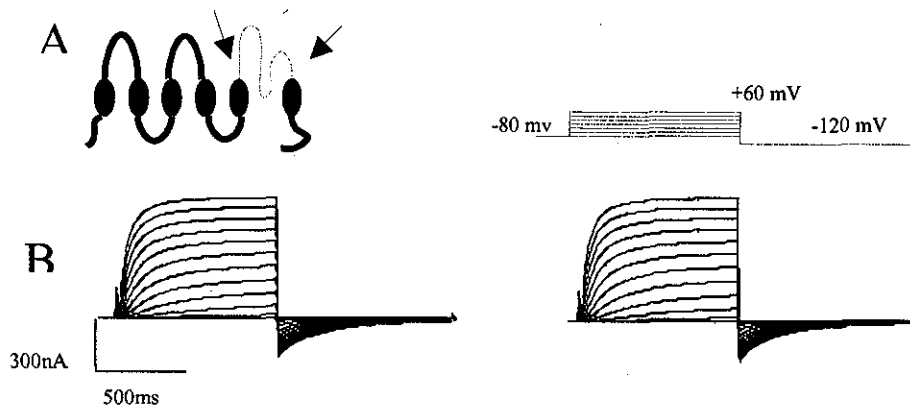


Figura 11. Efecto de la ErgTx en la quimera HMH
 A) Representación esquemática de la quimera HMH donde la región señalada con flechas corresponde a la región P del canal m-EAG y el resto corresponde al canal HERG. B) Corrientes salientes obtenidas al expresar el ARN de la quimera HMH en ovocitos de *Xenopus*, del lado izquierdo se muestran las corrientes control y del lado derecho las corrientes en presencia de 200 nM de ErgTx. Las corrientes fueron obtenidas usando el protocolo de pulsos de la parte superior derecha.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La MHM se construyó insertando la región del poro y parte del dominio S6 del canal HERG (excepto el asa S5) al canal m-EAG (figura 12B). Cuando se añadió 100nM de ErgTx a las corrientes obtenidas a través de MHM se observó sólo un 15% de bloqueo (figura 12A). Esto indica que la región del poro y la mitad del dominio S6 son insuficientes para conferir sensibilidad a la ErgTx y sugería que para que la toxina interaccione con el canal se necesitan los 43 aminoácidos que están en el asa S5-P y que no se encuentran en la quimera MHM. El siguiente paso fue probar una quimera que tuviera todo el poro de HERG incluida el asa S5-P.

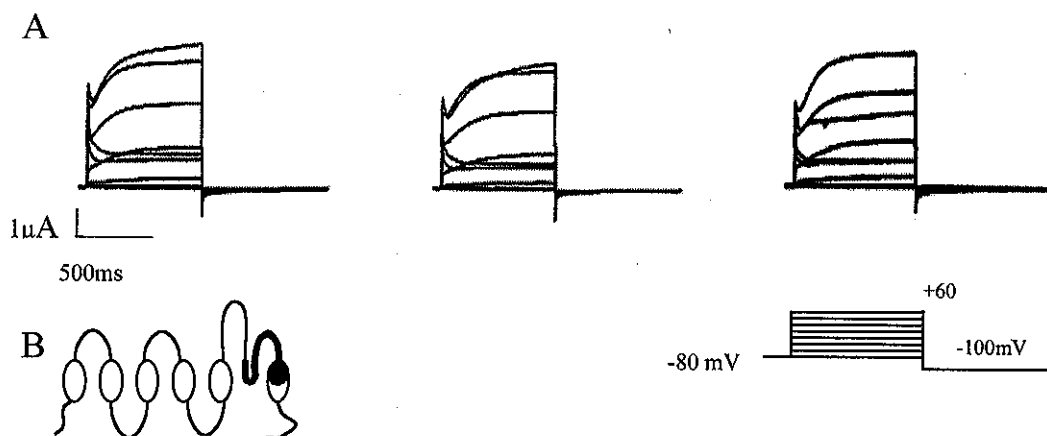


Figura 12. Efecto de la ErgTx en la quimera MHM

A) Corrientes salientes obtenidas de la expresión de la quimera MHM en ovocitos de Xenopus. El panel de la izquierda representa a las corrientes en ausencia de ErgTx, el panel central son las corrientes en presencia de 100nM de ErgTx y el panel de la izquierda son las corrientes después de lavar la cámara de registro. B) Esquema de la quimera MHM donde la parte oscura representa al canal HERG y la clara al canal m-EAG. El protocolo de pulsos se muestra en la parte inferior derecha.

La tercer quimera está formada por el canal m-EAG hasta la mitad del dominio transmembranal S5 y el resto (mitad del dominio S5, poro y dominio S6) pertenece al canal HERG y se le llamó M382H (figura 13B). Cuando se añadió 100nM de Ergtx a la solución externa de registro, se observó una reducción del 70 al 80% de la corriente entrante muy similar al bloqueo obtenido en el canal silvestre (figura 13A). Con este resultado se comprueba que la región entre el poro y el dominio S5 es crítica para la unión de la toxina y descarta que los residuos del asa S3-S4 estén participando en la unión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

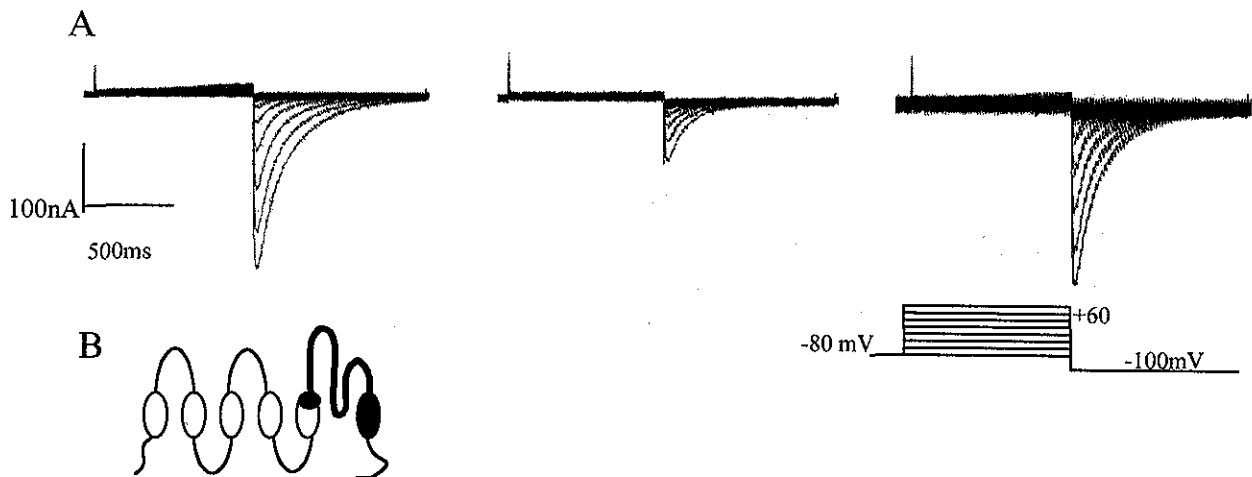


Figura 13. Efecto de la ErgTx en la quimera M382H.

A) Corrientes entrantes de la quimera M382H expresadas en ovocitos de *Xenopus* utilizando el protocolo de pulsos inserto en el lado inferior derecho. Las corrientes fueron obtenidas en ausencia (panel izquierdo), presencia de ErgTx 100nM (panel central) y en condiciones de lavado (panel derecho). B) Representación esquemática de la quimera M382H donde la región oscura representa al canal HERG y la región clara al canal m-EAG.

LOCALIZACION DEL SITIO DE INTERACCION DE LA ErgTx MEDIANTE EL USO DE MUTAGENESIS DE CISTEINAS

Con el fin de encontrar que residuos del asa S5-P están involucrados en la unión de la toxina, nos dimos a la tarea de probar 51 mutantes sitio específicas proporcionadas por la Dra. Tseng. Estas mutantes abarcan tanto la región S5-P como la P-S6. El asa P-S6 se probó porque se ha reportado que en otros canales esta región contiene residuos importantes para la unión de las toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de potasio (ChTx, AgTx, NxTx etc), y además porque las corrientes a través de la quimera MHM (canal m-EAG con el asa S6 del canal HERG pero no el asa S5) fueron inhibidas un 15%, esto nos habla de que existen residuos en esta asa que pueden estar participando en la unión a la toxina. La razón para usar sustituciones de cisteínas es porque la cadena lateral es pequeña e hidrofóbica y usualmente bien tolerada, y nos sirve para experimentos futuros ya que se puede modificar la cadena lateral mediante agentes MTS ([2-(trimetilamonio)etil]metanotiosulfonato y (2-sulfonatoetil)metanotiosulfonato) dándonos así la oportunidad de estimar la distancia por una análisis electrostático. Esto es, el tiol libre de la cisteína puede ser

derivatizado con grupos químicos cargados positiva o negativamente.

La figura 14 resume los resultados de los experimentos de mutagénesis de cisteínas; en todos los casos excepto en el silvestre, los ovocitos fueron tratados con Dithiothreitol (DTT) (5mM, 15min a 4 hr) para interrumpir o prevenir la formación de puentes disulfuro entre cisteínas introducidas o nativas. Esta concentración de DTT adicionada fue probada en experimentos controles (canal silvestre) y se comprobó que no afectaba su comportamiento. Los canales fueron activados por pulsos depolarizantes de 1 segundo a +20 mV, un voltaje donde la activación alcanza una fase estacionaria. En la mayoría de los casos la amplitud de la corriente fue tomada de la corriente al pico a -80mV, pero para algunas mutantes la corriente al pico a -80mV es demasiado pequeña aún usando 98 mM de potasio externo [K]_o. En estos casos se midió la corriente al pico a -120mV. Se hicieron de tres a siete repeticiones para cada una de las mutantes. Antes de la aplicación de la toxina las corrientes fueron registradas bajo condiciones control de 4 - 9 minutos para establecer una línea de base estable (I_c). La toxina fue entonces añadida y mezclada por pipeteo repetitivo. Los efectos de la toxina fueron registrados después de 6 - 10 min. La fracción de corriente remanente en presencia de 10 nM ErgTx (I_{tx}/I_c) fue usada para estimar la constante de disociación (K_d) basada en la siguiente ecuación $I_{tx}/I_c = 0.9/(1+[tx]/K_d) + 0.1$, asumiendo que la toxina bloquea como máximo un 90% de la corriente.

El cambio de energía libre de la unión de la toxina inducido por la mutación fue calculado usando la ecuación: $\Delta\Delta G = RT\ln(K_{d_{mut}}/K_{d_{wt}})$.

Donde $K_{d_{mut}}$ y $K_{d_{wt}}$ son los valores de K_d de HERG mutado y silvestre respectivamente ($K_{d_{wt}} = 7 \pm 1$ nM, $n=7$).

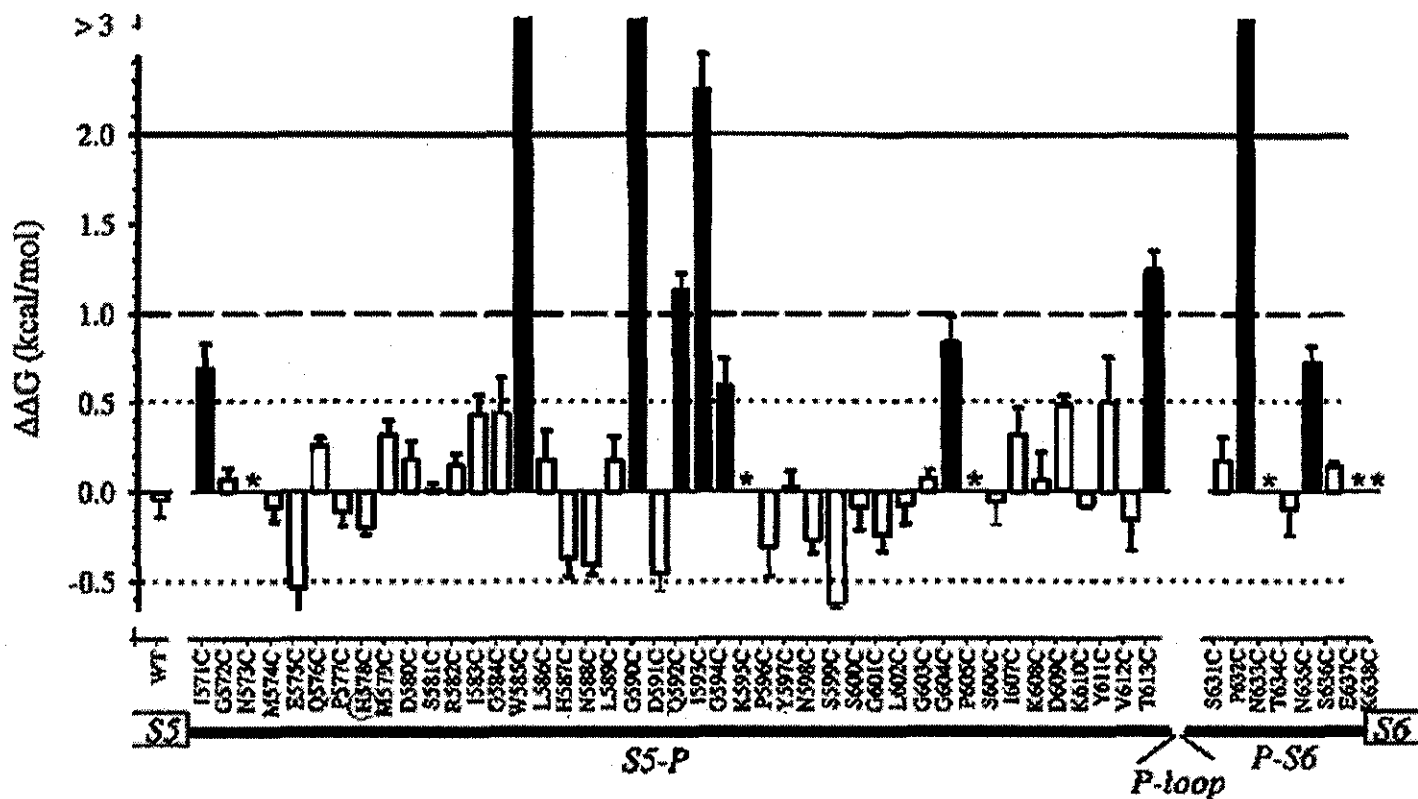


Fig. 14. Efecto del bloqueo de la ErgTx en las sustituciones por cisteínas de las asas S5 y S6 del canal HERG.

Los registros fueron hechos en 98 mM [K]_o. Los canales fueron activados por pulsos depolarizantes de 1s a 20 mV aplicados cada minuto, para monitorear el efecto de la ErgTx (10 nM) se usó la amplitud al pico de la corriente de cola medida al repolarizar a -80 mV. Se graficaron los valores del cambio de la energía libre de unión ($\Delta\Delta G$) (promedio y SE, n = 3 - 7) contra las mutaciones. Las mutantes marcadas con asteriscos (*) son las mutantes cuyos niveles de expresión fueron demasiado bajos para medir el efecto de la ErgTx (N573C, K595C, P605C, N633C, E637C y K638C). Las barras blancas representan valores muy similares al del canal silvestre. Las barras negras representan valores diferentes del canal silvestre. W585C, G590C, I593C y P632C no fueron afectados por 100 nM ErgTx (estimando una $\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se probaron 51 mutantes, 6 de las cuales no producen canales funcionales (N573C, K595C, P605C, N633C, E637C, K638C). De las 45 posiciones restantes, 30 sustituciones no alteran significativamente la unión de la toxina, es decir la toxina presenta un bloqueo similar al reportado para el canal silvestre. En contraste, 8 posiciones disminuyen o aumentan discretamente el bloqueo de la toxina (energía libre de unión, $\Delta\Delta G$, 0.5 a 1 kcal/mol), y 4 de ellas reducen drásticamente la unión de ErgTx ($\Delta\Delta G$ incrementa a más de 2 kcal/mol). Tres de ellas W585, G590 y I593 están en el centro del asa S5-P de la secuencia de HERG la otra posición es la P632 la cual está en el asa P-S6 muy cerca de la entrada del poro (Fig. 14, barras negras).

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE POTASIO EXTERNO

Algunas toxinas bloqueadoras de canales de potasio muestran un efecto dependiente de la concentración de potasio extracelular ($AgTx$), y se ha sugerido que esto se debe a la lisina 27 la cual tapa el poro del canal uniéndose a un sitio cercano al sitio de unión del ión potasio. El aumento del potasio externo aumenta la ocupación del potasio dentro del poro, y esto da como resultado una repulsión electrostática entre los iones K^+ y la lisina 27 desestabilizando así su unión al canal (Ranganathan y cols 1996).

Para hacer un análisis comparativo entre la ErgTx y otras toxinas, nosotros estudiamos si la concentración de potasio era importante para el bloqueo de la ErgTx. Obtuvimos los registros de las corrientes de HERG en dos diferentes concentraciones de potasio externo (2 mM y 98 mM), posteriormente añadimos 10 nM de ErgTx homogenizandola perfectamente en la cámara de registro y volvimos a registrar corrientes iónicas. Nuestros resultados nos muestran que el efecto de la toxina es independiente de la concentración de potasio externo (figura 15). Esta carencia de sensibilidad a cambios en el potasio externo nos facilitó el registro del efecto de la ErgTx en algunas mutantes de HERG que muestran poca expresión, ya que el aumento de potasio externo puede aumentar la amplitud de la corriente y se puede cuantificar el efecto de la toxina. La insensibilidad del bloqueo al potasio externo sugiere que el mecanismo de acción de la ErgTx en el canal HERG es diferente al mecanismo de otras toxinas bloqueadoras de canales de potasio.

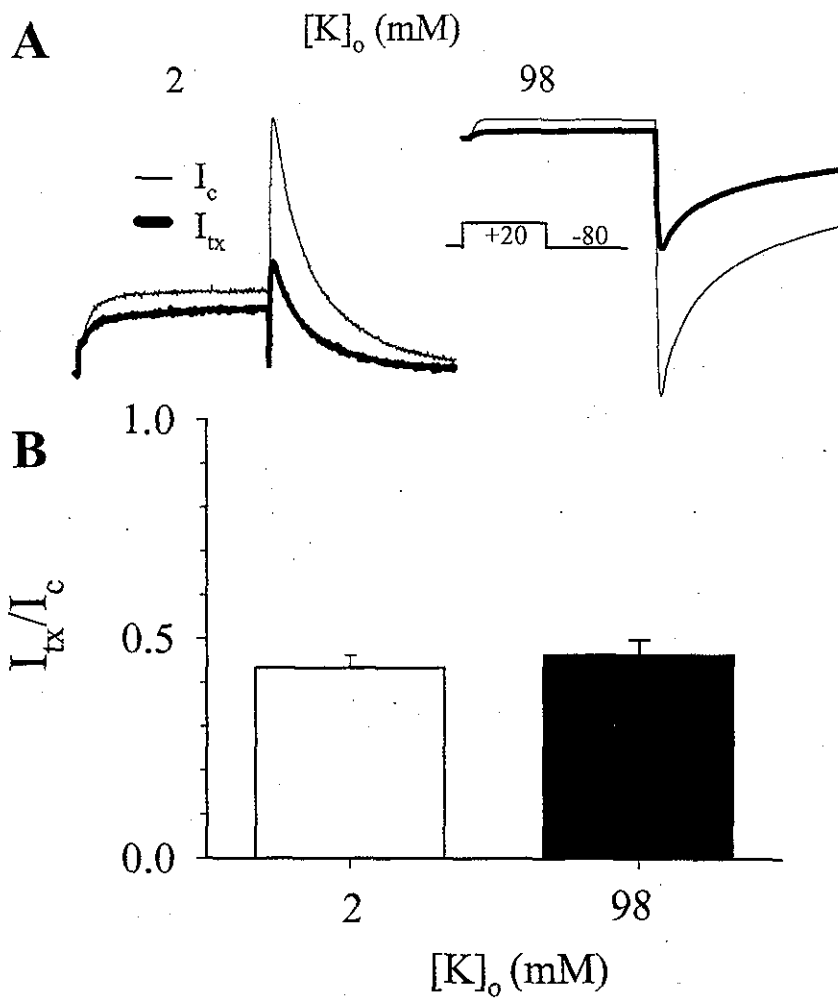


Figura 15. Efecto del potasio externo en el bloqueo de la ErgTx. A, Corrientes iónicas obtenidas de ovocitos de *Xenopus* en 2 mM y 98 mM de potasio externo. Los trazos delgados representan las condiciones control y los trazos gruesos en presencia de 10nM de toxina. El protocolo de pulsos se indica en la figura. B, Se grafica la corriente remanente después de haber adicionado 10 nM de ErgTx a diferentes concentraciones de potasio externo en donde se observa que no hay diferencias significativas.

EFFECTO DE LAS FUERZAS ELECTROSTÁTICAS EN EL BLOQUEO DE ErgTx.

Para explorar el efecto de las fuerzas electrostáticas en la unión Ergtx-HERG decidimos probar si el cambio de pH externo (pHo) altera la carga neta de la toxina y si esto afecta la unión al canal. Cabe notar que el punto isoeléctrico calculado para la ErgTx es 7.8. El incremento de pH de 7.5 a 8.5 hace que la toxina tenga menor efecto en la disminución de la corriente del canal silvestre (figura 16 círculos negros), esto sugiere que una toxina cargada negativamente se une menos efectivamente que una toxina sin carga, sin embargo la disminución del pH a 6.5 no hace más potente la reducción de la corriente de estos canales. Es conveniente mencionar que existen dos histidinas en el asa S5-P y la protonación de alguna de ellas o de ambas podría estar reduciendo la unión de la toxina cargada positivamente a pHo 6.5 (señalados en la parte superior de la figura 16). Para comprobar esto propusimos ensayar el bloqueo de ErgTx sobre las corrientes obtenidas en las mutantes de histidina a diferentes pHo. Si las histidinas estaban participando esperábamos un mayor bloqueo de la corriente a pH 6.5 pero no a pHo 7.5 o 8.5. Los resultados que obtuvimos apuntaron en esta dirección, cuando se ensayó la mutante H578C a pHo 6.5 el bloqueo de la corriente se aumentó de un 60 a un 85% (triángulos) no así cuando se probó en pHo 7.5 y 8.5 en el primero se observó un comportamiento similar al canal silvestre (40% de corriente remanente) y en el segundo hubo una pequeña disminución del bloqueo (55% de corriente remanente). Con la mutante H587C se obtuvieron resultados similares, pero menos pronunciados (cuadrados vacíos). Para corroborar que la histidina 578 se está protonando a pHo 6.5, se ensayó una mutante donde ahora tuviera un residuo cargado positivamente H578K. La mutante H578K reduce la unión de la ErgTx a pHo 6.5, 7.5 y 8.5 sin distinción (triángulos invertidos).

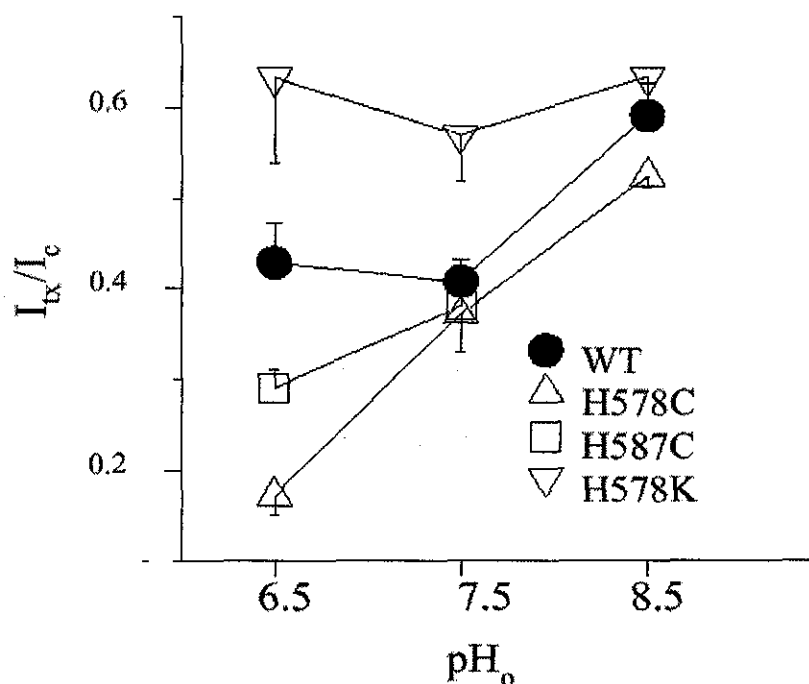


Fig. 16 Efecto del cambio de pH_o en el bloqueo de ErgTx usando canales HERG WT y mutantes en el sistema de ovocitos de *Xenopus*.

La parte de arriba muestra la secuencia de aminoácidos de la región del vestíbulo del poro donde se señalan las histidinas del asa S5 (H578 y H587). WT y H578C fueron registrados en 2 mM [K]_o y los otros en 98 mM [K]_o. Se grafican las fracciones de corriente remanente durante el bloqueo por 10 nM ErgTx (I_{tx}/I_c) a diferentes niveles de pH_o ($n = 3-6$ cada uno). Los símbolos de cada mutante están indicados a la derecha de la gráfica. En la mayoría de los casos cada ovocito fue utilizado para probar 2 o 3 condiciones de pH escogidas al azar. La concentración de la toxina ensayada fue de 10 nM.

DEPENDENCIA DE VOLTAJE EN EL BLOQUEO DE LA ErgTx

La unión de la ChTx al canal *Shaker* es sensible a los cambios de voltaje, se sabe que la depolarización desestabiliza la interacción toxina-canal. Se sugiere que la sensibilidad al voltaje esta mediada exclusivamente por la lisina 27 de la ChTx (Goldstein y Miller 1993). Aunque la ErgTx no tiene un equivalente de este residuo, se ha reportado en un trabajo previo que la depolarización también reduce la unión de la ErgTx al canal HERG probablemente causado por la inactivación tipo C a voltajes depolarizantes (Gurrola y cols 1999). Nosotros exploramos el mecanismo de la dependencia de voltaje mediante pulsos depolarizantes de -40 a +60 mV y repolarizando a -80 mV. En la figura 17 se compara la dependencia de voltaje en la activación del canal HERG. Podemos observar que el efecto de la reducción de bloqueo de la corriente por la toxina (incremento de I_{Tx}/I_c) es más marcado en el rango de voltaje negativo (-40 a 0 mV, donde también la activación del canal se incrementa más agudamente con la depolarización de la membrana) que a voltajes más positivos (arriba de 0 mV, donde está la fase estacionaria de la activación del canal). Esto junto con la observación de que la ErgTx se une al canal a -80mV cuando el canal se encuentra en un estado cerrado, sugiere que la activación del canal HERG desestabiliza la unión de la toxina. Esta disminución de bloqueo de la toxina no está relacionada con la inactivación tipo C ya que una mutante que pierde esta propiedad y que sigue manteniendo una alta sensibilidad por la ErgTx (G572C) se comporta exactamente igual que el canal silvestre, es decir a voltajes depolarizantes la unión de la toxina se desestabiliza (ver figura 17B señalada como G572C).

Otra posible explicación para la dependencia de voltaje de la unión de la ErgTx es si la toxina se une a un campo eléctrico transmembranal entonces una fuerte depolarización de la membrana puede esconder la unión de una toxina cargada positivamente. Sin embargo, esta posibilidad no es consistente con los datos mostrados donde la depolarización de la membrana reduce más la potencia de la ErgTx a pH 8.5 (toxina cargada negativamente) que a pH 6.5 (toxina cargada positivamente, ver registros de la parte superior de la figura 17).

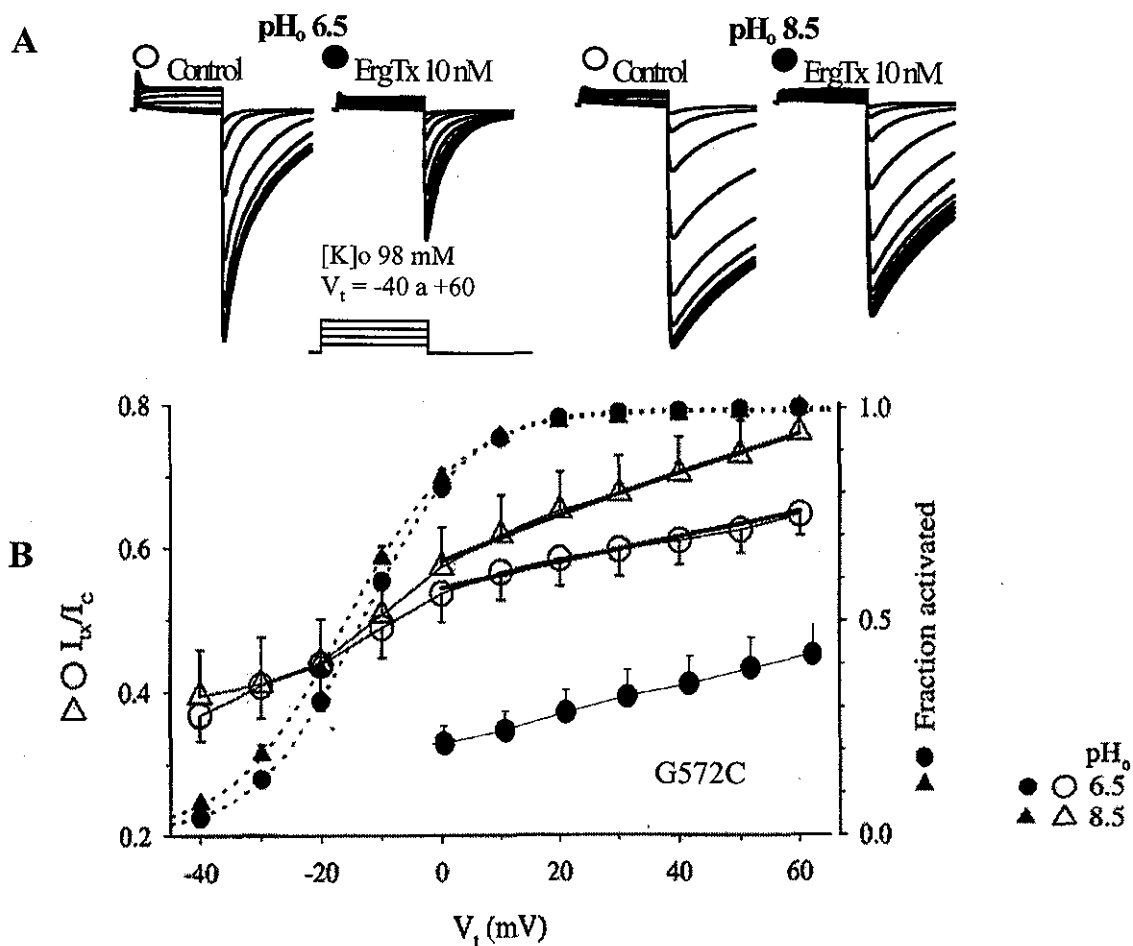


Figura 17. Dependencia del voltaje en el bloqueo del canal HERG por la ErgTx a pH 6.5 y 8.5.

Registros representativos de la corriente (98 mM [K]_o). La amplitud de las corrientes de cola fueron usadas para graficar la curva de activación y calcular la fracción de corriente remanente en presencia de 10 nM ErgTx (I_{tx}/I_c). B) Comparación de la dependencia de voltaje de la activación de HERG y el bloqueo de la ErgTx. La relación entre el pulso de voltaje (V_t) y la amplitud de la corriente de cola (normalizada por la amplitud de la corriente de cola después de V_t a +60 mV) bajo condiciones control fue ajustada a una función de Boltzmann para estimar el voltaje al que se alcanza el 50% de la activación ($V_{0.5}$) y la pendiente (k): corriente de cola normalizada = $1/(1+\exp((V_{0.5}-V_t)/k))$. Los datos de los símbolos llenos corresponden a la ordenada de la derecha. Las curvas sobrepuestas fueron calculadas usando la ecuación de arriba y los siguientes valores de pH 6.5, $V_{0.5} = -13.3 + 0.8$ mV, $k = 8.8 + 0.2$ mV ($n = 4$); pH 8.5, $V_{0.5} = -16.0 + 1.1$ mV, $k = 9.5 + 0.4$ mV ($n = 5$). Los datos de I_{tx}/I_c se muestran como símbolos abiertos en la ordenada de la izquierda. Las líneas sobrepuestas fueron calculadas basadas en la ecuación modificada $I_{tx}/I_c = 0.9/(1+[ErgTx]/Kd(V))+0.1$ y la ecuación $Kd(V) = Kd(0)\exp(z\delta VF/RT)$, donde $z\delta$ denota la valencia efectiva del dominio sensible a voltaje que afecta la unión de la ErgTx. Para pH 6.5, $Kd(0) = 9.7$ nM y $z\delta = 0.2$; para pH 8.5, $Kd(0) = 11.5$ nM y $z\delta = 0.36$.

EFEECTO DEL TEA EN EL CANAL HERG

El Tetraetilamonio (TEA) es un bloqueador clásico de los canales de potasio. En el canal *Shaker* se ha identificado que la posición T449 localizada en la parte externa del poro es importante para la unión a este bloqueador. Este residuo se identificó reemplazando la treonina por un residuo aromático (T449Y o T449F), lo cual favorece la unión del TEA debido a una interacción estable entre las cargas positivas del TEA y los electrones π de los anillos aromáticos del residuo 449. Por otro lado, si se reemplaza la treonina por un aminoácido cargado positivamente (T449K) el efecto es opuesto debido a una repulsión de cargas (Mackinnon y Yellen 1990).

En el canal HERG el aminoácido equivalente a la T449 es la S631, nosotros probamos si el efecto de mutaciones similares en este residuo tienen el mismo comportamiento que en la interacción del TEA con el canal *Shaker*. El TEA bloquea la boca externa del poro del canal HERG con una $IC_{50} \sim 50$ mM, esto se ve reflejado por una disminución de la corriente saliente de cola a -80mV (figura 18a). El cambio de la serina por un residuo aromático (S631Y) no favorece la unión del TEA (panel b) lo cual representa una diferencia cuando se compara con el canal *Shaker*. Por otro lado el cambio de la serina 631 por un aminoácido cargado positivamente (S631K, panel d) o negativamente (S631E panel c), reduce la sensibilidad a TEA indistintamente entre estas dos mutantes. Nuestros datos sugieren que la conformación de la boca externa del poro puede ser diferente a la del canal *Shaker* y que la cadena lateral de la S631 puede no estar accesible a la unión del TEA. Un resultado que apoya esta idea es el obtenido cuando se ensaya la ErgTx en el canal HERG mutado en el residuo 631 (S631V, S631C). Nosotros observamos que la toxina no pierde sensibilidad por el canal, aún cuando esta mutación cambia el comportamiento del canal (datos no mostrados). Esto sugiere que la cadena lateral no esta expuesta a la unión de la toxina.

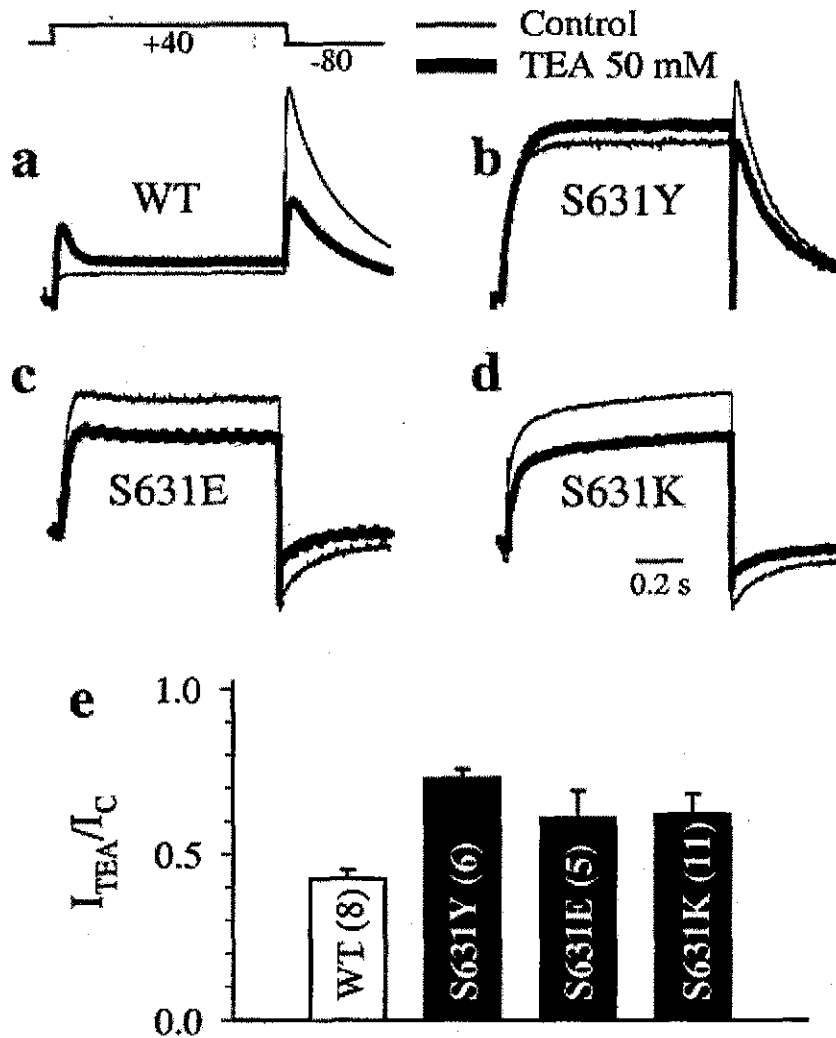


Figura 18. Efecto del TEA en diferentes mutantes del canal HERG.

A, corrientes control (delgado) y en presencia de 50 mM de TEA (grueso) del canal silvestre.

b, c y d, corrientes de las mutantes: S631Y, S631E y S631K respectivamente, antes y después

de adicionar 50 mM de TEA. e, resumen del efecto del TEA en las corrientes del canal HERG silvestre y mutado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TOXINAS TIPO ERG

En nuestro laboratorio se han aislado otras toxinas del veneno de diferentes alacranes que son homólogas a la Ergtx, conformando de este modo una familia nueva de toxinas que no comparten características con las familias previamente descritas. Para ampliar nuestro conocimiento de la interacción de las Ergtoxinas con el canal HERG, se ensayaron tres toxinas adicionales: ErgTx-2, ErgTx-3 y CII 8.5 (componente 8.5 del veneno de *C. limpidus limpidus*).

La primera de ellas (ErgTx-2) fue aislada del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, es una toxina de 43 aminoácidos, nueve de los cuales son diferentes de la Ergtx. Nosotros probamos esta toxina en corrientes entrantes a través del canal HERG producidas por pulsos depolarizantes de -80 mV a 60 mV seguidos por un pulso repolarizante a -100mV, con un potencial de mantenimiento de -80 mV. El efecto de la toxina fue determinado por la reducción de la corriente al pico. El efecto de la ErgTx-2 es dosis dependiente y este bloqueo es completamente reversible después de lavar la cámara de registro. La IC₅₀ que se obtuvo después de hacer una curva dosis respuesta fue de 1.2 μM, es decir ~2 ordenes de magnitud menos potente que la Ergtx (n=4, figura 19 B).

La segunda toxina (ErgTx-3) también fue aislada del veneno del alacrán *Centruroides noxius* y en un principio se pensó que era una toxina nueva, pero mediante el análisis por secuenciación y espectrometría de masas se observó que era la misma ErgTx sólo que la ErgTx-3 tenía la metionina 35 oxidada, lo cual hacía que la toxina perdiera afinidad por el canal como se observa en la figura 19A.

La tercera toxina CII 8.5 fue obtenida a partir del veneno del alacrán *Centruroides limpidus* y cuenta con 42 aminoácidos de los cuales 40 son idénticos a la Ergtx. En una curva dosis respuesta obtuvimos una IC₅₀ de 9.2 nM (Fig. 19 panel inferior), muy similar a la encontrada en la ErgTx (7 nM). Considerando la importancia de la toxina CII 8.5 en el laboratorio se sintetizó químicamente esta toxina y la IC₅₀ que obtuvimos fue muy similar a la obtenida en la toxina nativa.

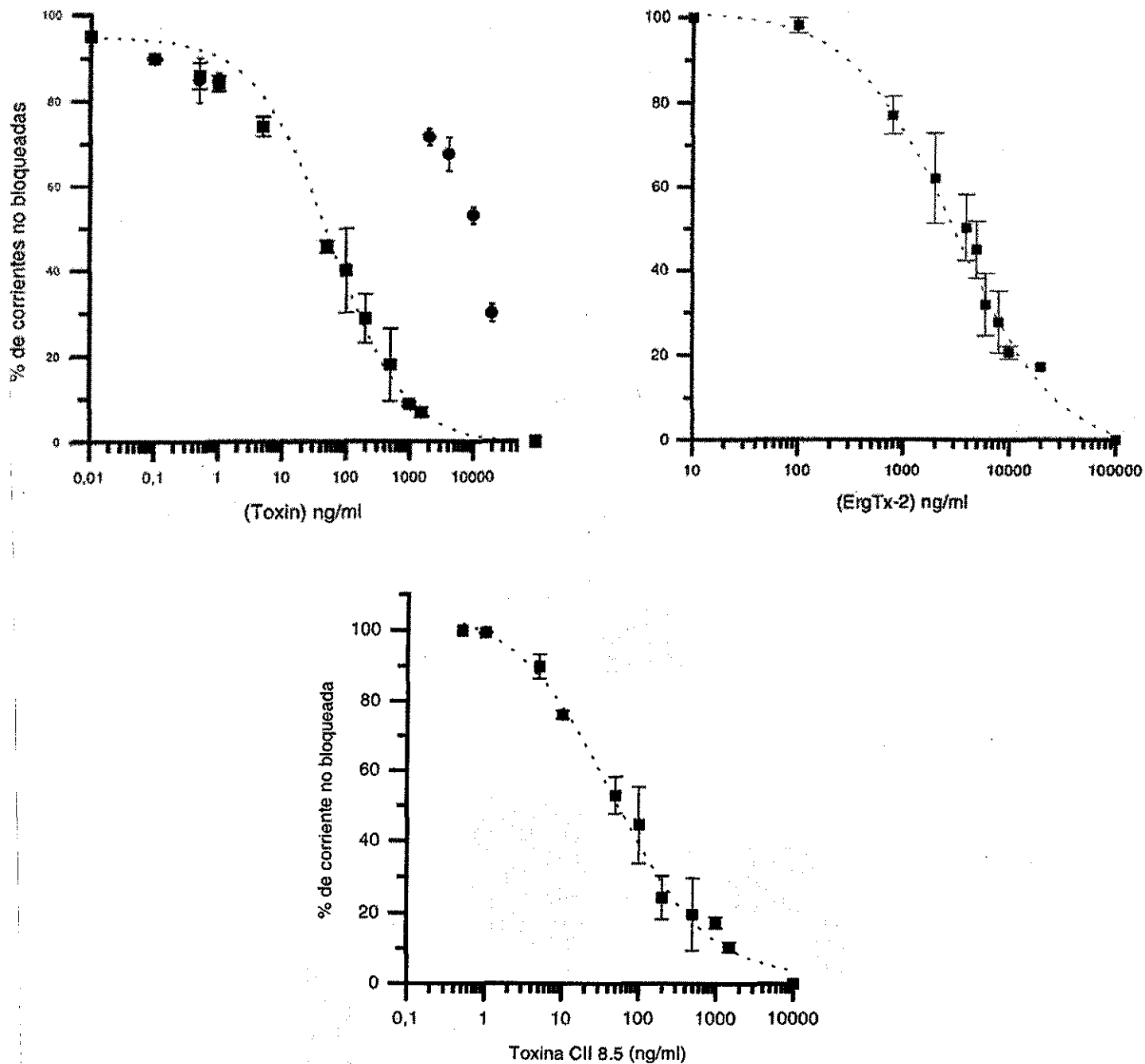


Fig 19 Curva dosis-respuesta de varias Ergtoxinas.

ErgTx-1 y ErgTx-3 (panel A), ErgTx-2 (panel B) y toxina Cll8.5 nativa y sintética (panel C). Todos las concentraciones de toxina probadas se hicieron por cuatuplicado y se ensayaron en corrientes entrantes a través del canal HERG. Se grafica el porcentaje de la corriente no bloqueada como una función de la concentración de las toxinas. Para la ErgTx-2 se obtuvo una K_d de $1.2 \mu M$ y para Cll 8.5 una K_d de $9.2 nM$ muy similar a la obtenida para la ErgTx $K_d = 7 nM$.

DISCUSIÓN

Para conocer el sitio de unión de la toxina en el canal, nosotros construimos canales quiméricos hechos de la combinación de dos canales que pertenecen a la subfamilia EAG: el canal HERG y el canal m-EAG. La ventaja de trabajar con estos dos canales radica en el hecho de que la Ergtoxina es altamente selectiva y solo inhibe la corriente del canal HERG. Otra ventaja importante es que estos dos canales tienen ~50% de similitud entre ellos y esto augura un mayor éxito en la obtención de quimeras funcionales.

Los resultados obtenidos de las quimeras comprobaron que la región entre el poro y el dominio S5 es crítica para la unión de la toxina, ya que cuando se elimina esta región del canal HERG y se cambia por la del canal m-EAG, la toxina disminuía considerablemente su afinidad por la quimera. Por este motivo se decidió hacer mutagénesis sitio específica del canal para encontrar los residuos que participan en la unión.

Como un paso previo a la mutagenesis se realizó una curva dosis-respuesta de la toxina ensayada en corrientes heterólogas de canales HERG expresados en ovocitos de *Xenopus*, esto con el fin de saber el valor de la constante de disociación para futuros análisis con las mutantes sitio específicas. La curva dosis respuesta mostró una K_d de 7.4 nM muy similar a la obtenida con las corrientes Erg-like de células nativas: 16 nM (Gurrola y cols. 1999).

Estos resultados confirman que las corrientes nativas previamente registradas (Gurrola y cols. 1999) están compuestas principalmente por la subunidad α del canal HERG, y sugieren que la interacción con la toxina es principalmente con esta subunidad, y tal vez no este interaccionando ninguna subunidad accesorias β , aunque para descartar esta posibilidad se tendría que expresar heterológamente la subunidad α del HERG y una subunidad accesorias (Mirp) que se sabe interacciona con el canal acelerando la cinética del cierre (Abbott y cols. 1999). Asimismo estos resultados

validan el uso de este sistema de expresión heteróloga para el estudio de estructura-función del canal HERG.

Es importante mencionar que existe una corriente residual (aproximadamente 10%) que es insensible al bloqueo por la toxina aún en concentraciones altas. El trazo de la corriente es muy similar tanto en corrientes control como en presencia de 100nM de ErgTx (mostrando la inactivación tipo C) (ver figura 8), lo cual nos sugiere que esta corriente remanente no es debido a la conductancia de fuga. Esta corriente remanente podría deberse a dos cosas: 1) que las concentraciones que hemos probado hasta el momento (micromolares) han sido insuficientes para bloquear el 100% de la corriente o 2) que la corriente remanente puede existir debido a que la ErgTx no está ocluyéndolo completamente el poro del canal. Para comprobar esto tendríamos que resolver la mayor limitante que tenemos que es la cantidad de proteína. Los experimentos que se han realizado en este trabajo han sido con la ErgTx purificada directamente del veneno del alacrán *Centruroides noxius* la cual tiene un rendimiento de 0.1% del veneno total. El problema ya ha sido abordado en nuestro laboratorio mediante la síntesis química de la ErgTx, esperamos que en un plazo corto de tiempo podamos obtener grandes cantidades de ErgTx correctamente plegada y así saber si la ErgTx puede bloquear completamente al canal HERG.

Además de la importancia del asa S5-P en la unión de la ErgTx también sabemos que esta asa es importante para la función del canal HERG, un ejemplo es la mutación del residuo H587 de HERG que puede tener efectos en la función del canal, interrumpiendo la inactivación C y modificando la selectividad a K^+ , y además incrementa levemente la activación del canal a voltajes positivos. El comportamiento de H587C depende de si las cadenas laterales están en estado reducido como el canal silvestre o en estado oxidado formando puentes disulfuro y con un comportamiento mutante, por lo tanto creemos que es importante comprobar si el mecanismo por el cual la sustitución de cisteína afecta la unión a la toxina es debido a un cambio local de puntos de contacto específicos entre la toxina y el canal o si es debido a un efecto alostérico de una alteración global en la estructura del canal.

Existen mutantes como la G590C, I571C, W585C, I593C, G604C, Y611C y P632 del canal HERG que pierden su inactivación tipo C y modifica su selectividad a K^+ (comunicación personal con la Dra. Tseng) y también pierden la sensibilidad por la toxina (ver fig 20B ejemplificado con la mutante G590C). Se podría pensar que el comportamiento mutante hace que se pierda la sensibilidad por la toxina, pero tenemos mutantes como: D591C, G572C, L586C y L589C que no manifiestan inactivación tipo C y el potencial de inversión a K^+ que en 2mM de potasio externo es de -30mV, indicando una apreciable permeabilidad de Na^+ a través del poro (figura 20C ejemplificado con la mutante D591C).

En estas mutantes la toxina bloquea la corriente como si fuera corriente silvestre, esto nos comprueba que el comportamiento mutante “per se” no es suficiente para perder la sensibilidad por la toxina. Por otro lado tampoco un comportamiento de canal silvestre nos asegura un bloqueo de la corriente por la toxina y esto se demuestra con las mutantes Q592C, I583C, G594C, D609C, T613C y N635C, las cuales presentan una inactivación tipo C y una selectividad de K^+ por Na^+ , sin embargo la sensibilidad por la toxina es marcadamente disminuida (ejemplificado con la mutante Q592C figura 20D).

Como se mencionó en la sección de resultados, las mutantes N573C, K595C, P605C, N633C, E637C, K638C no expresaron corrientes iónicas, tal vez debido a defectos en el proceso de biosíntesis, lo que ocasionaría que la proteína se quedara retenida en el retículo endoplásmico (Ficker y cols 2000a y 2000b). Ahora sabemos que la mutante N633A se ha encontrado en personas con el el síndrome QT2 largo congénito, y éste es debido a que no se obtienen canales HERG funcionales cuando una de las subunidades mutadas forma tetrámeros con las subunidades silvestres, esto podría explicar porque no obtuvimos corrientes iónicas de la mutante N633C (Splawski y cols. 2000, Zhou y cols. 1999).

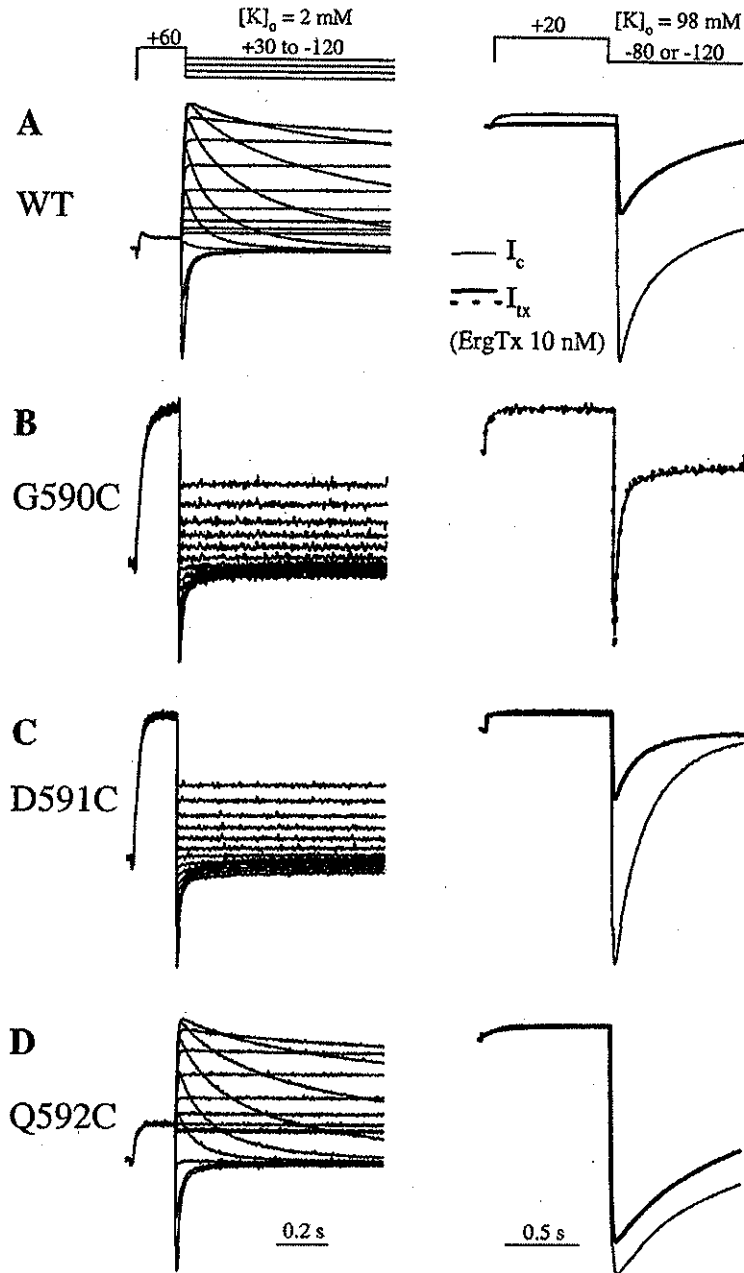


Figura 20. Carencia de correlación entre los cambios inducidos en la función del canal HERG y la potencia de la ErgTx.

Las mutantes están señaladas a la izquierda de la figura. Las columnas de la izquierda muestran trazos de las corrientes registradas en 2 mM $[K]_o$ usando el protocolo descrito en la parte de arriba. Las columnas de la derecha muestran los trazos registrados antes (I_c trazos delgados) y después (I_{tx} trazos gruesos) de la aplicación de 10 nM ErgTx en 98 mM $[K]_o$, el protocolo utilizado se encuentra en la parte superior de la figura.

Otra mutante que no expresó canales funcionales fue la mutante I593R (datos no mostrados), y esta mutante también se ha encontrado en personas que presentan el síndrome QT2 largo congénito. La mutante I593R es procesada de manera similar al canal silvestre, pero no producen canales funcionales (Splawski y cols 2000). Cabe mencionar que cuando mutamos el residuo I593 por cisteína si obtenemos corrientes iónicas, pero el comportamiento del canal cambia perdiendo completamente la inactivación tipo C, así como la sensibilidad por la ErgTx.

Petrecca y cols. (1999) reportaron que la mutante N598Q del canal HERG se encuentra expresada en el espacio perinuclear de las células HEK (células embrionarias de riñón humano), pero no en la superficie de la membrana, por lo que tampoco se encuentran corrientes iónicas. Sus resultados sugieren que el residuo N598 es un sitio putativo extracelular de N-glicosilación, y que la N-glicosilación es requerida para un envío apropiado de la proteína HERG, ya que sin ésta la proteína permanece en el complejo Retículo Endoplásmico-Golgi.

Nosotros expresamos esta mutante (N598Q) en células de *Xenopus* y encontramos corrientes iónicas del tipo del canal silvestre. Cuando se probó la ErgTx (100nM) en estas corrientes, se obtuvo una inhibición del 50 al 70% de la corriente entrante preferencialmente a potenciales negativos. Probablemente el hecho de que no este glicosilada en la N598 no afecta el transporte de esta proteína a la membrana y tampoco su expresión en ovocitos. El papel de los carbohidratos en el tráfico y función de ciertos canales iónicos ha sido reportado por varios grupos. La N-glicosilación aún no ha sido claramente establecida para los canales de potasio. Se reportó que para el canal *Shaker* y el Kv 1.1 no se requiere de esta N-glicosilación para su ensamblaje funcional y transporte a la superficie de las células de *Xenopus* (Santacruz-Tolozá y cols. 1994). Pero por otro lado recientemente se reportó que la N-glicosilación incrementa la estabilidad y la expresión del canal skaker en células de mamíferos (Khanna y cols. 2001)

MODO DE ACCIÓN DE LA ERGTOXINA

¿Juegan las fuerzas electrostáticas un papel importante en la unión de la ErgTx al canal ?

Para explorar si las fuerzas electrostáticas tienen un papel importante en la unión ErgTx/HERG, nosotros alteramos la carga neta de la ErgTx cambiando el pH de la solución extracelular. Los resultados obtenidos sugieren que una toxina con carga neta negativa tiene menos afinidad por el canal y que la protonación de las histidinas presentes en el asa S5 del canal disminuye la afinidad de unión de una toxina cargada positivamente, probablemente por la repulsión de cargas entre los aspárticos y glutámicos del canal y los aminoácidos de la ErgTx cargados positivamente (7 residuos) además de la protonación de la H29.

Por otro lado la adición de una carga positiva a la H578 de canal, reduce la potencia de la ErgTx a pHo 6.5 y 7.5 y permanece igual a pHo 8.5, esto es consistente con una repulsión electrostática entre la ErgTx y la carga positiva del residuo 578. Este efecto es independiente del pHo, ya que el cambio en este parámetro no influye en la carga de la lisina que cuenta con un pK de 10. Como ya habíamos comentado, el pH 8.5 favorece una carga neta negativa en la ErgTx, esto se debe al enmascaramiento de cargas positivas por la ionización de los grupos carboxilos y también contribuye que la H29 no se encuentra en estado protonado. Sin embargo cuando existen 4 lisinas extras en el canal (mutante H578K en cada monomero), no se favorece la interacción con la toxina y esto puede deberse al hecho de que siguen existiendo 7 residuos cargados positivamente en la toxina que favorecen la repulsión electrostática entre ambas proteínas. Los experimentos de pHo sugieren que en el complejo ErgTx/HERG existen interacciones carga-carga pero no son un factor determinante como lo son en la unión de las α -KTx a los canales de potasio. Esto no nos sorprendió ya que la ErgTx tiene un pI de 7.8 por lo tanto al mismo pH la ErgTx tiene pocas cargas positivas (~2).

Sabemos que las fuerzas electrostáticas están involucradas en la unión y en el bloqueo del poro de los canales de potasio por las (α -KTx) (Ranganathan y cols. 1996, Hidalgo y Mackinnon 1996). En la búsqueda de los contactos que hay en estas interacciones primero se identificaron los puentes salinos entre los residuos básicos de las toxinas y los residuos ácidos de los canales, se propone que estas interacciones orientan la toxina a su sitio de unión. Es preciso puntualizar que la mayoría de las toxinas bloqueadoras de canales de potasio (α -KTx) tienen carga neta positiva (~ 5), y que los canales de potasio voltaje dependientes tienen en las asas extracelulares residuos cargados negativamente que forman una pantalla de interacción

También se ha encontrado contacto de fuerzas moleculares de rangos cortos, puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos (Hidalgo y MacKinnon 1995, Naranjo y Miller 1996, Stocker y Miller 1994, Naini y Miller 1994, Aiyar y cols. 1995).

En el asa extracelular S5-P del canal existen 4 aminoácidos cargados negativamente, la mutación de éstos por cisteínas (E575, D580, D591, D609) o alaninas (D580, D591 datos no mostrados) no alteran significativamente la unión de la toxina. Estos resultados nos sugieren que los aminoácidos del canal HERG cargados negativamente no participan de forma directa en la unión de la ErgTx. Además la neutralización de las cargas en la región vecina a estos aminoácidos no presenta o tiene efectos modestos en la unión de la ErgTx. Por el contrario se encontró que los aminoácidos importantes en la unión a la ErgTx no tienen carga (W585, I593, G590 y P632).

LA VOLTAJE DEPENDENCIA DE LA TOXINA

La unión de las toxinas bloqueadoras de canales de potasio puede ser dependiente o independiente del voltaje. Se sabe que el canal se reestructura cuando hay un cambio en el potencial de membrana, pero no se ha establecido ninguna relación directa entre el rearrreglo de estructura del canal y la unión de las toxinas. Lo que si se ha argumentado fuertemente es que la despolarización de la membrana desestabiliza la unión de las α -KTx, favoreciendo la ocupación de iones K^+ dentro del poro. Esto promueve el flujo de potasio y causa una repulsión de cargas entre la lisina 27 y el ión K^+ (Goldstein y Miller 1993). La ErgTx no tiene un equivalente de lisina 27, pero de

igual manera la depolarización reduce la unión de ésta al canal HERG. Esto no puede deberse al efecto del voltaje en la unión de una molécula de ErgTx cargada al campo eléctrico transmembranal, ya que como se muestra en la figura 17B el efecto de voltaje fue más fuerte a pHo 8.5 que a pH 6.5 (la valencia efectiva fue de 0.36 y 0,2 a pHo 8.5 y 6.5 respectivamente). Esto es opuesto al efecto esperado ya que la ErgTx a pHo 8.5 está más cargada negativamente y se podría pensar que la depolarización de la membrana mejoraría la unión de la ErgTx.

MODELO DE INTERACCIÓN TOXINA-CANAL

Trabajo con toxinas.

El veneno de los alacranes cuenta con una gran variedad de toxinas diferentes aparentemente para asegurar que el alacrán inhibirá una fracción significativa de diferentes canales de potasio de su víctima. Hasta la fecha todas las toxinas de alacrán que afectan canales de potasio son bloqueadoras de la corriente, es decir, se unen al vestibulo externo del poro y bloquean la conducción de iones por oclusión física sin afectar la cinética de apertura y cierre del canal (MacKinnon y Miller 1988, 1989, MacKinnon 1990).

El bloqueo o modulación de canales de potasio por toxinas, ha sido extensivamente estudiado por análisis mutacional tanto del receptor como del ligando. Para entender la interacción entre un canal y una toxina se requiere caracterizar interacciones individuales de la interfase. Este estudio resulta más sencillo cuando se conocen las estructuras de los componentes individuales. Las toxinas son buenos candidatos para la mutagénesis puntual ya que su estructura es muy rígida y compacta y es difícil que una mutación desestabilice su estructura tridimensional.

Los resultados de los estudios de mutagénesis con las α -KTx evidencian claramente una cara de unión de la toxina al canal que está compuesta por los aminoácidos que se proyectan desde la β plegada hasta el centro de la molécula. Los más importantes se proyectan desde la segunda hoja β ubicada en la porción media de la hoja β plegada

(lugar donde se encuentra la lisina 27, ver figura 21 y 23 derecha) (Stampe y cols 1994, Goldstein y cols 1994), pero existen otros aminoácidos de menor importancia en la interacción que se proyectan desde la primer y tercer hoja β , es decir, del N-terminal y C-terminal de las toxinas. Durante algún tiempo se pensó que estos aminoácidos no participaban en la unión, pero mediante experimentos usando péptidos sintéticos y mutaciones sitio específicas (Gurrola y cols. 1995, Martínez y cols. 1997) se pudo concluir que estos aminoácidos se unen en la parte más externa del vestíbulo del poro. La α -hélice se ubica en la otra cara de la toxina y no interacciona con la cara del canal (Stampe y cols. 1994).

Nosotros aún no sabemos que aminoácidos específicos de la ErgTx están participando en la unión al canal HERG, pero utilizando variantes naturales encontradas en el veneno de dos alacranes mexicanos del género *Centruroides*, encontramos residuos que podrían estar en la cara de unión al canal o lejos de éste.

Como se mencionó en la sección de resultados la ErgTx-3 tiene una secuencia primaria idéntica a la ErgTx excepto que la metionina 35 se encuentra oxidada (marcada con una flecha en la figura 22). Estos resultados se obtuvieron comparando las masas moleculares de ambas toxinas obtenidas mediante espectrometría de masas. El resultado obtenido era un aumento de 16 en la masa de la ErgTx-3, es decir en lugar de tener una masa molecular de 4730 ahora era de 4746, exactamente la diferencia que se le atribuye a la oxidación de azufre de una metionina (Lundblad 1991). Esta oxidación hace que la afinidad por el canal HERG disminuya ~ 4 ordenes de magnitud, lo que sugiere que esta metionina es importante para la unión. La ErgTx-2 tiene un aspártico en lugar de la metionina 35 y al ensayarse en el canal HERG presenta una disminución de ~ 2 ordenes de magnitud en la afinidad de unión.

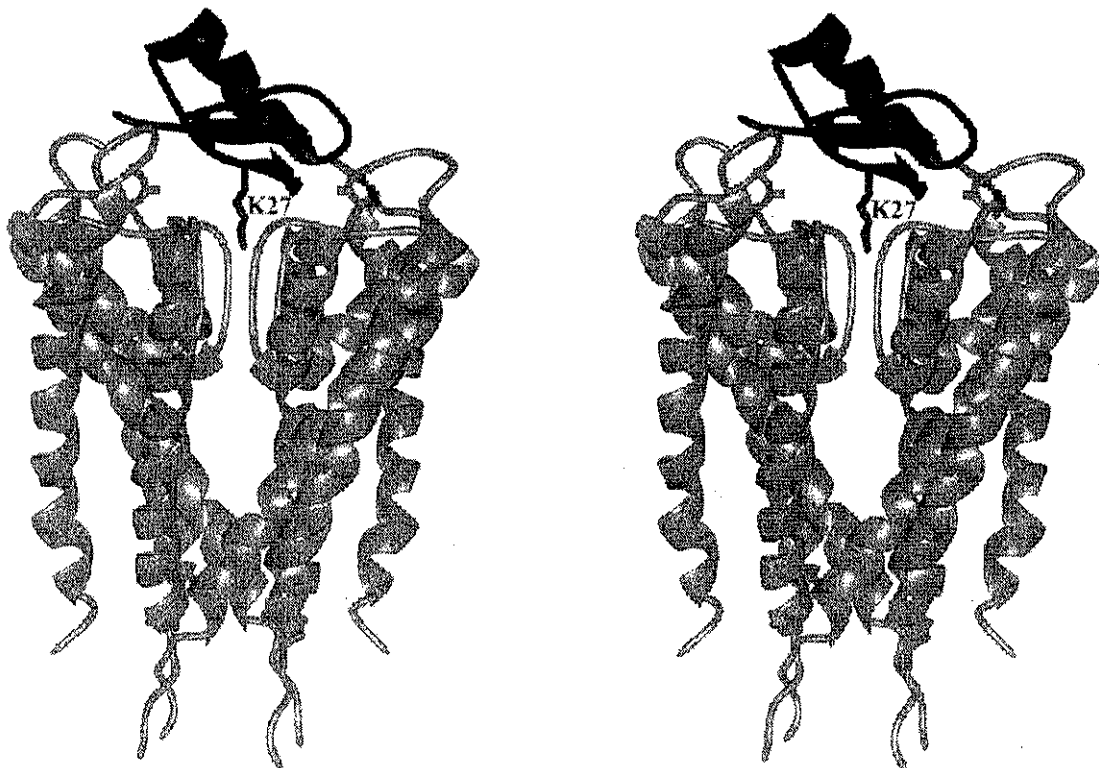


Figura 21. Modelo stereo tridimensional de la interacción de un canal de potasio con una toxina de alacrán obtenida a partir de las estructuras cristalográficas por separado. Las hélices α representan dos monómeros del canal bacteriano KcsA el cual solo tiene la región equivalente a S5-P-S6 de un canal de potasio dependiente de voltaje. La estructura tridimensional de una toxina de alacrán se representa en negro, y la lisina 27 proyectada desde la hoja β y señalada como K27.

Por otro lado una ErgTx de *Centruroides limpidus limpidus* (CII8.5) cuya purificación y estructura primaria no han sido publicados todavía, presenta la misma afinidad que la ErgTx y a diferencia de las otras dos toxinas, ésta si cuenta con la metionina 35. Esta toxina sólo difiere en dos residuos de la secuencia de la Ergtx: alanina 12 cambiada por una serina y asparagina 26 cambiada por una lisina al final de la α -hélice, lo que sugeriría que estos cambios no son importantes para la unión y que tal vez la α -hélice de la ErgTx también está del otro lado de la cara de interacción con el canal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 22. Estructura primaria de la ErgTx.
 Encerrados en cuadros se muestran las cisteínas que forman los 4 puentes disulfuro. La flecha indica la metionina 35 que en caso de la ErgTx-3 se encuentra oxidada.

Trabajo con el canal.

Los aminoácidos del filtro de selectividad de los canales de potasio son altamente conservados, pero los residuos que rodean a éste son variables y esto los convierten en diferentes sitios de unión para las toxinas. Cuando se mutaron los residuos de la región P para dilucidar que aminoácidos estaban participando en la unión de la toxina, se obtuvieron residuos similares en diferentes canales y todos se ubican flanqueando el poro del canal, a diferencia de los residuos encontrados en el canal HERG.

Ciclos de dobles mutantes

Una vez hallada la cara de unión del canal se hicieron estudios de dobles mutantes. Estos estudios han sido valiosos en la obtención de la geometría del vestíbulo externo del poro del canal. Por ejemplo cuando la ChTx asimétrica (figura 23 lado derecho) se une al canal simétrico (figura 23 lado izquierdo) la cadena lateral de la lisina 27 se proyecta cerca del sitio de conducción del potasio en la parte más externa del poro del canal (Park y Miller 1992, Aiyar y cols. 1996), esto le da a la R25, K11 y K31 (aminoácidos que participan en la unión de la toxina) posiciones equidistantes de la K27). Con ejemplos como éste y con la estructura tridimensional de la toxina se logró inferir las dimensiones del vestíbulo externo del poro (Stampe y cols. 1994, Aiyar y cols. 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

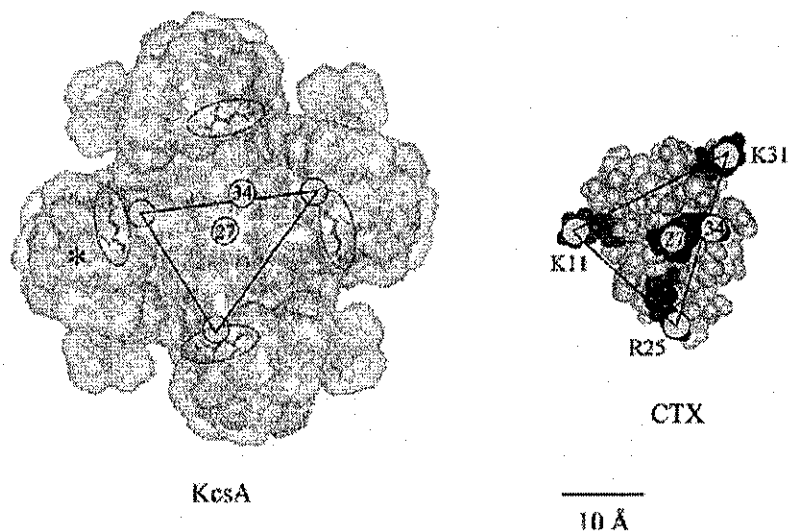


Figura 23. Medidas del vestibulo externo del poro. Esto se hizo a través de la triangulación física obtenida del estudio de dobles mutantes entre una toxina (lado derecho) y un canal de potasio (lado izquierdo). Figura tomada de Mackinnon y cols. 1998.

Hasta estos reportes de estudios de interacción toxina-canal se podía concluir dos cosas: 1, que la entrada extracelular del canal de potasio es relativamente conservada en su estructura tridimensional, pero la composición de aminoácidos no es tan conservada y 2, que las toxinas de alacrán tienen un plegamiento conservado que las hace posicionarse en la entrada del poro del canal como si fuera un tapón, pero la afinidad de cada una dependerá de la interacción del par de residuos que exista entre un canal específico y una toxina

Un ejemplo de esto último fue el estudio de Mackinnon y cols. (1998) donde reportó la conservación estructural que hay entre los canales procariontes (KcsA) y eucariontes (*Shaker*) cambiando tres aminoácidos del poro del canal *Shaker* al poro del canal KcsA que se sabe participan en la unión de la Agitoxina. Las tres mutaciones hicieron que el canal KcsA fuera sensible al bloqueo por la Agitoxina, y estos resultados demostraron que la estructura general del receptor de agitoxina es

muy similar en ambos canales. Estas conclusiones justifican el uso de datos energéticos tomados de los estudios hechos de la interacción de las toxinas con los canales de potasio.

A través de la combinación de datos estructurales y funcionales (competencia del TEA y la ErgTx por el sitio de unión, la corriente residual en el bloqueo de la ErgTx, los resultados de las quimeras y las mutantes sitio específicas), nosotros podemos concluir que la ErgTx se une en el vestíbulo externo del poro, pero probablemente no este ocluyéndolo como en el caso de las otras toxinas de alacrán bloqueadoras de canales de potasio.

En este trabajo encontramos que la posición de los aminoácidos importantes en el HERG para la unión de la ErgTx difiere de la de los canales voltaje dependientes hasta ahora estudiados (Ranganathan y cols. 1996, Goldstein y cols. 1994). Dos de las mutantes importantes en la interacción de la toxina (W585 y I593) son residuos hidrofóbicos, los otros dos (G590 y P632) no lo son, pero carecen de carga. Haciendo un análisis de la estructura secundaria del asa S5 en 6 diferentes programas (programa Protean, in Laser Gene, programa Network Protein Sequences Analisis: SOMP, SOPMA, HNN, GOR4, SIMPA96), encontramos en todos ellos una posible estructura de α -hélice anfipática entre el residuo 583-594 (aunque los aminoácidos que flanquean la hélice variaron). El análisis de vuelta hélice mostró que los residuos hidrofóbicos en esta región se agrupan en una cara de la α -hélice, en la que se encuentran los residuos W585, G590 y I593. La otra cara de la α -hélice cuenta principalmente con residuos hidrofílicos y según nuestro estudio de mutagénesis esta cara no está participando en la unión de la toxina (figura 24).

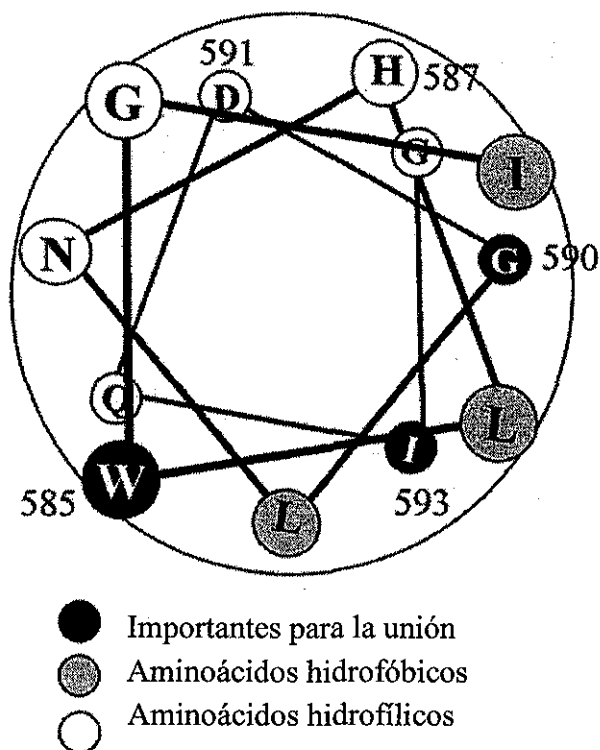


Figura 24. Esquema de una estructura hipotética de α -hélice que comprende la región 583-594 del asa S5-P del canal HERG.

Los datos de la mutagénesis puntual sugieren que tanto el asa S5-P como la P-S6 están participando en la unión de la ErgTx. Estas dos asas no están contiguas cuando se observan en una dimensión, sin embargo si uno observara en un plano tridimensional probablemente el asa S5-P que cuenta con 43 aminoácidos pudiera estar cerca del asa P-S6 tal y como se muestra en la figura 25. Esto podría apoyar la idea de que el poro del canal está formando una pantalla hidrofóbica donde se puede unir la ErgTx.

En resumen, en esta tesis se muestra que el asa S5-P del canal HERG contribuye a determinar las propiedades de la boca externa del poro y proponemos que el asa S5-P puede estar ubicada muy cerca de la boca externa del poro y participar en cambios conformacionales importantes para el proceso de inactivación C.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

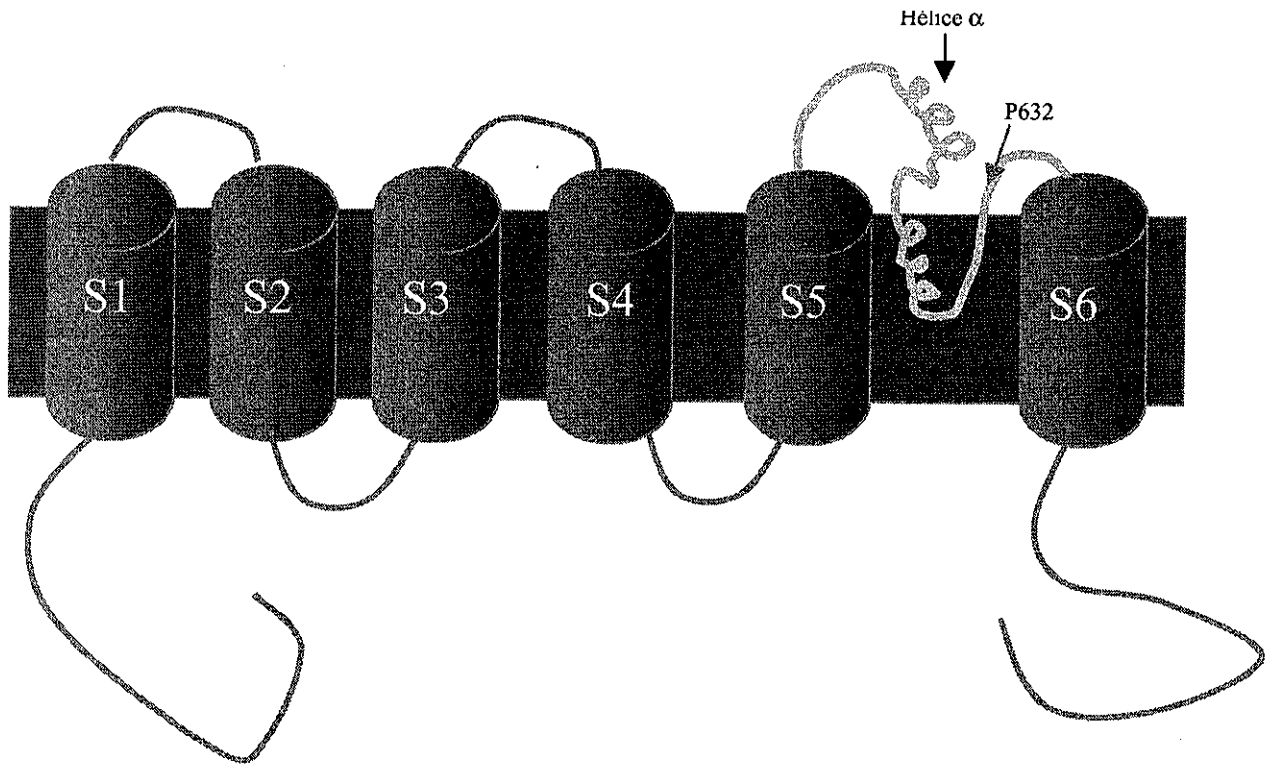


Figura 25. Modelo del canal HERG y específicamente del vestíbulo externo del poro. En este modelo se propone que la parte media del asa S5 forma una estructura de hélice α (señalado con una flecha). Para formar un sitio de unión a la toxina se propone también que en un plano tridimensional esta hélice α quedaría muy cerca del asa S6 donde se encuentra el residuo P632

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

1. La ErgTx es altamente específica para el canal HERG. La ErgTx no afecta otros canales de potasio voltaje dependientes como: Kv 1.4, Kv 4.3, Kv 2.1, KvLQT1, Kir, EAG y ELK
2. La Ergtoxina (200nM) no afecta la corriente del canal EAG ni del canal ELK de ratón expresado heterológamente en ovocitos de *Xenopus*. Este resultado permitió proponer el uso de quimeras hechas de la combinación del canal m-EAG y HERG para dilucidar el sitio de unión de la toxina
3. La Ergtoxina se une al poro del canal, las evidencias para concluir esto son:
 - a) La ErgTx no afecta la corriente saliente de la quimera HMH formada con los 6 segmentos transmembranales del canal HERG y la región P del canal m-EAG.
 - b) La Ergtoxina inhibe la corriente de la quimera inversa M438H (canal m-EAG con la región P del canal HERG), de manera similar a como lo hace el canal silvestre.
4. El asa S5-P del canal HERG es muy importante para la unión de la ErgTx
 - a) La Ergtoxina inhibe sólo el 15% de la corriente de la quimera MHM (la cual no contiene el asa S5 del canal HERG).
 - b) Tres de los cuatro aminoácidos identificados como importantes en la interacción con la toxina se encuentran en el asa S5-P (W585, G590, I593).
5. Mediante el análisis de la estructura secundaria se predice que podría existir una hélice α en la región 583-594. Lo cual sugiere una cara hidrofóbica en la que puede estar interaccionando la ErgTx.
6. Los experimentos de pH muestran que la interacción carga-carga juegan un papel en la unión de la ErgTx al HERG, sin embargo tales interacciones no constituyen un factor principal en la unión.
7. Experimentos no publicados realizados con variantes naturales aisladas del

veneno de *Centruroides noxius* y *Centruroides limpidus*, muestran que la metionina en la posición 39 es importante para la unión de la toxina al canal.

PERSPECTIVAS

Para corroborar que el modelo del vestíbulo externo del poro que proponemos es correcto, pensamos que es necesario hacer ciclos de dobles mutantes con la ErgTx y el canal HERG.

El paso que consideramos prioritario es obtener la estructura tridimensional de la toxina para darnos una idea de que residuos podrían estar participando en la unión al canal. Respecto a este punto tenemos una colaboración con la Dra. Muriel DeLepierre del Instituto Pasteur que se encargará de obtener dicha estructura. Simultáneamente en nuestro laboratorio se intenta obtener la ErgTx, ya sea por síntesis química o por expresión del gen mediante un sistema de expresión procarionte. Este paso ha sido un poco complicado debido a que existe una limitante en el plegamiento correcto de los 4 puentes disulfuro de la toxina.

Una vez que se obtenga un método confiable para tener la ErgTx (sintética o recombinante) plegada como la nativa, se propone hacer mutaciones sitio específicas de los posibles aminoácidos que estén en la cara de unión al canal. Cuando se encuentren dichos aminoácidos se propone hacer ciclos de dobles mutantes con los aminoácidos del canal (los que se identificaron en este trabajo y otros). Con el análisis de éstos resultados podremos saber si efectivamente el vestíbulo externo del poro del canal HERG tiene una estructura tridimensional diferente a los otros canales de potasio voltaje dependientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, G. W.**, Sesti, F., Splawski, I., Buck, M. E., Lehmann, M. H., Timothy, K. W., Keating, M. T., Goldstein, S. A. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. 1999. *Cell*. 97, 175-87.
- Antz, C.**, Geyer, M., Fakler, B., Schott, M. K., Guy, H. R., Frank, R., Ruppersberg, J.P., Kalbitzer, H. R. NMR structure of inactivation gates from mammalian voltage-dependent potassium channels. 1997. *Nature*. 385, 272-274.
- Armstrong, C. M. and Hille, B.** Voltage-gated ion channels and electrical excitability. 1998. *Neuron*. 20, 371-380.
- Aiyar, J.**, Withka, J. M., Rizzi, J. P., Singleton, D. H., Andrews, G. C., Lin, W., Boyd, J., Hanson, D. C., Simon, M., Dethler, B., Lee, Ch., Hall, J. E., Gutman, G. A. and Chandy, K. G. Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. 1995. *Neuron*. 15, 1169-1181.
- Aiyar, J.**, Rizzi, J. P., Gutman, G. A., Chandy, K. G. The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. 1996. *J Biol Chem*. 271, 31013-6.
- Batista, C. V.**, Gomez-Lagunas, F., Lucas, S., Possani, L. D. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁽⁺⁾-channels. 2000. *FEBS Lett*. 486, 117-120.
- Blanc, E.**, Fremont, V., Sizun, P., Meunier, S., Van Rietschoten, J., Thevand, A., Bernassau, J. M., Darbon, H. Solution structure of P01, a natural scorpion peptide structurally analogous to scorpion toxins specific for apamin-sensitive potassium channel. 1996. *Proteins*. 24, 359-369.
- Bixby, K. A.**, Nanao, M. H., Shen, N.V., Kreusch, A., Bellamy, H., Pfaffinger, P. J., Choe, S. Zn²⁺-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K⁺ channels. 1999. *Nat Struct Biol*. 6, 38-43.
- Bontems, F.**, Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljansky, Y., Menez, A., Toma, F. Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by 1H-NMR. Charybdotoxin possesses a structural motif found in other scorpion toxins. 1991. *Eur J Biochem*. 196, 19-28.
- Bezanilla, F., Armstrong, C. M.** Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. 1972. *J. Gen. Physiol*. 60, 588-608.
- Cha, A.**, Snyder, G. E., Selvin, P. R., Bezanilla, F. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. 1999. *Nature* 402, 809-813.
- Chang, G.**, Spencer, R. H., Lee, A. T., Barclay, M. T., Rees, D. C. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. 1988. *Science*. 282, 2220-2226.
- Chen, J.**, Zou, A., Splawski, I., Keating, M. T., Sanguinetti, M. C. Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. 1999. *J Biol Chem*. 274, 10113-10118.

- Choe, S.** Ion channel structure. 2002. *Nature Neuroscience*. 3, 115-121.
- Chouabe, C., Drici, M. D., Barhanin, J.** Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac K^+ channels I_{Kr} and I_{Ks} . 2000. *Therapie*. 55, 195-202.
- Chuang, R. S. L., Jaffe, H., Cribbe, L., Perez-Reyes, E., Swartz, K. J.** Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. 1998. *Nature Neurosci.* 1, 668-6754.
- Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., Keating, M. T.** A molecular basis for cardiac arrhythmias: Herg mutations cause long QT syndrome. 1996. *Circulation*. 93, 1791-1795.
- Dauplais, M., Gilquin, B., Possani, L. D., Gurrola-Briones, G., Roumestand, C., Menez A.** Determination of the three-dimensional solution structure of noxiustoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins. 1995. *Biochemistry*. 34, 16563-16573.
- Debin, J. A., Maggio, J. E., Strichartz, G. R.** Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. 1993. *Am. J. Physiol.* 264, C361-C369.
- Delepierre, M., Prochnicka-Chalufour, A., Possani, L. D.** A novel potassium channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*: A 1H NMR analysis using a nano-NMR probe. 1997. *Biochemistry*. 36, 2649-2658.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R.** The structure of a potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. 1998. *Science* 280, 69-77.
- Drici, M. D., and Barhanin, J.** Cardiac K^+ channels and drugs-acquired long QT syndrome. 2000. *Therapie*. 55, 185-193.
- Drysdale, R., Warmke, J., Kreber, R., Ganetzky, B.** Molecular characterization of eag: a gene affecting potassium channels in *Drosophila melanogaster*. 1991. *Genetics*. 127, 497-505.
- Dun, W., Jiang, M., Tseng, G-N.** Allosteric effects of mutations in the extracellular S5-P loop on the gating and ion permeation properties of Herg. 1999. *Pflugers Archiv*. 439, 141-149.
- Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., MacKinnon, R.** X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. 2002. *Nature*. 415, 287-294.
- Fernández, I., Romi, R., Szendeffy, S., Martin-Eauclaire, M. F., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Pons, M., Giralt, E.** Kaliotoxin (1-37) shows structural differences with related potassium channel blockers. 1994. *Biochemistry*. 33, 14256-14263.
- Ficker, E., Thomas, D., Viswanathan, P.C., Dennis, A.T., Priori, S.G., Napolitano, C., Memmi, M., Wible, B.A., Kaufman, E.S., Iyengar, S., Schwartz, P.J., Rudy, Y. and Brown, A.M.** Novel characteristics of a misprocessed mutant HERG channel linked to hereditary long QT syndrome. 2000a. *Am. J. Physiol.* 279, H1748-H1756.
- Ficker, E., Dennis, A.T., Obejero-Paz, C.A., Castaldo, P., Taglialatela, M., and Brown A.M.** Retention in the endoplasmic reticulum as a mechanism of dominant-negative current suppression in human long QT syndrome. 2000b. *J. Mol. Cardiol.* 32, 2327-2337.

- Glauner, K. S., Mannuzzu, L. M., Gandhi, C. S., Isacoff, E. Y.** Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the *Shaker* potassium channel. 1999. *Nature*. 402, 813-817.
- Goldstein, S. A. N. and Miller, C.** Mechanisms of Charybdotoxin block of a voltage-gated K channel. 1993. *Biophys J*. 65, 1613-1619.
- Goldstein, S.A.N., Pheasant, D.J. and Miller.** Mechanism of charybdotoxin receptor of a *Shaker* K⁺ channel: Peptides and channel residues mediating molecular recognition. 1994. *Neuron*. 12, 1377-1388
- Grishin E.** Polypeptide neurotoxins from spider venoms. 1999. *Eur J Biochem*. 264, 276-80.
- Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M., Zinn-Justin, S.** Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. 1998. *J. Toxicol.Toxin Rev*. 17, 131-159.
- Gross, A. and MacKinnon, R.** Agitoxin footprinting the *Shaker* potassium channel pore. 1996. *Neuron*. 16, 399-406.
- Goldstein, S. A., Miller, C.** Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. 1993 *Biophys J*. 65, 1613-9.
- Gurrola, G. B. and Possani, L.D.** Structural and functional features of noxiustoxin: a K⁺ channel blocker.1995. *Biochem. Mol. Int*. 37, 527-535.
- Gurrola, G. B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L. D., Wanke, E.** A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K⁺ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom.1999. *FASEB*. 13, 953-962.
- Herzberg, I. M., Trudeau, M.C., Robertson, G.A.** Transfer of rapid inactivation and sensitivity to the class III antiarrhythmic drug E-4031 from HERG to M-eag channels. 1998. *J Physiol*. 511, 3-14.
- Hidalgo, P. and MacKinnon R.** Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. 1995. *Science*. 286:307-310l.
- Hille, B.** Ionic channel of excitable membranes. 3rd edn (Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts). 2001.
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W.** Two types of inactivation in *Shaker* K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. 1991. *Neuron*. 7, 547-556.
- Johnson, B. A., Sugg, E. E.** Determination of the three-dimensional structure of iberiotoxin in solution by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. 1992. *Biochemistry*. 3, 8151-8159.
- Kagan, A., Yu, Z., Fisman, G., and McDonald, T.** The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces Wild type HERG expression. 2000. *J. Bio Chem*. 275, 11241-11248.
- Keating, M. T., Sanguinetti, M. C.** Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):569-80.
- Khanna, R., Myers, M. P., Laine, M., Papazian, D. M.** Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells. 2001. *J Biol Chem*. 276, 34028-34034
- Kiehn, J., Lacerda, A. E., Wible, B., Brown, A. M.** Molecular physiology and pharmacology of HERG. 1996. *Circulation*. 94, 2572-2579.
- Kem, W., Pennington, M. W., Norton, R.S.** Sea anemone toxins as templates for the design of

- immunosuppressant drugs. 1999. *Perspectives Drug Disc. Design.* 15/16, 111-129.
- Kharrat, R.,** Mansuelle, P., Sampieri, F., Crest, M., Oughideni, R., Van Rietschoten, J., Martin-Eauclaire, M. F., Rochat, H., El Ayeb, M. Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from *Scorpio maurus* venom: purification, structure and action on potassium channels. 1997. *FEBS Lett.* 406, 284-290.
- Kreusch A,** Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. 1998. *Nature.* 392, 945-948.
- Krezel, A. M.,** Kasibhatla, C. Hidalgo, P., MacKinnon, R. and Wagner, G. Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: Caliper for probing channel geometry. 1995. *Protein Sci.* 4, 1478-1489.
- Li, M.,** Jan, Y. N., Jan, L. Y. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. 1992. *Science.* 257, 1225-1230.
- Li-Smerin, Y. and Swartz K. J.** Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca^{2+} and K^{+} channel. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 95, 8585-8589.
- Lu, Z.,** Klem, A. M., Ramu, Y. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. 2001. *Nature* 413, 809-813.
- Lundblad, R. L.** Chemical reagents for protein modification . 2da edn (CRC Press Inc). 1991.
- MacKinnon, R. and Miller, C.** Mechanism of charybdotoxin block of the high conductance, Ca^{2+} activated K^{+} channel. 1988. *J. Gen. Physiol.* 91,335-349.
- MacKinnon, R. and Miller, C.** Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. 1989. *Science.* 245, 1382-1385.
- Mackinnon, R.,** Heginbotham, L. and Abramson, T. Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. 1990. *Neuron.* 5, 767-771
- MacKinnon, R., and Yellen, G.** Mutations affecting TEA blockade and Ion permeation in voltage-activated K^{+} channel. 1990. *Science.* 250, 276-278.
- MacKinnon, R.,** Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., Chait, B. T. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. 1998. *Science.* 280, 106-9.
- MacIntosh, J. M.,** Olivera, B. M., Cruz, L. J. Conus peptides as probes for ion channels. 1999. *Methods Enzymol.* 249, 605-624.
- Martínez, F.,** Muñoz-Garay, C., Gurrola, G., Darszon, A., Possani, L. D., Becerril, B. Site directed mutants of Noxiustoxin reveal specific interactions with potassium channels. 1998. *FEBS Letters.* 429, 381-384.
- Martins, J. C.,** Zhang, W. G., Tartar, A., Lazdunski, M., Borremans, F. A. Solution conformation of leiurotoxin I (scyllatoxin) by 1H nuclear magnetic resonance. Resonance assignment and secondary structure. 1990. *FEBS Lett.* 260, 249-53.
- Meunier, S.,** Bernassau, J. M., Sabatier, J. M., Martin-Eauclaire, M. F., Van Rietschoten, J., Cambillau, C., Darbon, H. Solution structure of P05-NH2, a scorpion toxin analog with high affinity

- for the apamin-sensitive potassium channel. 1993. *Biochemistry*. 32, 11969-11976.
- Miller, C.** Competition for block of Ca^{2+} -activated K^+ channel by charybdotoxin and tetraethyl ammonium. 1988. *Neuron*. 1, 1003-1006
- Miller, C.** The inconstancy of the human heart. 1996. *Nature*. 379, 767-768.
- Mitcheson, J. S., Chen, J., Lin, M., Culberson, C., Sanguinetti, M. C.** A structural basis for drug-induced long QT syndrome. 2000. *PNAS*. 97, 12329-12333.
- Morais-Cabral, J. H., Lee, A., Cohen, S.L., Chait, B. T, Li, M., MacKinnon, R.** Crystal structure and functional analysis of the Herg potassium channel: an eukaryotic PAS domain. 1998. *Cell*. 95, 649-655.
- Naini, A. A., Miller, C.** A symmetry-driven search for electrostatic interaction partners in charybdotoxin and a voltage-gated K^+ channel. 1996. *Biochemistry*. 35, 6181-6187.
- Naranjo, D. and Miller, C.** A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and *Shaker* K^+ channel. 1996. *Neuron*. 16, 123-130.
- Pardo-López, L., García-Valdés, J., Gurrola, G., Robertson, G. A., Possani, L. D.** Mapping the receptor site for Ergotoxin, a specific blocker of ERG channels. 2002. *FEBS Lett*. 10, 45-49.
- Park, C-S. and Miller, C.** Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K^+ channel. 1992. *Neuron*. 9, 307-313
- Petrecca, K., Atanasiu, R., Akhavan, A., Shrier, A.** N-linked glycosylation sites determine HERG channel surface membrane expression. 1999. *J Physiol*. 515, 41-48.
- Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., Tytgat, J.** Scorpions toxins specific for Na^+ -channels. 1999. *Eur.J.Biochem*. 264, 287-300.
- Possani, L. D., Selisko, B., Gurrola, G.** Structure and function of scorpion toxins affecting K^+ -channels. In *Perspective in Drug Discovery and Design* (Darbon, H. & Sabatier, J. M. eds). Vol 15/16, pp 15-40. Kluwer Academic Publishers, Holland.
- Ranganathan, R., Lewis, J. H., MacKinnon, R.** Spatial localization of the K^+ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. 1996. *Neuron*. 16, 131-139.
- Robertson, G. A., Warmke, J. M., Ganetzky, B.** Potassium currents expressed from *Drosophila* and mouse eag cDNAs in *Xenopus* oocytes. 1996. *Neuropharmacology*. 35, 841-50.
- Roden, D. M., Balse, J. R.** A plethora of mechanisms in the HERG-related long QT syndrome. 1999. *Genetics meets electrophysiology, Cardio Res*. 44, 242-246.
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., Keating, M. T.** A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. 1995. *Cell*. 81, 299-307.
- Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Spector, P. S., Keating, M. T.** Spectrum of HERG K^+ channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. 1996. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 2208-2212.
- Sanguinetti, M. C.** Dysfunction of delayed rectifier potassium channels in an inherited cardiac arrhythmia. 1999. *Ann N Y Acad Sci*. 868, 406-13.
- Sanguinetti, M. C., Xu, Q. P.** Mutations of the S4-S5 linker alter activation properties of HERG potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. 1999. *J Physiol*. 514, 667-75.

- Santacruz-Toloza, L.,** Huang, Y., John, S. A., Papazian, D. M. Glycosylation of shaker potassium channel protein in insect cell culture and in *Xenopus* oocytes. 1994. *Biochemistry*. 33, 5607-5613.
- Scaloni, A.,** Bottiglieri, C., Ferrara, L., Corona, M., Gurrola, G. B., Batista, C., Wanke, E., Possani, L. D. Disulfide bridges of ergotoxin, a member of a new sub-family of peptide blockers of the *ether-a-go-go*-related K⁺ channel. 2000. *FEBS Lett*.
- Schonherr, R., Heinemann, S. H.** Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. 1996. *J Physiol*. 493, 635-642.
- Schonherr, R.,** Rosati, B., Hehl, S., Rao, V. G., Arcangeli, A., Olivotto, M., Heinemann, S.H., Wanke, E. Functional role of the slow activation property of ERG K⁺ channels. 1999. *Eur J Neurosci*. 11, 753-60.
- Shen, N. V.,** Chen, X., Boyer, M. M., Pfaffinger, P. J. Deletion analysis of K⁺ channel assembly. 1993. *Neuron*. 11, 67-76.
- Smith, P. L.,** Baukrowitz, T., Yellen, G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. 1996. *Nature*. 379, 833-6.
- Spector, P. S.,** Curran, M. E., Zou, A., Keating, M. T., Sanguinetti, M. C. Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. 1996. *J Gen Physiol*. 107, 611-9.
- Splawski, I.,** Shen, J., Timothy, K. W, Lehmann, M. H., Pripri, S. G., Robinson, J. L., Moss, A. J., Schwartz, P. J., Towbin, J. A., Vincent, G. M., Keating, M. T. Spectrum of mutation in long-QT syndrome genes *KvLQT1*, *Herg*, *SCN5A*, *KCNE1* and *KCNE2*. 2000. *Circulation*. 102:1178-1185.
- Stampe, P.,** Kolmakova-Partensky, L., Miller, C. Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. 1994. *Biochemistry*. 33, 443-450
- Stocker, M. and Miller, C.** Electrostatic distance geometry in a K⁺ channel vestibule. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:9509-9513.
- Swartz, K. J. and MacKinnon, R.** Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. 1997a. *Neuron*, 18: 665-673.
- Swartz, K. J. and MacKinnon, R.** mapping the receptor site for hanatoxin a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels. 1997b. *Neuron*, 18:675-682.
- Takahashi, H.,** Kim, J., Min, H. J., Sato, K., Swartz, J. K. and Shimada, I. Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels: common surface features of gating modifier toxins. 2000. *J Mol Biol* 297:771-780.
- Tenenholz, T. C.,** Rogowski, R. S., Collins, J. H., Blaustein, M. P., Weber, D. J.. Solution structure for Pandinus toxin K- α (PiTX-K α), a selective blocker of A-type potassium channels. 1997. *Biochemistry*. 36, 2763-71.
- Trudeau, M. C.,** Wanke, J. W., Ganetzky, B., Robertson, G. A. Herg, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. 1995. *Science*, 269, 92-95.

- Tseng-Crank, J. C. L.,** Tseng, G.-N., Schwartz, A., and Tanouye, M. A. Molecular cloning and functional expression of a potassium channel cDNA isolated from a rat cardiac library. 1990. FEBS Lett 268, 63-68
- Tseng G-N.** I_{Kr} : The hERG channel. 2001. J Mol Cell Cardiol. 33: 835-849.
- Tytgat, J.,** Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M. F., van der Walt, J. J., Possani, L. D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. 1999. Trends Pharmacol Sci. 11, 444-447.
- Vadenberg, J. I.,** Walker, B. D., Campbell, T. J. HERG K⁺ channels: friend and foe. 2001. TRENDS in Pharmacological Sciences. 22, 240-246.
- Valdivia, H.H., Possani, L.D.** Peptide toxins as probes of ryanodine receptor. Trends cardiovascular Med. 8, 111-118.
- Wang, J.,** Trudeau, M. C., Zappia, A. M., Robertson, G. A. Regulation of deactivation by an amino terminal domain in human *Ether-à-go-go*-related gene potassium channel. 1998. J. Gen. Physiol. 112, 637-647.
- Wang, J.,** Myers, C., Robertson, G. A. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K⁺ channels. 2000. J. Gen. Physiol. 115, 749-758.
- Warmke, J.,** Drysdale, R., Ganetzky, B. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. 1991. Science. 252, 1560-2.
- Warmke, J. W.,** Ganetzky, B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. 1994. Proc Natl Acad Sci U S A. 91,3438-3442.
- Zerangue, N.,** Jan, Y. N., Jan, L. Y. An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1. 2000. Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 3591-3595.
- Zhong, Y., and Wu, C. F.** Modulation of different K⁺ currents in *Drosophila*: a hypothetical role for the Eag subunit in multimeric K⁺ channels. 1993. J Neurosci. 13, 4669-4679.
- Zhou, Z.,** Gong, Q., Epstein, M. L., January, C. T. Herg channel dysfunction in human long QT syndrome. J. Biol. Chem. 1998. 273,21061-21066.
- Zou, A.,** Xu, Q. P., Sanguinetti, m. C. A mutation in the pore region of HERG K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes reduces rectification by shifting the voltage dependence of inactivation. 1998. Journal of physiol. 509, 129-137.

ANEXO 1

Mapping the receptor site for ergtoxin, a specific blocker of ERG channels

Liliana Pardo-López^a, Jesús García-Valdés^a, Georgina B. Gurrola^a, Gail A. Robertson^b,
Lourival D. Possani^{a,*}

^aDepartment of Molecular Recognition and Structural Biology, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad 2001, P.O. Box 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico

^bDepartment of Physiology, Wisconsin University, Madison Medical School, Madison, WI 53706, USA

Received 7 November 2001; accepted 19 November 2001

First published online 30 November 2001

Edited by Maurice Montal

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract We show here that ergtoxin (ErgTx) is a bona fide, specific blocker of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) channels. It does not affect the function of either M-eag or M-elk channels. A chimeric construction containing a segment of the P-region of M-eag channel inserted into the HERG channel drastically diminished or completely abolished the inhibitory effect of ErgTx, whereas chimeras of the P-region of HERG channel into M-eag channels recovered the inhibitory effect. From the P-region point mutants of HERG channel assays, only the mutant N598Q shows about 25% decrement of the ErgTx inhibitory effect. ErgTx recognizes the P-region of HERG channels, blocking the channel function with a K_d in the order of 12 nM. © 2002 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Human ether-a-go-go-related gene channel; K⁺ channel; Ergtoxin; M-elk channel; M-eag channel; Scorpion toxin

1. Introduction

The human ether-a-go-go-related gene (HERG) is a member of the Eag super family of genes encoding potassium channels with six transmembrane domains, an S4 region and a highly conserved P-region [1]. Mutations in HERG give rise to inherited, type 2 long QT syndrome [2], caused by a loss of the cardiac repolarizing current I_{Kr} [3,4]. Currents arising from expression of HERG or ERG, as the homologs in other species are known, also play a role in spike-frequency adaptation in neurons [5] and in human pancreatic β -cells [6].

ERG channels are the target of a group of potent drugs including anti-arrhythmics, anti-histamines and antibiotics [7,8] that block K⁺ currents causing acquired long QT syndrome as a side effect. The discovery of naturally occurring substances that can specifically and reversibly block or recognize these types of channels is fundamental for the search and development of new putative drugs to treat some of the diseases and malfunctions associated with HERG channels. For the voltage-dependent K⁺ channels the use of scorpion toxins [9–11] has been extremely useful to determine the geometry of the outer vestibule of the pore of the channel, to conduct studies of double mutants (channel and toxin coding genes)

for correlation of the structure with the function of the ligand–receptor complexes [12–18]. Two main kinds of naturally occurring peptides from scorpions and spiders have been isolated and characterized: (i) the blocker toxin type, that interacts with the outer vestibule of the pore inhibiting the channels by physically occluding the K⁺ conduction [19], in a 1:1 stoichiometric relationship, and (ii) the gating modifier, that interacts with the S3–S4 segments of the channel in a 1:4 stoichiometry relationship and modifies the closing and opening kinetics of the channel [20,21].

We have recently found ergtoxin (ErgTx) [22,23], the first scorpion peptide capable of blocking specifically ERG channels. In this communication we describe the interaction of ErgTx with three chimeras of HERG and M-eag channels and six different point mutants involving the P-region of the HERG channel.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of chimeras and point mutants

The nomenclature for chimeras adopted in this communication was selected by using the first letter of each channel (either *H*, standing for HERG; or *M*, standing for M-eag; note the italics, which distinguish the letters from amino acid residues). Thus, *HMH* means a chimera where the upstream sequence of the gene encoding HERG channel was used, followed by a segment of the M-eag gene (here only sequences that encode the pore region of the channel) and the extending sequence to the end of the C-terminal region of the channel was again from HERG channels. Conversely, *MHM* means a construction of a chimeric gene where the N-terminal is from M-eag, the pore segment contains HERG gene sequence and the C-terminal is again from M-eag.

The cDNA for chimera *HMH* was constructed from two PCR reactions. The first amplified the pore of M-eag; a 5' end tag of HERG clone was introduced and a *Bgl*II site of M-eag 3' end was eliminated. The second PCR amplified the first product, using HERG channel as template; a *Bst*EII site of HERG clone was introduced. The PCR product (M-eag pore with 5' end of HERG) and the HERG clone into pCDNA3 were digested with *Bst*EII and *Bgl*II (a *Bgl*II site of pCDNA3 was eliminated). The final PCR product was then subcloned into the corresponding site of the HERG gene.

The encoded channel was composed of HERG sequences from the amino-terminus to residue C566, at which point it crossed over to M-eag residue I396. At M-eag residue K577, the sequence again crossed back to HERG at residue K638.

Chimeras *MHM* and *M382H* were constructed using an in vitro recombination technique as previously described by Herzberg et al. [24]. The first crossover point in the *MHM* construct occurs between M-eag residue V449 and HERG residue V611. The second crossover point occurs after HERG residue L650 to M-eag residue L498. For *M382H*, the crossover occurs between M-eag residue 382 and HERG residue M619.

*Corresponding author. Fax: (52)-73-172388.
E-mail address: possani@ibt.unam.mx (L.D. Possani).

The point mutations of HERG gene were prepared by direct mutagenesis by two step PCR reactions in which appropriate primers were used. The correct presence of mutants was verified by sequencing the products in an automatic Applied Biosystems machine.

2.2. Toxin purification

ErgTx was purified by chromatographic procedures as earlier described [23].

2.3. Channel expression in oocytes

Complementary RNAs for injection into oocytes were synthesized from the T7 promoter of linearized DNA templates at the *PvuII* site using the Mmessage Mmachine kit (Ambion, Austin, TX, USA). The oocytes were prepared following the technique described earlier [24]. In brief, female *Xenopus laevis* frogs (Nasco) were anesthetized by 15 min exposure to 0.15% of 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma). The oocytes were surgically removed from the ovary, after which the frog was closed by suturing and placed in water to allow recovery from the anesthesia. Defolliculation was performed by incubation for 1 h in 1.5 mg/ml collagenase (Sigma Type II) in Ca^{2+} -free OR2 oocyte medium with gentle agitation. Oocytes were stored in ND96 solution (in nM): 96 NaCl, 2 KCl, 1 $MgCl_2$, 1.8 $CaCl_2$, 5 HEPES buffer adjusted to pH 7.4 with NaOH and supplemented with 10 μ g/ml gentamicin) at 18°C. Oocytes were injected with 50 nl of cRNA (0.3 ng/ml) by using a microdispenser and a micropipette. Injected oocytes were incubated at 18°C for 24–48 h in ND96 medium, before analysis.

2.4. Electrophysiological recordings

Channels were expressed to a level where 0.5–5.0 μ A of current was recorded during a depolarizing step from a holding potential of –80 mV to potentials between –80 and +60 mV, and repolarizing at –100 mV. Currents were recorded using the two-electrode voltage clamp method (CA-1B high performance oocyte clamp DAGAN). Electrodes were filled with 3 M KCl, had a resistance of 0.3–1.0 M Ω . The bath solution contained (mM) 95 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 0.3 $CaCl_2$, 5 HEPES buffer adjusted to pH 7.4 with NaOH. Control records were taken prior to the addition of toxin. On the addition of toxin the perfusion medium was stopped to allow homogeneous dispersion of the toxin. In most experiments toxin was removed from the bath to demonstrate recovery.

3. Results and discussion

3.1. Specificity of ErgTx effect in oocyte expressed channels

ErgTx effects were originally reported on ERG-like currents in native neural and cardiac tissues and tissue-derived cell lines shown to express the gene encoding ERG [22]. In the present study we assessed the specificity of the ErgTx interaction by comparing its relative effects on heterologously expressed α -subunits of HERG, M-eag and M-elk channels in *Xenopus* oocytes. The aim of this study was to determine whether ErgTx was specific for ERG and to identify the region of toxin binding on the channel. Fig. 1 shows the recordings of toxin effect (left panel control, right panel after toxin application) on M-eag channels (Fig. 1A), M-elk channels (Fig. 1B) and HERG channels (Fig. 1C). The current was decreased only for the HERG channels. Fig. 1D shows the current versus voltage profile of the inhibitory effect of ErgTx in HERG channels. Inhibition was almost fully reversible as shown in the figure by the circles. A dose-response curve for the effect of ErgTx (Fig. 1E) shows a K_d value of 11.4 nM. This ErgTx sensitivity is similar to that observed for ERG-like currents in native cells and cell lines (16 nM; see [22]). The M-eag and M-elk channels (Fig. 1A,B, respectively) were not inhibited, even after application of a toxin concentration in the range of 200 nM. These experiments were repeated several times ($n=6$) with identical results. Our findings provide additional confirmation that the previously recorded native currents [22] arise from channels composed primarily of the ERG α -subunit. The high sensitivity of HERG for the ErgTx also suggested that the heterologous expression system, together with manipulation of the HERG channel structure using recombinant DNA techniques, would provide a useful means by which to identify the binding domain of ErgTx on the HERG channel.

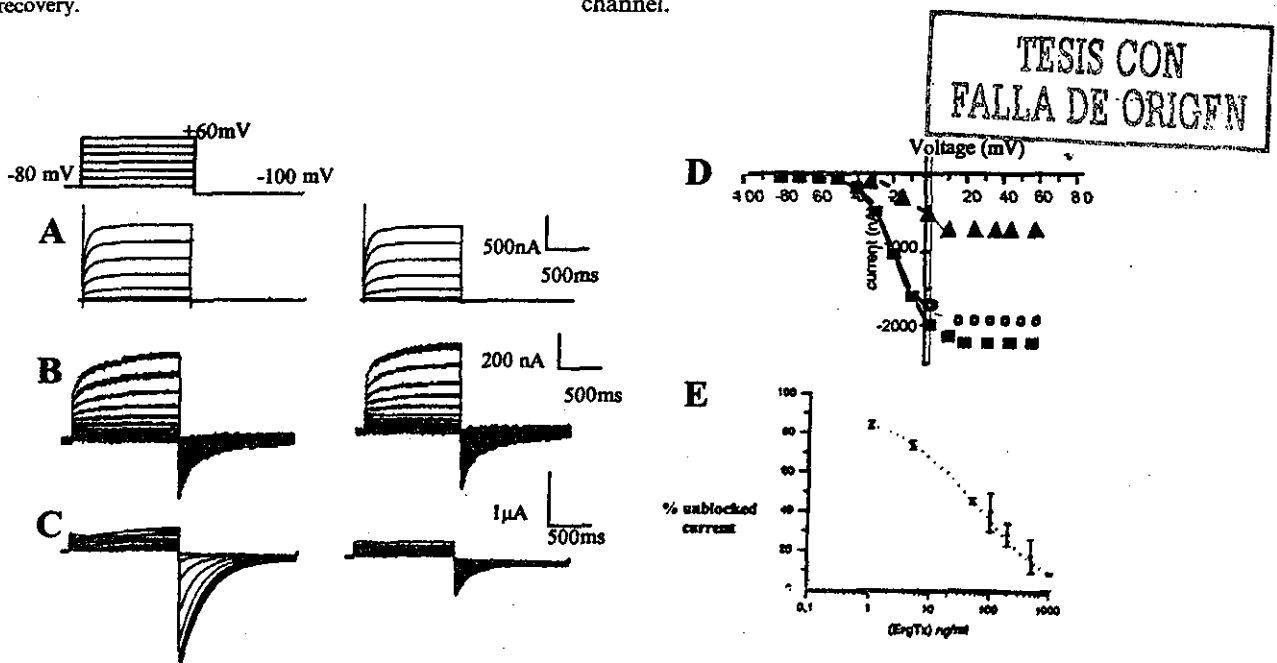
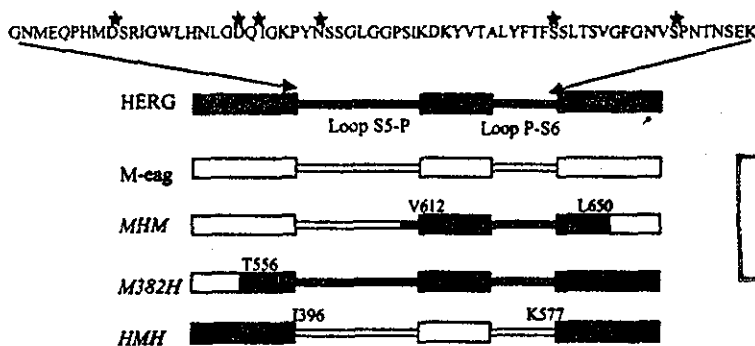


Fig. 1. Effect of ErgTx on three different K^+ channels. K^+ currents were measured in oocytes expressing: (A) M-eag, (B) M-elk and (C) HERG channels. Left panels are control recordings, right panels are in the presence of 100 nM ErgTx, from a holding potential of –80 mV to +60 mV by increments of 10 mV each, whereas the tail currents were elicited by repolarization to –100 mV. Panel D represents a current versus voltage trace of the inhibitory effect of ErgTx on HERG channels, in which the squares are control traces, triangles are in the presence of toxin and circles are the recovery of currents after washing the toxin. Panel E is a dose-response curve for ErgTx on HERG channels. The calculated IC_{50} was 50 ng/ml ($n=3$), using $(1 + ([ErgTx]/IC_{50})^P)^{-1}$, $P < 0.65$.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. Scheme showing the chimeric constructions and point mutants of HERG channels. Upper line shows the amino acid sequence of HERG channel from residue G572 to K638. The stars on top of amino acids indicate point mutations: D580A, D591A, I593R, N593Q, S620T and S631V. The subsequent lines show: (i) a schematic representation of HERG channel sequence from the S5 to S6 transmembrane regions (shaded boxes), where the arrows show the position of the amino acids from G572 to K638; (ii) the equivalent scheme for the M-eag channel (empty boxes); (iii) the chimeric M-eag-HERG-M-eag channel, where the sequence from V612 to L650 is from HERG; (iv) the M382H chimeric construction in which the N-terminal is from M-eag up to T556 and the remaining sequence is from HERG; and (v) the last chimeric is HERG sequence up to C566 and after K638, whereas the internal segment is from M-eag I396-K577.

3.2. Mapping the receptor site for ErgTx binding

We took advantage of the homology between HERG and M-eag to make chimeras and determine what regions of HERG uniquely specify ErgTx sensitivity (Fig. 2). Because previous studies have shown that other scorpion toxins bind to the pore region of voltage-gated K⁺ channels of the Kv family, we tested the hypothesis that the pore-forming region serves as the ErgTx binding site in HERG. According to this hypothesis, chimeric M-eag channels with an HERG pore should be inhibited by ErgTx. If the binding were in a different region of HERG, such as the S3-S4 loop serving as the spider hanatoxin receptor in K⁺ channels [20,21], sensitivity would be determined by the parent channel in regions outside the pore. Fig. 2 shows the chimeras schematically, with M-eag sequences in unfilled boxes and HERG sequences in filled boxes. We also tested six constructs with point mutations in the corresponding region, as indicated with asterisks.

As a model, we will refer to sub-domains of the bacterial channel KcsA pore, which have been structurally determined

[25]. Within the selectivity filter and preceding pore helix, there is a high degree of sequence similarity between KcsA, HERG and M-eag. In the upstream turret area, the sequence diverges among all three channels.

As a first test of the sensitivity of the pore region to toxin binding, we replaced the pore in HERG with the corresponding sequences of M-eag (HMH; Fig. 3). The HMH chimera is not sensitive to ErgTx. The currents were not modified in the presence of toxin. However, as it can be observed in Fig. 3C, the substitution of the pore region (M-eag into Herg) abolishes the rectification property of the channel. Fig. 3C does not show the effect of the toxin, but rather compares the behavior of the native M-eag (circles) with that of the chimera (triangles). This observation suggests that the amino acid sequence of the S5-P loop segment of HERG channel, although similar to that of M-eag in size, contains information or spatial folding that makes it different. ErgTx senses the difference between them.

To confirm that pore sequences of HERG were important

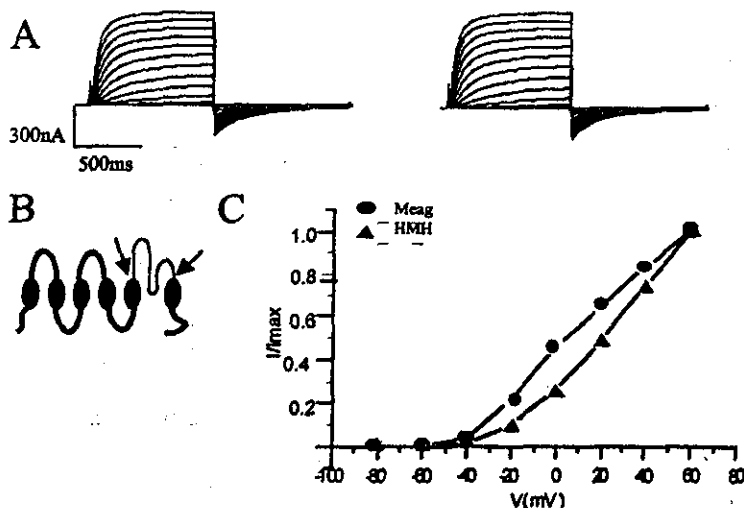


Fig. 3. Effect of ErgTx on HMH chimera. A: Left shows outward currents, under voltage clamp conditions for control recordings (similar to M-eag channel alone), and right is in the presence of 200 nM ErgTx. B: The scheme of the chimera (N-terminal and C-terminal of HERG in bold, middle section is from M-eag channels). C: Current versus voltage relationship of the outward currents of A compared with M-eag channels (circles), for n = 5.

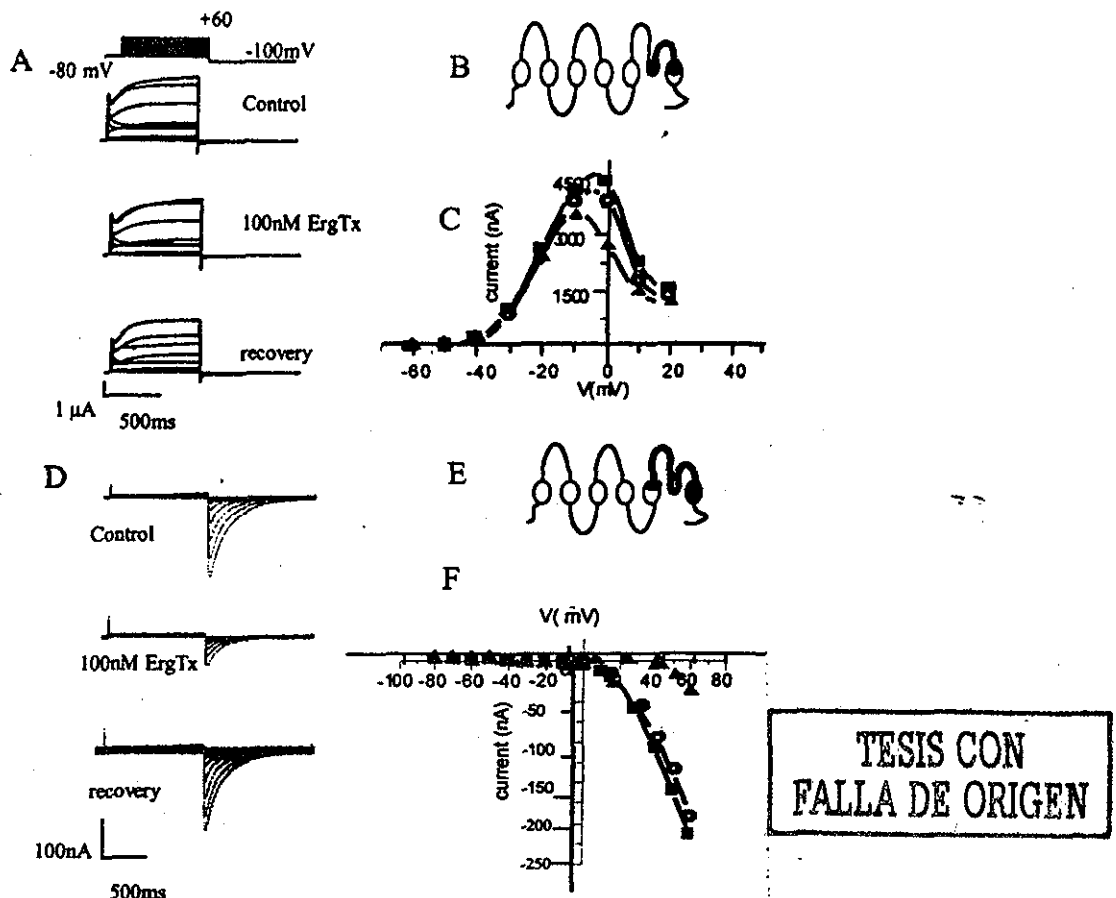


Fig. 4. Effect of ErgTx on *MHM* and *M382H* chimeras. A-C are from *MHM*, whose caricature is depicted in B (N-terminal of HERG and C-terminal from M-eag in bold), whereas D-F are from the *M382H* chimera, scheme shown in E. Panel A shows the outward currents elicited according to the protocol of Fig. 1, for control (upper recordings), after application of 100 nM ErgTx (middle) and after washing (lower, panel). Panel C shows the current versus voltage curve of the results in A, where the squares represent the control, triangles the toxin effect and the open circles the washing condition ($n=3$, $P<0.005$). D: The same situation as A, for the *M382H*, and F is the corresponding current versus voltage curve, where the squares represent the recording of the control, triangles the toxin effect and the open circles the recovery ($n=4$, $P<0.02$).

in toxin binding, we studied the chimera *MHM*, an \sim M-eag channel in which the P-region beginning between the turret and the pore helix, and extending half-way through S6, has been replaced with corresponding HERG sequences (see Section 2 and [24]). Despite possessing much of the HERG pore, *MHM* exhibited a drastically reduced sensitivity to ErgTx (Fig. 4A-C). Currents were reduced by only 15%, even at high toxin concentrations (100 nM). This chimera exhibits the rapid activation characteristic of M-eag and the rapid inactivation characteristic of HERG, resulting in a partially inactivating, large outward current intermediate between the two parental phenotypes (see also [24]). The intact inactivation indicates that the external mouth of the pore retains its normal function and suggests that the relative lack of toxin binding is not due to a general disruption of structure in that region.

Because *MHM* does not contain the entire HERG pore sequence, including the 'turret', we tested the sensitivity of the chimera *M382H*, which contains a pore composed entirely of HERG sequence. As shown in Fig. 4, *M382H* is clearly inhibited by ErgTx (Fig. 4D-F). This chimera exhibits the pronounced inward rectification characteristic of the wild-type HERG channel. The block is about 80%, using 100

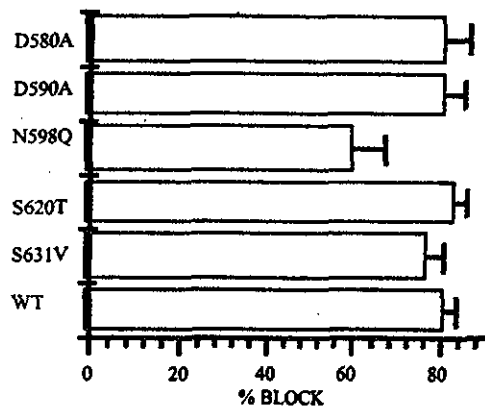


Fig. 5. Percent of blockage for the site-directed mutants. This graphic shows the percent of blockage due to the application of 100 nM ErgTx for the point mutants, shown on the left: D580A, D591A, N598Q, S620T, S631V and wild-type (WT). Error bars indicate mean (\pm S.E.M., $n=3$).

75

nM ErgTx, and it is reversible by washing. These observations strongly support a role for the HERG pore region in ErgTx block, especially in the highly divergent turret region that distinguishes HERG from M-eag, M-clk and other K⁺ channels. Moreover, they exclude a primary role for residues in the HERG S3–S4 region in toxin binding.

Finally, we tested six point mutations in this region in an attempt to identify particular amino acids that specify the binding preference of ErgTx for HERG channel (see Fig. 5). Among the mutants tested, only N598Q showed a small reduction in inhibition by the toxin, exhibiting 60% compared with 80% inhibition of wild-type channels. However, this 25% reduction of inhibition should be taken only as an indication for the need of additional point mutation studies in this segment of the channel. I593R did not express. Surprisingly, mutations that disrupt C-type inactivation (and presumably the conformation of the outer pore region), S620T and S631V, had little effect on toxin inhibition of the current. Considering that agitoxin and charybdotoxin binding are disrupted by *Shaker* mutations equivalent to S631V, our findings suggest that their mechanisms of binding are likely to differ from that of ErgTx in HERG. Perhaps this should not be surprising, as the amino acid sequence of ErgTx is quite different from the other known Kv specific toxins (42 amino acids with four disulfide bridges; see [23]). More surprising may be the insensitivity of ERG channels to other K⁺ channel toxins from scorpions, despite homology in the binding regions. One can speculate that structural differences, most notably the long sequence predicted to give rise to an unusually large turret (see review by Tseng [26]), present steric hindrance to an otherwise conserved binding site.

In conclusion, our results support the idea that ErgTx is specific for HERG channel and does not recognize other, closely related channels. It is a legitimate blocker of HERG, able to recognize the amino acid sequence between the S5–P loop region. The specific binding sites are either different from the location where other scorpion toxins bind to the Kv channels, or the structure of the S5–P loop region of HERG channel is different from that of the voltage-dependent K⁺ channels. More mutagenesis studies will be required to pinpoint the residues specifying ErgTx block.

Acknowledgements: This work was partially supported by Grants from: Howard Hughes Medical Institute 55000574, DGAPA-National Autonomous University of Mexico, IN216900 and 31691-N from

CONACyT-Mexican Government to L.D.P. and NIH Grant HL55973 (G.A.R.). L.P.L. received a scholarship from CONACyT and DGAPA for her Ph.D. studies.

References

- [1] Warmke, J.W. and Ganetzky, B. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3438–3442.
- [2] Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D. and Keating, M.T. (1995) Cell 80, 795–803.
- [3] Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E. and Keating, M.T. (1995) Cell 81, 299–307.
- [4] Trudeau, M.C., Wanke, J.W., Ganetzky, B. and Robertson, G.A. (1995) Science 269, 92–95.
- [5] Chiesa, N., Rosati, B., Arcangeli, A., Olivotto, M. and Wanke, E. (1997) J. Physiol. 501, 313–318.
- [6] Rosati, B., Marchetti, P., Crociani, O., Lecchi, M., Lupi, R., Arcangeli, A., Olivotto, M. and Wanke, E. (2000) FASEB J. 14, 2601–2610.
- [7] Roden, D.M. (1998) Am. J. Cardiol. 82, 491–571.
- [8] Mitcheson, J.S., Chen, J., Lin, M., Culbertson, C. and Sanguinetti, M.C. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12329–12333.
- [9] Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D. and Maelicke, A. (1982) Nature 296, 90–91.
- [10] MacKinnon, R. and Miller, C. (1988) J. Gen. Physiol. 91, 335–349.
- [11] Miller, C. (1995) Neuron 15, 5–10.
- [12] MacKinnon, R. and Miller, C. (1989) Science 245, 1382–1385.
- [13] Goldstein, S.A. and Miller, C. (1993) Biophys. J. 65, 1613–1619.
- [14] Stocker, M. and Miller, C. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9509–9513.
- [15] Hidalgo, P. and MacKinnon, R. (1995) Science 266, 307–310.
- [16] Krezel, A.M., Kasibhatla, C., Hidalgo, P., MacKinnon, R. and Wagner, G. (1995) Protein Sci. 4, 1478–1489.
- [17] Naranjo, D. and Miller, C. (1996) Neuron 16, 123–130.
- [18] Gross, A. (1996) Neuron 16, 399–406.
- [19] Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. and Phillips, M. (1985) Nature 313, 316–318.
- [20] Swartz, K.J. and MacKinnon, R. (1997) Neuron 18, 665–673.
- [21] Swartz, K.J. and MacKinnon, R. (1997) Neuron 18, 675–682.
- [22] Gurrola, G.B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L.D. and Wanke, E. (1999) FASEB J. 13, 953–962.
- [23] Scaloni, A., Bottiglieri, C., Ferrara, L., Corona, M., Gurrola, G.B., Batista, C., Wanke, E. and Possani, L.D. (2000) FEBS Lett. 479, 156–157.
- [24] Hezberg, I.M., Trudeau, M.C. and Robertson, G.A. (1998) J. Physiol. 511, 3–14.
- [25] Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (1998) Science 280, 69–77.
- [26] Tseng, G.N. (2001) J. Mol. Cell Cardiol. 33, 835–849.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ANEXO 2

**MAPPING THE BINDING SITE OF A HERG-SPECIFIC
PEPTIDE TOXIN (ErgTx) TO THE CHANNEL'S OUTER VESTIBULE**

Liliana Pardo-Lopez,^{1,2} Mei Zhang,¹ Jie Liu,¹ Min Jiang,¹ Lourival D. Possani,²

and Gea-Ny Tseng¹

1 Department of Physiology

Virginia Commonwealth University

Richmond, VA USA

2 Institute of Biotechnology

National Autonomous University of Mexico

Cuernavaca, Mexico

Running title: Mechanism and site of action of a HERG-specific toxin, ErgTx

Correspondence:

Gea-Ny Tseng, PhD

Department of Physiology

Virginia Commonwealth University

1101 E. Marshall Street

Richmond, VA 23298

Phone: 804-827-0811

FAX: 804-828-7382

e-mail: gtseng@hsc.vcu.edu

SUMMARY

The goals of this study are to investigate the mechanism and site of action whereby a HERG-specific scorpion peptide toxin, ErgTx, suppresses HERG current. We apply cysteine scanning mutagenesis to the S5-P and P-S6 linkers of HERG and examine the resulting changes in ErgTx potency. Data are compared with the characteristics of charybdotoxin (ChTx, or its analogs) binding to the *Shaker* channel. ErgTx binds to the outer vestibule of HERG, but may not physically occlude the pore. In contrast to ChTx/*Shaker* interaction, elevating $[K]_o$ (2 to 98 mM) does not affect ErgTx potency, and through-solution electrostatic forces only play a minor role in influencing ErgTx/HERG interaction. Cysteine mutations of 3 positions in S5-P linker (W585, G590 and I593) and 1 position in P-S6 linker (P632) induce profound changes in ErgTx binding ($\Delta\Delta G > 2$ kcal/mol). We propose that the long S5-P linker of the HERG channel forms an amphipathic α -helix that, together with the P-S6 linker, forms a hydrophobic ErgTx binding site. This study paves the way for future mutant cycle analysis of interacting residues in the ErgTx/HERG complex which, in conjunction with NMR determination of the ErgTx solution structure, will yield information about the topology of HERG's outer vestibule.

INTRODUCTION

The rapid delayed rectifier (I_{Kr}) is an important repolarizing current in many regions of the heart (1). The major subunit that forms the I_{Kr} channel in human heart is HERG (2). Inherited mutations in HERG have been identified and linked to congenital long QT syndrome (LQT2) (2,3). Furthermore, drugs that suppress I_{Kr} have been linked to 'acquired LQT' (3). These all point to the critical role played by I_{Kr} in maintaining cardiac electrical stability. Therefore, information about the structure of the I_{Kr} /HERG channel is important. Such information will help in rational drug design for agents that are useful for combating some forms of LQT syndrome (I_{Kr} /HERG agonists), or for agents with zero or low risk for inducing acquired LQT syndrome (no effects on I_{Kr} /HERG).

One of the most critical factors in determining I_{Kr} /HERG function is its C-type inactivation process. This is the basis for the 'inward rectification' property of I_{Kr} /HERG, which is important for shaping the action potentials in the heart. Inward rectification dictates that there is little or no outward I_{Kr} at positive plateau voltages (important for maintaining the plateau phase), but large outward I_{Kr} during phase 3 (ensuring efficient repolarization back to the resting membrane potential). Furthermore, the C-type inactivation process in the I_{Kr} /HERG channel appears to be intimately related to channel sensitivity to many different drugs (4-6). C-type inactivation results from conformational changes in the outer mouth region of the channel, that prevent current flow through the pore (7). Therefore, an important target for structural analysis is the outer mouth region of the I_{Kr} /HERG channel.

There is a general consensus that the outer vestibules of various K channels share a common architecture (8-10). Indeed, homology modeling of outer vestibules of mammalian voltage-gated K (Kv) channels based on the crystal structure of KcsA (9), a bacterial proton-

gated K channel, has been successful in several cases (10). However, such a strategy may not be applicable to the HERG channel. First, the C-type inactivation in the I_{Kr} /HERG channel is unique among all K channels that have this gating process: C-type inactivation in I_{Kr} /HERG is extremely fast in onset and in reversal, and is strongly voltage-dependent (11). These unique kinetic features suggest that conformational changes in the outer mouth region of HERG during membrane depolarization may be different from those of the other channels. Second, HERG has an unusually long S5-P linker (43 aa), much longer than the 14 - 18 aa S5-P linker seen in most other K_v channels, as well as the so-called 'turret' of KcsA (Fig. 1A). We have shown that mutations in the middle of HERG's S5-P linker, far away from the P (pore) loop in the 1-dimensional sequence, can have profound effects on the outer mouth properties of the channel (12). There have been no reports on similar effects of mutations in the middle of S5-P linker for other K_v channels. Thus, the S5-P linker of HERG may play a unique structural and functional role. Understanding such a role may provide answers to questions such as why the C-type inactivation in the HERG channel has such unique kinetic properties, and how C-type inactivation is related to the channel's sensitivity to various drugs.

[Fig. 1 here]

Peptide toxins have been very useful tools in structural analysis of K channels, well before the data of KscA crystal structure were available (13, 14). Many short peptide scorpion toxins (α -KTx) are available that can block various K channels with differences in specificity and potency (13-15). Many α -KTx toxins have 6 cysteines, forming 3 disulfide bridges (15). They have a well-conserved positive residue (K27 in ChTx) that serves to plug the channel pore (Fig. 1B) (16). ErgTx is purified from *Centruroides noxius* Hoffmann (GenBank accession # CnErg1). It has 42 amino acids and 4 disulfide bonds (17). Its amino acid sequence and disulfide

bond pattern are not homologous to those of representative α -KTx toxins shown in Fig. 1B. Previous work has shown that ErgTx is a potent blocker of HERG expressed in mammalian cells and native I_{K_r} in guinea pig ventricular myocytes (IC_{50} in the low nM range) (18). It does not block I_{K_s} , $I_{K,ATP}$, I_{RK1} , or EAG at 1 μ M (18). Recently, we showed that the ErgTx sensitivity may be determined by the S5-P linker of the HERG channel (19).

Due to the 4 disulfide bonds, ErgTx should have a compact and rigid structure, amenable to NMR analysis of its solution structure. Our ultimate goal is to map the ErgTx binding site on HERG and to identify amino acid pairs that interact with each other across the toxin-channel interface (20, 21). In this way, we hope to obtain a 'footprint' of the interaction surface of ErgTx on HERG, and to derive the 3-dimensional arrangement of relevant residues on the outer vestibule of this channel. This study is a first step toward that goal. We applied cysteine scanning mutagenesis, replacing all residues in the outer vestibule region of HERG by cysteine one at a time, and studied how these mutations affect ErgTx binding to the channel. We chose cysteine, instead of alanine (22) or lysine (23), for 2 reasons. First, cysteine side chain is small, hydrophobic, and usually well tolerated. Thus, it increases our chance of studying more mutant channels. Second, cysteine side chains can be specifically modified by methanethiosulfonate (MTS) reagents. This will allow us to use different strategies to estimate the distances between channel residues of interests and the toxin binding site (21, 24). Based on the data, we propose that the central region of HERG's S5-P linker forms an amphipathic α -helix that interacts with the pore of the channel to form the ErgTx binding site.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

A. ErgTx purification

Venom was purified from scorpions *Centruroides noxius* as described previously (17, 18) with minor modifications. Briefly, crude venom was dissolved in water and centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The supernatant was lyophilized and kept at -20°C until final purification. After Sephadex G-50 gel filtration, fraction II was directly applied to a semi-preparative C18 reverse phase column (Vydac, Hisperia, CA) and eluted with a linear gradient from 5% of solvent A (0.12% trifluoacetic acid in water) to 60% solvent B (0.10% trifluoacetic acid in acetonitrile) over 90 min. The component eluted at ~ 30 min was further chromatographed by high performance liquid chromatography using an analytical C18 reverse phase column. This gave a major pure component (ErgTx), whose primary structure was obtained by direct amino acid sequencing and by mass spectrometry (Fig. 1B) (17).

B. Molecular biology

HERG in a vector pGH19 was a kind gift of Dr. Gail Robertson (University of Wisconsin - Madison). We subcloned the HERG cDNA sequence (GenBank Accession # U04270) into the Kpn I/Xba I site of a vector, pAlterMax, that was required for the oligonucleotide-directed mutagenesis procedure with a commercial kit (Altered Site II in vitro Mutagenesis System, Promega). Cysteine substitution mutations were confirmed by direct DNA sequencing around the mutation sites. In most cases, 2 separate colonies from each mutant were used for cRNA transcription and oocyte expression. No differences were seen in the phenotype of channels translated from the 2 cRNAs. For transcription, wild-type (WT) and mutant HERG sequences in the pAlterMax vector were linearized with Not I and transcribed using the T7 RNA polymerase and a commercial kit (Mmessage Mmachine, Ambion, TX). All cRNA samples were quantified by denaturing RNA gels using densitometry (ChemImager model 4400, α -Innotech Corp).

C. Oocyte preparation and injection

Oocyte isolation and cRNA injection were as described previously (25). Briefly, stage V oocytes were isolated from follicular cell layer after mild collagenase digestion, and injected with cRNA solution using a Drummond digital microdispenser. The injection volume was ~40 nl/oocyte, equivalent to cRNA of 12-18 ng/oocyte.

D. Electrophysiological experiments

Three to 5 days after cRNA injection, channel function was studied using the two-microelectrode voltage clamp method as previously described (26). During recordings, oocytes were superfused with a low-Cl ND96 solution at room temperature. For experiments shown in Fig. 5, oocytes were not superfused but were placed in the bath solution of a fixed volume (1 ml). ErgTx was dissolved in sterile BSA (0.1 mg/ml) solution at 2 μ M, and frozen in small aliquots. An aliquot was thawed and used for experiments in < 2 days without refreezing. After control data were obtained, 5 μ l of the ErgTx stock solution was added to the bath solution (1 ml) to reach a final concentration of 10 nM. Repetitive pipeting was needed to ensure complete equilibration of ErgTx in the bath solution. Toxin effects were evaluated when a steady-state was reached (4-10 min). Voltage clamp protocol generation and data acquisition were controlled by pClamp 5.5 (Axon Instruments). Data analysis was performed with pClamp 6 or 8, Excel (Microsoft), and PeakFit (Jandel Scientific). Specific protocols and methods of data analysis are described in the figure legends. Where appropriate, data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with 1-way ANOVA, followed by Dunn's test (SigmaStat 2.0, SPSS).

RESULTS

A. Effects of mutations in the extracellular linkers suggest a unique outer vestibule structure in the HERG channel

Fig. 2A, panels a and c, show the hallmark of wild-type (WT) HERG currents: strong inward rectification due to rapid onset and reversal of C-type inactivation in a voltage-dependent manner. A depolarization pulse to +60 mV elicited little outward current because of C-type inactivation. Subsequent repolarization to +40 to -60 mV induced outward tail currents with a distinct rising phase (recovery from C-type inactivation). This led to a prominent negative slope in the tail I-V relationship (+60 to -60 mV, Fig. 2Ac). At more negative voltages, tail currents became less outward and reversed at -100 mV (reversal potential or E_{rev}), close to the Nernst K equilibrium potential ($E_K \sim -105$ mV in 2 mM $[K]_o$).

Replacing histidine at position 587 to lysine (H587K, Fig. 2 top), disrupted both the C-type inactivation process and the K selectivity of the pore. Current traces from H587K were elicited by the same voltage clamp protocol as that used for WT HERG (Fig. 2Ab). The step to +60 mV induced a prominent outward current. Subsequent repolarization steps elicited smaller outward currents that reversed between -10 and -20 mV. The I-V relationship of H587K was almost linear in the voltage range between -140 and 0 mV, with an upward turn at more positive voltages (Fig. 2Ac). Therefore, the C-type inactivation process was disrupted in H587K. Furthermore, removing extracellular Na^+ ions shifted the E_{rev} of H587K in the negative direction to about -60 mV (Fig. 2Ad), indicating that external Na^+ ions contributed significantly to currents through the H587K channel pore. The calculated K to Na permeability ratio ($P_K:P_{Na}$) for H587K was 1.5 ± 0.1 , much lower than that of the WT HERG (191 ± 91). These changes in H587K were not due to the added permanent positive charge, because increasing the protonation of

H587 in WT HERG (by changing the extracellular pH from 8.5 to 6.5) did not affect the C-type inactivation process or the K:Na selectivity of the pore (27). Furthermore, replacing H587 with proline creates the same phenotype as H587K (12). These observations indicate that the extracellular S5-P linker of HERG, or at least the middle of this linker including position 587, participates in conformational changes that determine the channel's outer mouth properties. There has been no report on similar effects of mutations made in the S5-P linker of the Shaker channel on the channel's outer mouth properties.

Fig. 2B illustrates another example of differences between HERG and Shaker in their outer mouth properties. Position 449 in the Shaker channel is located at the external entrance to the pore, corresponding to position 631 of the HERG channel (Fig. 1A). It is an important determinant of channel sensitivity to external TEA (28). Replacing the threonine residue at this position with an aromatic residue (T449Y and T449F) greatly enhances TEA binding (due to a stabilizing interaction between positively charged TEA and π -electrons of the aromatic ring at 449), while replacing T449 with a positively charged residue (T449K) has the opposite effect (due to electrostatic repulsion) (28). We tested the effects of mutating the equivalent residue in the HERG channel (S631) on TEA potency (29). TEA blocked the outer mouth of the WT HERG channel with an $IC_{50} \sim 50$ mM. This is reflected by the decrease of outward tail current at -80 mV in Fig. 2Ba. The appearance of a prominent outward peak and the higher level of outward current at +20 mV in the presence of TEA was due to an interference of C-type inactivation by TEA bound to the outer mouth of the channel (7). Surprisingly, replacing S631 with an aromatic residue (S631Y) reduced the sensitivity to external TEA (Fig. 2Bb). Furthermore, replacing S631 with a negatively charged residue (S631E) or a positively charged residue (S631K) reduced the sensitivity to TEA. There is no difference in TEA sensitivity

between these two mutants. These data suggest that the outer mouth configuration in the HERG channel differs significantly from that of the Shaker channel, so that side chain at position 631 is shielded from bound TEA.

[Fig. 2 here]

B. ErgTx selectivity

Fig. 3 shows that ErgTx potently suppressed the HERG current amplitude. The suppressing effect could be detected at 1 nM ErgTx. However, ErgTx did not affect Kv1.4, Kv4.3, Kv2.1 or KvLQT1 even at 50 nM. This apparent selectivity, by itself, is not conclusive evidence for a unique outer vestibule structure in the HERG channel among the K channels examined here. Therefore, we further investigated the mechanism by which ErgTx suppresses HERG current, and positions in HERG that are important for ErgTx binding. These features are compared with those of ChTx (or its analogs) blockade of the Shaker (or Shaker-like) channel. In the latter cases, the mechanism and site of action of the toxins have been well characterized (16, 22-24). Such a comparison will help us deduce how and where ErgTx binds to the HERG channel and reduces the current.

[Fig. 3 here]

C. Concentration-dependence of ErgTx suppression of HERG.

Fig. 4A illustrates a representative time course of changes in HERG current amplitude when the oocyte was exposed to increasing concentrations of ErgTx (1 to 100 nM), and after wash out of the toxin. Currents were elicited by repetitive depolarization pulses from V_h -80 to +20 mV for 1 s applied once every minute. The peak tail current amplitudes before ErgTx application (I_c) and that at the steady-state of ErgTx effect (I_{ix}) were used to measure the fraction

of unblocked channels (I_{tx}/I_c). ErgTx suppressed HERG current in a concentration-dependent manner. The effect was totally reversible. The data points can be well fit with equation [1]:

$$I_{tx}/I_c = A_{max}/(1+[ErgTx]/K_d)+(1-A_{max}) \quad [1]$$

where A_{max} is the fraction of current sensitive to ErgTx ($93\pm 3\%$), and K_d is the dissociation constant (6.45 ± 1.03 nM).

It is important to note that there is a residual current (on average $\sim 10\%$ of control) not suppressed by high concentrations of ErgTx. This is clearly shown in Fig. 4A: increasing [ErgTx] from 50 to 100 nM induced little further suppression of the current. In the presence of 100 nM ErgTx, the current's waveform resembled that of the control current (showing C-type inactivation and a high K selectivity, trace 'd' of Fig. 4A). Therefore, this can not be due to an ErgTx-insensitive background or 'leak' conductance. Instead, it suggests that ErgTx did not totally occlude the HERG pore. This is different from ChTx blockade of the Shaker channel: K27 of ChTx binds and plugs the channel pore completely (22, 23). The difference between ErgTx suppression of HERG and ChTx blockade of Shaker is consistent with the lack of a 'K27-equivalent' in the ErgTx sequence (Fig. 1B).

[Fig. 4 here]

D. Lack of $[K]_o$ sensitivity in ErgTx/HERG interaction

Fig. 4B also shows that ErgTx potency was not affected by elevating $[K]_o$ from 2 to 98 mM. This is distinctly different from the situation of ChTx blockade of the Shaker channel. In this case, K27 of ChTx is critical for K_o sensitivity (16, 22). It is suggested that K27 of ChTx plugs the K channel pore by binding to a site close to K^+ binding site within the pore (16, 22). Elevating $[K]_o$ increases K^+ occupancy inside the pore, and the resulting electrostatic repulsion between K^+ ions and K27 of ChTx destabilizes toxin binding. The lack of K_o sensitivity in ErgTx

suppression of HERG is again consistent with the lack of a 'K27-equivalent' residue in ErgTx, and with the suggestion that ErgTx does not physically plug the HERG pore.

E. Cysteine scanning mutagenesis detects positions critical for ErgTx binding to HERG

Studies of toxin binding to K channels have implicated the S5-P linker (turret of KcsA, Fig. 1A) and P-S6 linker as important components of toxin binding site (23, 24). Therefore, we performed cysteine scanning mutagenesis by replacing all residues in the S5-P linker (positions 571-613, 43 residues) and the P-S6 linker (position 631 to 638, 8 positions) of HERG with cysteine one at a time, and studied the resulting effects on current suppression by ErgTx.

Out of 51 positions mutated, 6 mutants were poorly or not expressed (N573C, K595C, P605C, N633C, E637C, and K638C). Of the remaining 45 mutants, the ErgTx potency was evaluated in 98 mM $[K]_o$ using the same voltage clamp protocol as shown in Fig. 4A. One ErgTx concentration (10 nM) was used in all measurements, and the K_d values were calculated using the following modified equation [1]:

$$I_{tx}/I_c = 0.9/(1+[ErgTx]/K_d) + 0.1 \quad [1]$$

The assumption is that the maximal effects in all cases were a 90% suppression (Fig. 4). This is valid because WT HERG has an IC_{50} of 7.2 ± 1.1 nM when estimated using equation [1] based on data obtained with 10 nM ErgTx, very close to the IC_{50} determined from the complete concentration-response relationship (6.5 ± 1.0 nM, Fig. 4).

The data are summarized in Fig. 5. Most mutants (30 out of 45) showed little or no change in ErgTx binding (changes in binding free energy, $\Delta\Delta G$, less than 0.5 kcal/mol). Of the remaining 15 mutants, 3 in the S5-P linker (W585C, G590C, and I593C), and 1 in the P-S6 linker (P632C) caused outstanding changes in the binding free energy (> 2 kcal/mol). For the

remaining 11 mutants, the changes in binding free energy were modest although statistically significant (0.5 - 1 kcal/mol).

Fig. 5, top, shows a sequence alignment between Shaker and HERG in the outer vestibule region. We compare the positions known to be important for ChTx (or its analog) binding to Shaker or Shaker-like channels (20, 22-24, 30, 31), with those important for ErgTx binding to HERG. There are two differences. First, in the Shaker channel, the positions important for ChTx binding cluster close to the P-loop. In the HERG channel, the positions in the S5-P linker important for ErgTx binding are farther away from the P-loop. Second, charge neutralization in the Shaker channel can have profound effects on ChTx binding (32). However, this is not the case for ErgTx binding to HERG. Therefore, neutralizing positively charged residues in the S5-P linker (R582C, K608C, and K610C) did not enhance ErgTx binding, and neutralizing negatively charged residues here (E575C, D580C, D591C, D609C) had little or only modest effects. Residues that are critical for ErgTx/HERG interaction are all uncharged. Another important point is that the three positions in the S5-P linker (W585, G590 and I593) all fall within the putative amphipathic α -helix (boxed in both the HERG sequence and the abscissa of Fig. 5). The implications of these findings will be addressed in *Discussion*.

[Fig. 5 here]

F. Do cysteine mutations disrupt ErgTx binding by inducing global changes in the HERG's outer vestibule?

Some of the cysteine mutations caused a disruption of the C-type inactivation process and the K^+ selectivity of the pore, similar to the phenotype of H587K shown in Fig. 2A. One such example is shown in Fig. 6B. G590C did not C-type inactivate or select K^+ over Na^+ ($E_{rev} - 15$ mV) (left of Fig. 6B). It could not be suppressed by 10 (or even 100) nM ErgTx (Fig. 6B, right).

This is in sharp contrast to the behavior of WT HERG, that showed a strong C-type inactivation and K:Na selectivity (Fig. 6A, left), and was strongly suppressed by ErgTx (10 nM suppressed current by > 50%, Fig. 6A, right). These observations call into question whether the changes in ErgTx binding resulted from global changes in the outer vestibule conformation. Fig. 6C and 6D suggest that this is not the case. While D591C could not C-type inactivate or select K⁺ over Na⁺ ions (E_{rev} -20 mV), it retained a high ErgTx sensitivity (Fig. 6C). On the other hand, Q592C retained C-type inactivation and a high K:Na selectivity (E_{rev} -100 mV), but had a significantly lowered ErgTx sensitivity than WT (Fig. 6D).

[Fig. 6 here]

G. ErgTx binds to the outer mouth of HERG and electrostatic forces are involved in toxin binding

We suggested above that ErgTx does not plug the HERG channel pore, as is the case for ChTx blockade of the Shaker channel. This, in conjunction with the pattern of positions involved in ErgTx binding to HERG, raises the following question: does ErgTx suppress HERG current by binding to the outer mouth region and hindering current flow through the pore, or by binding away from the pore and modifying other channel function, such as gating? In Shaker or Shaker-like channels, the external TEA binding site overlaps with that of α -KTx (16). Therefore, TEA binding and α -KTx binding are mutually exclusive. Fig. 7A shows that application of 50 mM TEA (\sim IC₅₀, Fig. 2B) reduced the degree of WT HERG current suppression by ErgTx markedly ($p < 0.001$). This observation supports an outer mouth binding site for ErgTx.

Do electrostatic forces play any role in ErgTx binding to the HERG channel? ErgTx has a pI of 7.88, and carries < 2 positive charges at pH 7. Fig. 5 further shows that positions in the HERG channel important for ErgTx binding are all uncharged. Charge neutralization in the

neighboring region had modest or no effect on ErgTx binding. To explore whether electrostatic forces play any role in ErgTx/HERG interaction, we altered the net charge on ErgTx by changing the extracellular solution pH from 7.5 to 8.5 or to 6.5, and examined the resulting changes in toxin potency. Fig. 7B shows that for WT HERG, changing pH_o from 7.5 to 8.5 reduced ErgTx potency. This suggests that net negative charges on ErgTx hindered ErgTx/HERG binding. Shifting pH_o from 7.5 to 6.5 did not affect ErgTx binding to WT HERG. However, removing either of the two histidines in the S5-P linker (H578C or H587C) made ErgTx more potent at pH_o 6.5. This indicates that protonation of these histidine residues in the WT HERG channel negated the increased binding affinity of positively charged ErgTx at pH_o 6.5 (probably by increasing the protonation of H29 of ErgTx, Fig. 1B). On the other hand, putting a permanent positive charge at position 578 (H578K) reduced ErgTx potency at pH_o 6.5 and 7.5 (when ErgTx should be positively charged), but not at pH_o 8.5 (when ErgTx should be negatively charged). This is consistent with an electrostatic repulsion between positive charge at 578 and positive charge on ErgTx at the lower pH_o range that hindered toxin binding. Therefore, ErgTx/HERG interaction can be influenced by electrostatic forces. However, the degree of influence is much less for ErgTx/HERG binding than for ChTx/Shaker binding (32).

[Fig. 7 here]

H. Voltage-sensitivity of ErgTx binding to the HERG channel

Binding of ChTx to the Shaker channel is voltage-sensitive: membrane depolarization destabilizes ChTx binding (16). This voltage sensitivity is exclusively mediated by K27 of ChTx (16). Although ErgTx does not have a 'K27-equivalent', previous work has shown that depolarization also reduces ErgTx binding to the HERG channel (18). It was suggested that this is due to the C-type inactivation process of the HERG channel at depolarized voltages, which

reduces ErgTx binding. We have confirmed this finding (Fig. 8) and further explored the mechanism. Fig. 8B summarizes the data and compares it to the voltage dependence of HERG activation. The steep slope of I_{Tx}/I_c data points in the voltage range of -40 to 0 mV coincides with the voltage range of a steep increase in channel activation. This suggests that HERG channel activation hinders or destabilizes ErgTx binding. However, stronger depolarization at the plateau of the activation curve (> 0 mV) further reduced ErgTx binding, although the slope was less steep than in the negative voltage range. This decrease in ErgTx binding was not related to C-type inactivation, because in a mutant that did not C-type inactivate but maintained a high ErgTx sensitivity (G572C) membrane depolarization still reduced toxin potency in this voltage range (data not shown). The decrease in ErgTx binding could not be due to an increase in K^+ ion efflux, because strong depolarization reduced outward current due to C-type inactivation (Fig. 8A). Finally, this could not be due to effects of voltage on the binding of a charged ErgTx molecule within the transmembrane electrical field. As shown in Fig. 8B, the voltage effect was more prominent at pH_o 8.5 than at pH_o 6.5 ('effective valence' of voltage-sensing domain 0.36 and 0.2 at pH_o 8.5 and 6.5, respectively). This is opposite to the expected effect (e.g. ErgTx should be negatively charged at pH_o 8.5 and thus membrane depolarization should enhance ErgTx binding).

[Fig. 8 here]

DISCUSSION

Our data suggest that ErgTx binds to the HERG channel with a 1:1 stoichiometry, leading to a suppression of current through the channel pore. Cysteine scanning mutagenesis experiments suggest that 3 positions in the S5-P linker (W585, G590, and I593) and 1 position in the P-S6 linker (P632) are critical determinants of ErgTx binding. Below we compare the behavior of

ErgTx binding to the HERG channel with that of ChTx (or an analog) binding to the Shaker or Shaker-like channels. Based on the comparison and what is known about the mechanism and site of action of ChTx, we further deduce the mechanism by which ErgTx suppresses HERG currents and the possible location of ErgTx receptor site on the HERG channel.

There are some apparent similarities in the behavior of binding of ErgTx and ChTx to their target channels:

(1) TEA, an outer mouth blocker, can antagonize toxin binding in both cases. This supports the notion that ErgTx binds to the outer mouth of HERG, and the binding site overlaps with that of TEA.

(2) Electrostatic forces are involved in toxin binding in both cases, although to different degrees.

In the case of ChTx binding to the Shaker channel, electrostatic forces play a major role in toxin binding and pore blockade. ChTx has a pI value of 9.03, and carries ~ 6 positive charges at pH 7. Negative charges around the receptor site help orient the toxin in binding to the receptor (32). Furthermore, the lysine at position 27 of ChTx (K27) binds within the pore and occludes current through the channel (16, 22). The pH_o experiments shown in Fig. 7B suggest that charge-charge interactions also matter in ErgTx binding to the HERG channel. However, such charge-charge interactions are not a major factor in ErgTx binding to HERG. This is not surprising because ErgTx has a pI value of 7.88 and carries less than 2 positive charges at pH 7. Furthermore, ErgTx does not have a positive charge equivalent to K27 in ChTx.

(3) Membrane depolarization reduces toxin binding in both cases, but likely by different mechanisms. Membrane depolarization destabilizes ChTx binding by 2 mechanisms, both of which are mediated by K27. First, depolarization enhances K^+ ion occupancy inside the pore by promoting K^+ ion efflux. This can dislodge ChTx bound to the pore through electrostatic

repulsion between K^+ ions and K27. Second, K27 of bound ChTx senses $\sim 20\%$ of the transmembrane electrical field. Therefore, membrane depolarization can have a direct effect on K27 and thus ChTx binding. ErgTx does not have a K27-equivalent. Furthermore, our data in Fig. 8 show that the destabilization effect of membrane depolarization was more pronounced at pH_0 8.5 (ErgTx negatively charged) than at pH_0 6.5 (ErgTx positively charged). This observation rules out the possibility that membrane depolarization destabilizes ErgTx binding by a direct effect on a charged ErgTx molecule bound within the transmembrane electrical field. We propose that conformational changes in the S5-P linker during strong membrane depolarization hinder or destabilize ErgTx binding.

There are distinct differences in the behavior of toxin/channel interactions:

- (1) Elevating $[K]_0$ destabilizes ChTx binding to Shaker (16, 22), but does not affect ErgTx binding to HERG. The effect of changing $[K]_0$ on ChTx/Shaker interaction is exclusively mediated by K27 (16, 22). The insensitivity of ErgTx/HERG interaction to elevating $[K]_0$ is consistent with the notion that ErgTx does not have a K27-equivalent.
- (2) The pattern of positions important for toxin-channel interaction differs between the two (Fig. 5, top). Positions important for ChTx binding to the Shaker channel are those flanking the pore loop, with positions farther away from the pore loop having decreasing importance in influencing toxin binding (22, 23). For ErgTx/HERG, the positions in S5-P linker important for toxin binding are far away from the pore loop in 1-dimensional sequence. Charge mutations in Shaker have marked effects on ChTx binding (31, 32), but little or no effects on ErgTx binding to the HERG channel.

What can we conclude about the mechanism by which ErgTx suppresses the HERG current? We can conclude that ErgTx binds to the outer vestibule of HERG, but it probably does

not plug the pore with a positive charge as is the case for K27 in ChTx. The maximal effect of ErgTx is ~90% suppression of the HERG current, not 100%. Again, this is consistent with the notion that ErgTx is not a 'molecular plug' of the HERG pore. This situation is similar to δ -dendrotoxin (δ -DTx) suppression of ShaKv1.1: δ -DTx does not physically plug the pore but binds in an 'off-center' position in the outer vestibule. This leads to a reduction, but not a total occlusion, of current through the pore (33).

What can we learn about the ErgTx receptor site on the HERG channel? The cysteine scanning mutagenesis data suggest that S5-P and P-S6 linkers are both involved. Although these two domains are not contiguous in 1-dimensional sequence, in 3-dimensional space, the long (43 aa) S5-P linker of HERG may come close to the P-S6 linker and thus to the channel pore. Our working hypothesis is illustrated by the cartoon in Fig. 9A. An analysis of possible secondary structures in the S5-P linker using the program, *Protean*, in *LaserGene* (34) suggests that positions 583 - 594 may form an amphipathic α -helix. The helical wheel plot in Fig. 9B shows that hydrophobic residues in this region cluster to one face of the α -helix, among which W585, G590 and I593 may form contact points with bound ErgTx. The other face of the α -helix has mainly hydrophilic residues. This face of the α -helix is not involved in ErgTx binding, because neutralizing the negative charge here, D591C, has no effects on toxin binding (Fig.5 & 6).

In summary, we show that the long S5-P linker of the HERG channel contributes importantly to the outer mouth properties of this channel, supporting the conclusion from a previous report (19). We propose that this linker can engage in intimate interactions with the pore's entryway, and participates in conformational changes important for the C-type inactivation process and for K:Na selectivity of the pore. Future work will be focused on identifying toxin and channel residues interacting across the toxin-channel interface. This, in conjunction ErgTx's

solution structure obtained by the NMR technique, will yield a 3-dimensional structure of the outer vestibule of the HERG channel.

[Fig. 9 here]

REFERENCES

1. Tseng, G.-N. (2001) *J Mol Cell Cardiol* **33**, 835-849
2. Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M. T. (1995) *Cell*, **81**, 299-307
3. Roden, D. M. and Balsler, J. R. (1999) *Cardiov Res* **44**, 242-246
4. Ficker, E., Jarolimek, W., Kiehn, J., Baumann, A., and Brown, A. M. (1998) *Circ Res* **82**, 386-395
5. Wang, S., Morales, M. J., Liu, S., Strauss, H. C., and Rasmusson, R. L. (1997) *FEBS Letters* **417**, 43-47
6. Numaguchi, H., Mullins, F. M., Johnson, J. P. J., Johns, D. C., Po, S. S., Yang, I. C. H., Tomaselli, G. F., and Balsler, J. R. (2000) *Circ Res* **87**, 1012-1018
7. Smith, P. L., Baukowitz, T., and Yellen, G. (1996) *Nature* **379**, 833-836
8. MacKinnon, R., Reinhart, P. H., and White, M. M. (1988) *Neuron* **1**, 997-1001
9. Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69-77
10. Rauer, H., Lanigan, M. D., Pennington, M. W., Aiyar, J., Ghanshani, S., Cahalan, M. D., Norton, R. S., and Chandy, K. G. (2000) *J Biol Chem* **275**, 1201-1208
11. Spector, P. S., Curran, M. E., Zou, A., Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C. (1996) *J Gen Physiol* **107**, 611-619
12. Dun, W., Jiang, M., and Tseng, G.-N. (1999) *Pflugers Archiv* **439**, 141-149

13. Possani, L. D., Selisko, B., and Gurrola, G. B. (1999) *Perspectives in Drug Discovery and Design* **15/16**, 15-40
14. Garcia, M. L., Gao, Y.-D., McManus, O. B., and Kaczorowski, G. J. (2001) *Toxicol* **39**, 739-748
15. Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M.-F., van der Walt, J. J., and Possani, L. D. (1999) *Trends in Pharmacological Sciences* **20**, 444-447
16. Goldstein, S. A. N. and Miller, C. (1993) *Biophys J* **65**, 1613-1619
17. Scaloni, A., Bottiglieri, C., Ferrara, L., Corona, M., Gurrola, G. B., Batista, C., Wanke, E., and Possani, L. D. (2000) *FEBS Lett* **479**, 155-157
18. Gurrola, G. B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L. D., and Wanke, E. (1999) *FASEB J* **13**, 953-962
19. Pardo-Lopez, L., Garcia-Valdes, J., Gurrola, G. B., Robertson, G. A., and Possani, L. D. (2002) *FEBS Lett* **510**, 45-49
20. Hidalgo, P. and MacKinnon, R. (1995) *Science* **268**, 307-310
21. Stocker, M. and Miller, C. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 9509-9513
22. Ranganathan, R., Lewis, J. H., and MacKinnon, R. (1996) *Neuron* **16**, 131-139
23. Goldstein, S. A. N., Pheasant, D. J., and Miller, C. (1994) *Neuron* **12**, 1377-1388
24. Gross, A. and MacKinnon, R. (1996) *Neuron* **16**, 399-406
25. Tseng-Crank, J. C. L., Tseng, G.-N., Schwartz, A., and Tanouye, M. A. (1990) *FEBS Lett* **268**, 63-68
26. Schreibmayer, W., Lester, H. A., and Dascal, N. (1994) *Pflugers Archiv* **426**, 453-458
27. Jiang, M., Dun, W., and Tseng, G.-N. (1999) *Am J Physiol* **277**, H1283-H1292
28. Heginbotham, L. and MacKinnon, R. (1992) *Neuron* **8**, 483-491

29. Fan, J.-S., Jiang, M., Dun, W., McDonald, T. V., and Tseng, G.-N. (1999) *Biophys J* **76**, 3128-3140
30. Naranjo, D. and Miller, C. (1996) *Neuron* **16**, 123-130
31. MacKinnon, R., Heginbotham, L., and Abramson, T. (1990) *Neuron* **5**, 767-771
32. MacKinnon, R. and Miller, C. (1989) *Science* **245**, 1382-1385
33. Imredy, J. P. and MacKinnon, R. (2000) *J Mol Biol* **296**, 1283-1294
34. Eisenberg, D., Weiss, R. M., and Terwilliger, T. C. (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 140-144

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 (A) Alignment of amino acid sequences in the outer vestibule region of representative K channels with that of HERG. End of S5, P-loop and beginning of S6 are underlined; S5-P linker (corresponding to the 'turret' of KcsA) and P-S6 linker are marked. Shaded residues signify the 'GXG' motif of K channel signature sequence. Note that compared to the lengths of S5-P linker in these representative K channels (14 or 18 residues), the S5-P linker in HERG is much longer (43 residues). A putative amphipathic α -helix (positions 583 - 595) is shown as an insert. Positions in HERG examined in this study are those from 571 to 613 and from 631 to 638 (numbers marked on top). **(B)** Alignment of amino acid sequences of representative α -KTx with that of ErgTx. Abbreviations are: charybdotoxin (ChTx or α -KTx1.1), noxiustoxin (Ntx or α -KTx2.1), and agiotoxin 2 (AgTx2 or α -KTx3.2). Cysteines are boxed and connected to illustrate disulfide bridges. The well-conserved lysine residues in α -KTx (K27 in ChTx) crucial for the pore blockade activity are highlighted by the shaded area. The histidine (H29) in ErgTx is also

highlighted. In both panels, alignment was performed using the Clustal V method. Gaps (.) are inserted to enhance alignment.

Fig. 2 Effects of mutations in the S5-P and P-S6 linkers on outer mouth properties of HERG and on TEA blockade. *Top*: Partial HERG amino acid sequence. Positions examined here (587 and 631) are marked. **(A)** Replacing H587 with lysine (H587K) destroys C-type inactivation and K selectivity. Panels **a** and **b** depict current traces of WT and H587K HERG channels elicited by the voltage clamp protocol shown on top. Panel **c** shows the complete tail I-V relationships for WT and H587K ($n = 15$ and 6). Panel **d** shows that removing extracellular Na^+ ions shifts the reversal potential (E_{rev}) of H587K from -15 to -60 mV. *Inset*: H587K current traces before and after Na^+ removal ($V_r -60$ mV). **(B)** Replacing S631 with tyrosine (S631Y), glutamate (S631E) or lysine (S631K) reduces HERG sensitivity to extracellular TEA. Panels **a - d** show current traces elicited by the voltage clamp protocol depicted on top before (thin traces) and after (thick traces) adding TEA 50 mM to the bath solution (with equimolar $[\text{Na}]_o$ reduction). The channel types are marked. Panel **e** summarizes the fractions of current not suppressed by TEA_o (I_{TEA}/I_C , ratio of peak tail current amplitudes in the presence and absence of TEA). Numbers of measurements are shown in parentheses. Experiments were conducted in 2 mM $[\text{K}]_o$.

Fig. 3 Selectivity of ErgTx blockade of K channels. Shown are time courses of changes in current amplitude recorded from oocytes expressing different K channel subunits before and after exposure to various concentrations of ErgTx (denoted by different symbols, shown on top right). Current amplitudes were normalized by that of the first current. Shown in the inset of each panel are two current traces recorded in the absence (thin trace) and presence (thick trace) of 20

nM ErgTx. The following recording conditions and pulse protocols were used: WT HERG, 98 mM $[K]_o$, tail current at -80 mV after a 1-s pulse to +20 mV; Kv1.4 and Kv4.3, 2 mM $[K]_o$, peak test pulse current at +60 mV; Kv2.1 and KvLQT1, 2 mM $[K]_o$, current at the end of 1-s test pulse to +20 mV. The following are species and sources of the K channel subunit clones used: Kv1.4, rat, from Dr. J. Tseng-Crank (Eli Lilly); Kv4.3, rat, from Dr. P. Serodio (Columbia University); Kv2.1, rat, from Dr. R. H. Joho (University of Texas Southwestern Medical Center); KvLQT1, human, from Dr. M. C. Sanguinetti (University of Utah).

Fig. 4 ErgTx suppresses WT HERG current amplitude in a dose-dependent and reversible manner, and elevating $[K]_o$ from 2 to 98 mM does not affect toxin binding. **(A)** Time course of a representative experiment in 2 mM $[K]_o$. Currents were elicited using the pulse protocol shown in the inset, applied once per minute. Peak tail current amplitudes were measured and normalized by the control current amplitude just prior to ErgTx application, and plotted against time of recording. The ErgTx concentrations are marked. The dotted line connecting data points before and after ErgTx exposure is the sloping baseline used for estimating current suppression. Selected current traces are shown above the time course, marked by letters 'a' - 'e' corresponding to those shown along the time course. **(B)** Dose-response relationship of ErgTx suppression of WT HERG. The fraction of remaining current at the steady-state of ErgTx blockade (I_{tx}/I_c) is plotted against ErgTx concentration on a logarithmic scale. Data are averaged from experiments done in 2 mM $[K]_o$ (open circles, with SE bars, $n = 4$) or in 98 mM $[K]_o$ (open square with SE bar, 10 nM ErgTx, $n = 6$). Individual measurements in 98 mM $[K]_o$ at various ErgTx concentrations are shown as smaller symbols (3 experiments, represented by different symbols). Data points obtained in 2 mM $[K]_o$ are fit with equation [1]:

$$I_{tx}/I_c = A_{max}/(1+[ErgTx]/K_d)+(1-A_{max}) \quad [1]$$

where A_{max} is the fraction of current sensitive to ErgTx and K_d is the dissociation constant. The curve superimposed on the data points is calculated with equation [1] using the best-fit parameter values listed in the inset.

Fig. 5 Effects of cysteine substitutions in the S5-P and P-S6 linkers of HERG on the potency of ErgTx blockade. In all cases (except WT) the oocytes were treated with DTT (5 mM, 0.25 - 4 hr) before recordings. Recordings were conducted in 98 mM $[K]_o$. Channels were activated by 1-s depolarization pulses to +20 mV applied once every min, and peak amplitudes of tail currents at -80 mV were used to monitor effects of ErgTx (10 nM). Before toxin application, currents were recorded under the control conditions for 4 - 9 min to establish a baseline (I_c). Toxin was then added and mixed with the bath solution by repetitive pipeting. The toxin effects reached a steady-state in 6 - 10 min, when I_{tx} was measured. The fraction of remaining current in the presence of 10 nM ErgTx (I_{tx}/I_c) was used to estimate the dissociation constant (K_d) based on modified equation [1] (assuming that the maximal toxin effect is 90% reduction of the current, see Fig. 4):

$$I_{tx}/I_c = 0.9/(1+[ErgTx]/K_d(V))+0.1 \quad [1]$$

The mutation-induced changes in free energy of toxin binding are calculated based on equation [2]:

$$\Delta\Delta G = RT\ln(K_d^{mut}/K_d^{wt}) \quad [2]$$

where K_d^{mut} and K_d^{wt} are the K_d values of mutant and WT HERG, respectively ($K_d^{wt} = 7.2 \pm 1.1$ nM, $n=7$). Plotted are $\Delta\Delta G$ values (means and SE bars, $n = 3$ to 7 each) against channel types along the abscissa. The asterisks (*) denote mutants whose expression level was too low for

measuring ErgTx effects (N573C, K595C, P605C, N633C, E637C and K638C). White bars represent data not different from WT. Gray and black bars represent data different from WT at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. W585C, G590C and P632C were not suppressed even in the presence of 100 nM ErgTx (estimated $\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol). Shown on top is alignment of partial amino acid sequences of Shaker and HERG. The putative amphipathic α -helix in the S5-P linker of HERG (583-595) is shown as an insert and boxed. The corresponding sequence along the abscissa is also boxed. Shaded residues in the Shaker sequence are those important for binding of ChTx or analog. Shaded residues in the HERG sequence are those important for ErgTx binding ($\Delta\Delta G > 2$ kcal/mol).

Fig. 6 Lack of correlation between mutation-induced changes in HERG channel function and changes in ErgTx potency. Channel types are marked on left. Left column shows current traces recorded in 2 mM $[K]_o$ using the protocol depicted on top. Right column shows current traces recorded before (I_c , thin traces) and after (I_{tx} , thick or dotted traces) application of 10 nM ErgTx in 98 mM $[K]_o$ using the protocol depicted on top.

Fig. 7 (A) Effects of an outer mouth blocker, TEA, on ErgTx (10 nM) blockade of WT HERG. I_{tx}/I_c was measured as described in Fig. 4 in 2 mM $[K]_o$ before and after addition of TEA (50 mM) to the bath solution (with equimolar reduction of $[Na]_o$, $n = 5$ and 4 each). **(B)** Effects of changing pH_o on ErgTx blockade of WT and mutant HERG channels. All oocytes expressing cysteine mutants were treated with DTT (5 mM, 0.25 - 4 hr) before recordings. Recordings were conducted in 2 mM $[K]_o$ (WT and H578C) or in 98 mM $[K]_o$ (H587C, H578K). I_{tx}/I_c in ErgTx (10 nM) was measured as described in Fig. 4, and plotted against pH_o ($n = 3$ to 6 each). In most

cases, each oocyte was tested for 2 or all 3 p*H*_o conditions in a random order. Shown on top is partial HERG amino acid sequence in the outer vestibule region, with shaded areas highlighting positions important for ErgTx binding (see Fig. 5). H578 and H587 are marked.

Fig. 8 Voltage-dependence of ErgTx blockade of WT HERG at p*H*_o 6.5 and 8.5. **(A)** Representative WT HERG current traces recorded at specified p*H*_o (in 98 mM [K]_o) using the protocol shown in the inset. The peak amplitudes of tail currents were used to construct the activation curve and to calculate the fraction of remaining current in the presence of 10 nM ErgTx (*I*_{tx}/*I*_c). **(B)** Comparison of voltage-dependence of WT HERG activation and ErgTx blockade. The relationship between test pulse voltage (*V*_t) and tail current amplitudes (normalized by the tail current amplitude after *V*_t to +60 mV) under the control conditions was fit with a simple Boltzmann function to estimate the half-maximum activation voltage (*V*_{0.5}) and slope factor (*k*):

$$\text{normalized tail} = 1/(1+\exp((V_{0.5}-V_t)/k)) \quad [3]$$

The data are shown as solid symbols based on the right ordinate. Superimposed curves are calculated using the above equation with parameter values: p*H* 6.5, *V*_{0.5} = -13.3 ± 0.8 mV, *k* = 8.8 ± 0.2 mV (*n* = 4); p*H* 8.5, *V*_{0.5} = -16.0 ± 1.1 mV, *k* = 9.5 ± 0.4 mV (*n* = 5). Data of *I*_{tx}/*I*_c are shown as open symbols based on the left ordinate. The superimposed lines are calculated based on modified equation [1] (given in Fig. 5 legend) and equation [4]:

$$K_d(V) = K_d(0) \exp(z\delta VF/RT) \quad [4]$$

where 'zδ' denotes the 'effective valence' of voltage-sensing domain that affects ErgTx binding.

For p*H* 6.5, *K*_d(0) = 9.7 nM and zδ = 0.2; for p*H* 8.5, *K*_d(0) = 11.5 nM and zδ = 0.36.

Fig. 9 A proposed outer vestibule structure for the HERG channel. **(A)** 2-dimensional cartoon of an HERG subunit, showing the putative α -helix formed by residues 583 - 594 in the S5-P linker that comes in close contact with the P-S6 linker. **(B)** Helical wheel plot of residues 583 - 594, viewed from the N-terminal end. Five residue numbers are labeled for reference. Note that positions important for ErgTx binding cluster to the hydrophobic face of the amphipathic α -helix.

A. Alignment of amino acid sequences of Kv channel outer vestibules

	S5	S5-P linker	P-loop	P-S6 linker	S6
KcsA	VLAERGAPGAQ	LI TY PR AL W WS V E T A T T V G Y G D L Y P V T	LMGR	. C
Shaker	YFAEAGSENSF	FK SI PD AF W W AV V T M T T V G Y G D M T P V G V W G K I V G S L C		
Kv1.4	YFAEAEDEPTTH	FQ SI PD AF W W AV V T M T T V G Y G D M K P I T V G G K I V G S L C		
Kv2.1	FFAEKDEDDTK	FK SI PA SF W W A T I T M T T V G Y G D I Y P K T L L G K I V G G L C		
Kv4.3	FYAEEKGSSASK	FT SI PA SF W Y T I V T M T T I G Y G D M V P P K T I A G K I F G S I C		
KvLQT1	YLAEKDAVNESGRVE	FG SY AD AL W W G V V T V T T I G Y G D K V P Q T W V G K T I A S . C		
HERG	WYAIGNMEQPHMDSR	PNSSGLGGPSIKDKYVTALYFTFSSLTSVGEENVPNTNSEKIFSI			. C

B. Short peptide K channel blockers from scorpion venom

ChTx	(α -KTx 1.1)	ZF.TNV...SQTTS...KECWSVQRLHNTSRG.VCMNKKRCYYS
NTx	(α -KTx 2.1)	TI.INV...KCTSP...KQCSKPKKELTGSSAGAKCMNGKCKCYNN
AgTx2	(α -KTx 3.2)	GVPINV...SQTGS...PQCIIKPKD..AGMRFCKCMNRKCHCTPK
ErgTx		DRDSGVDKSRCAKYGYQHQQCKN..AGHNGGTQMPFFKCKCA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Fig. 1

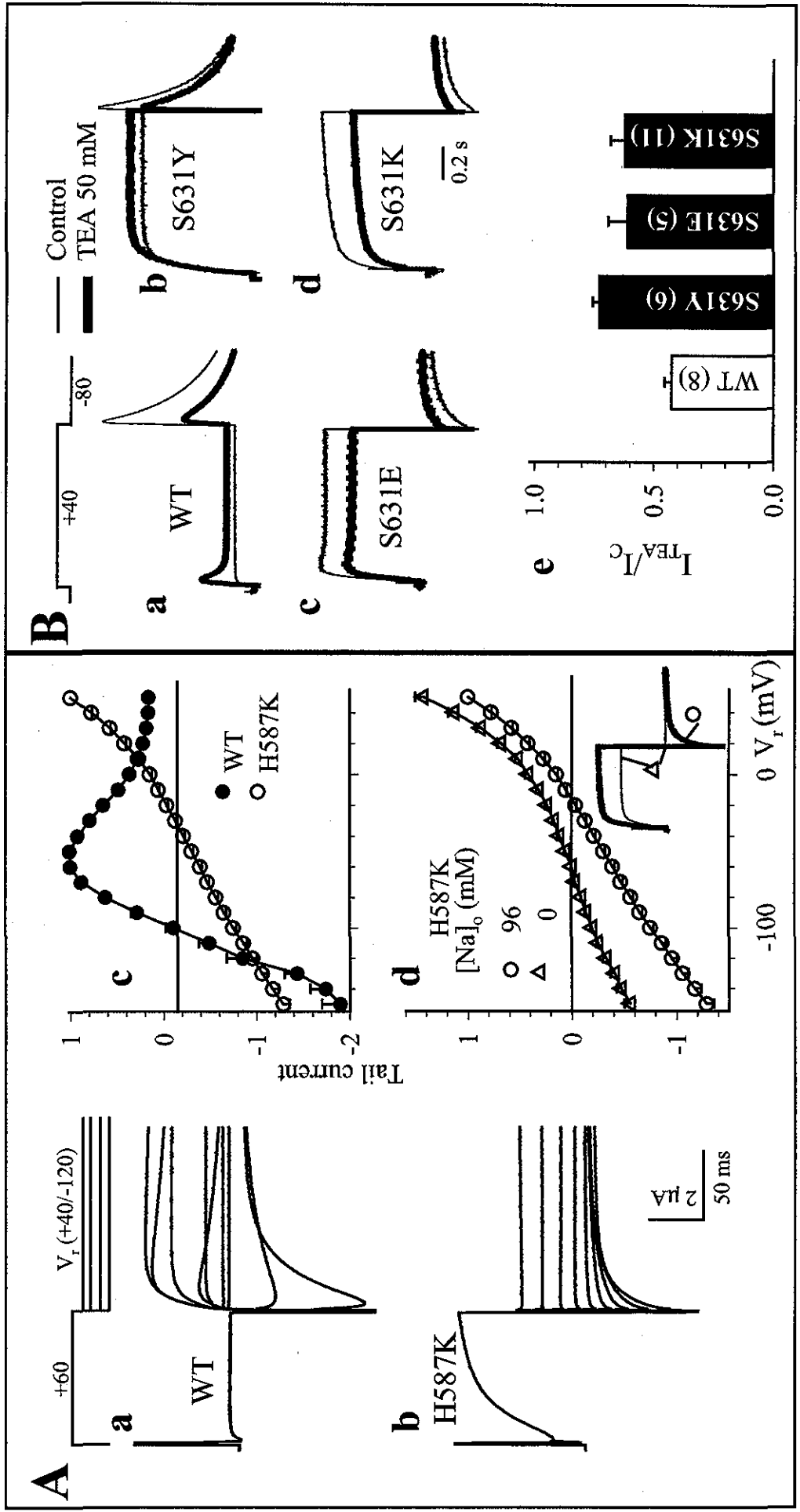
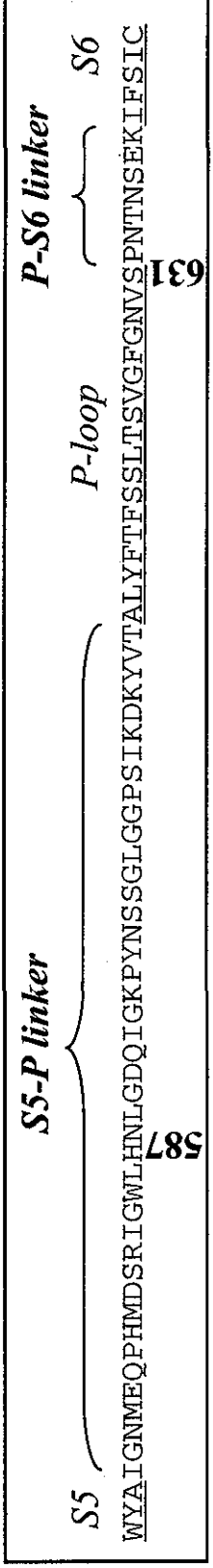


Fig. 2

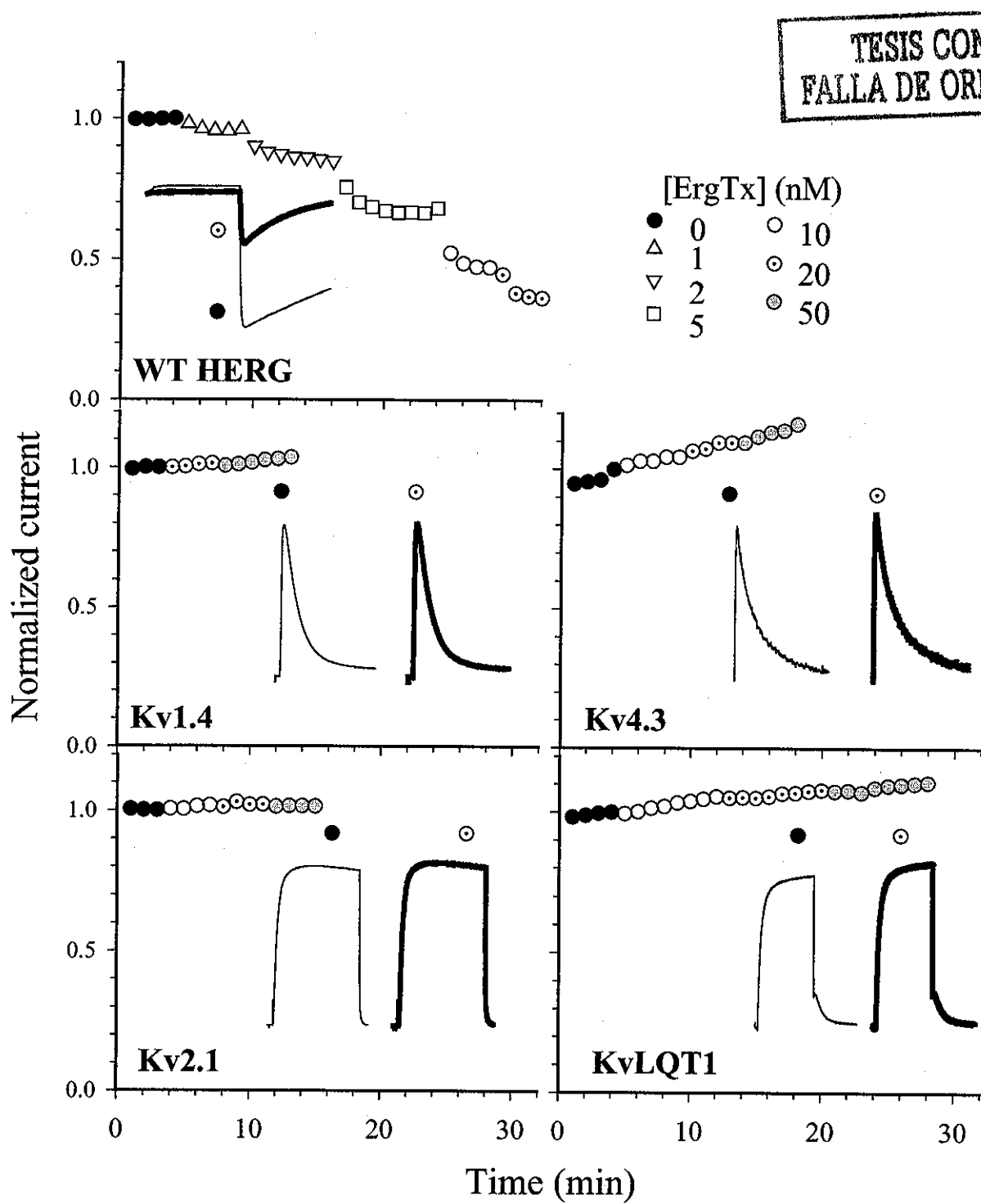


Fig. 3

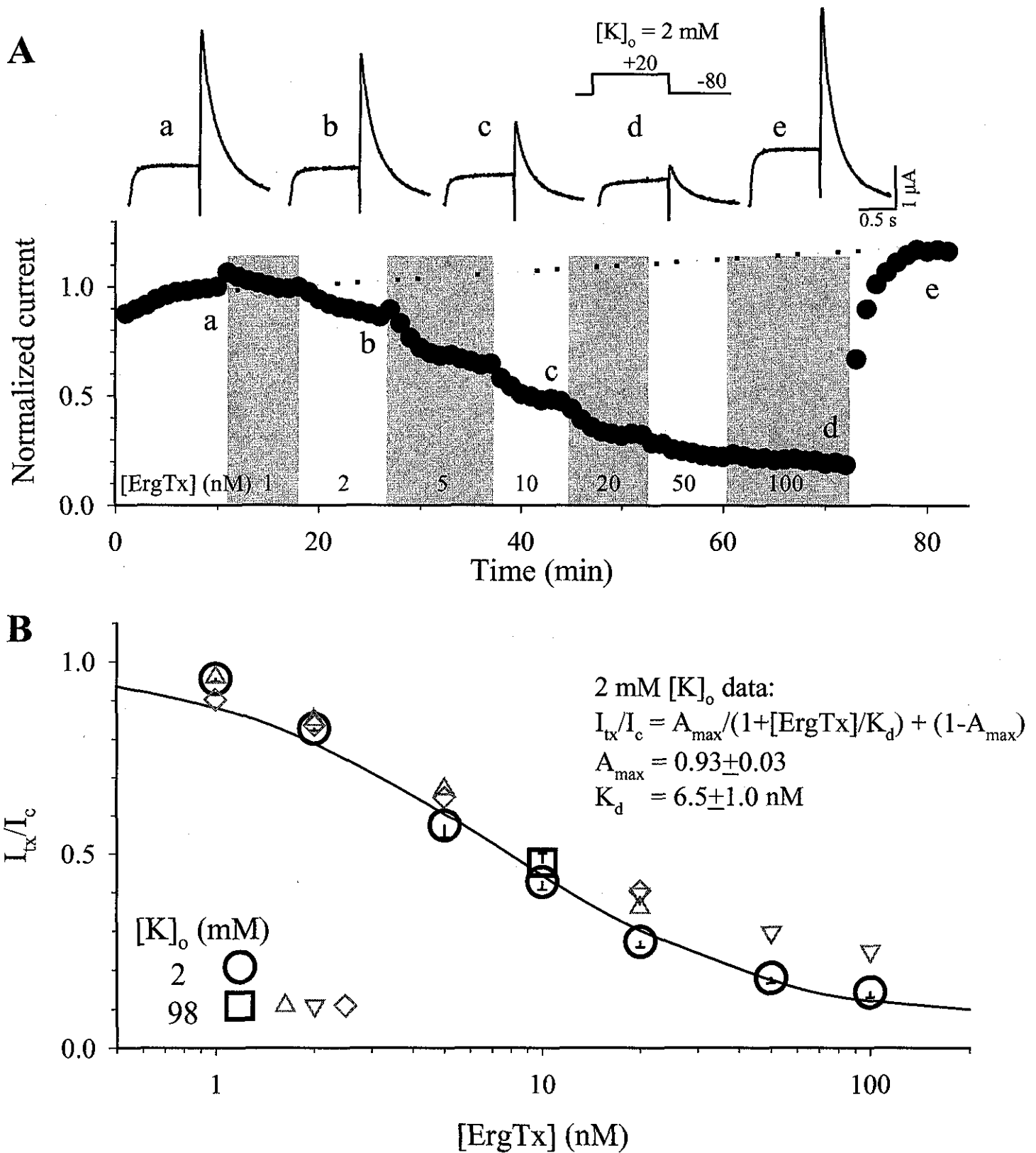


Fig. 4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Shaker YFAEAGS.....ENSEFKSI P D A F W W A V V T M T T V G Y G D M I P M G V W G K I V G S L C
HERG WY A I G N M E Q P H M D S R P Y N S S G L G G P S I K D K Y V T A L Y F T F S S L T S V G F G N V S E N T I N S E K I F S I . C

S5-P

P-loop

P-S6

S6

ICWLNHLGDDQIGK

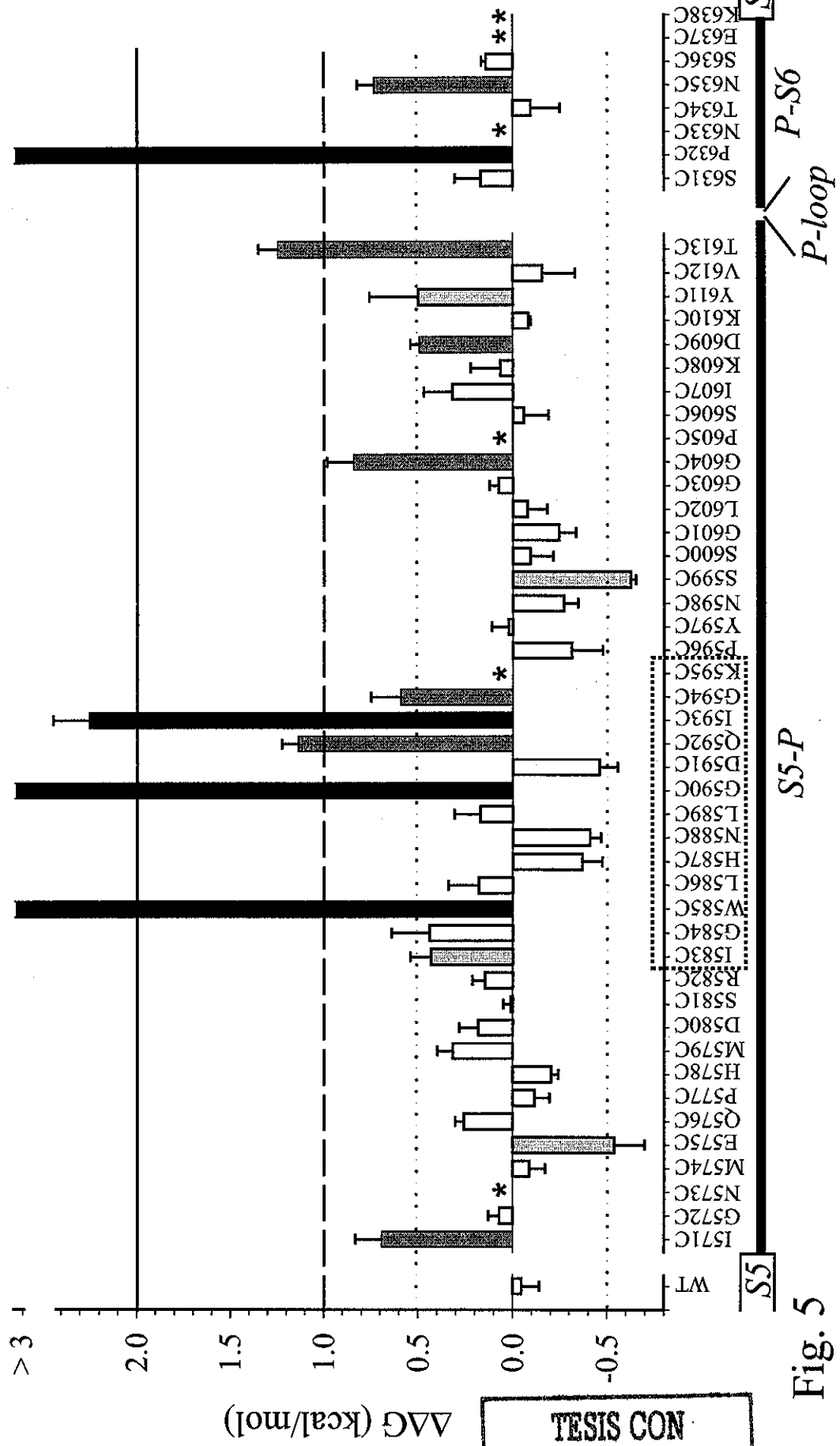


Fig. 5

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

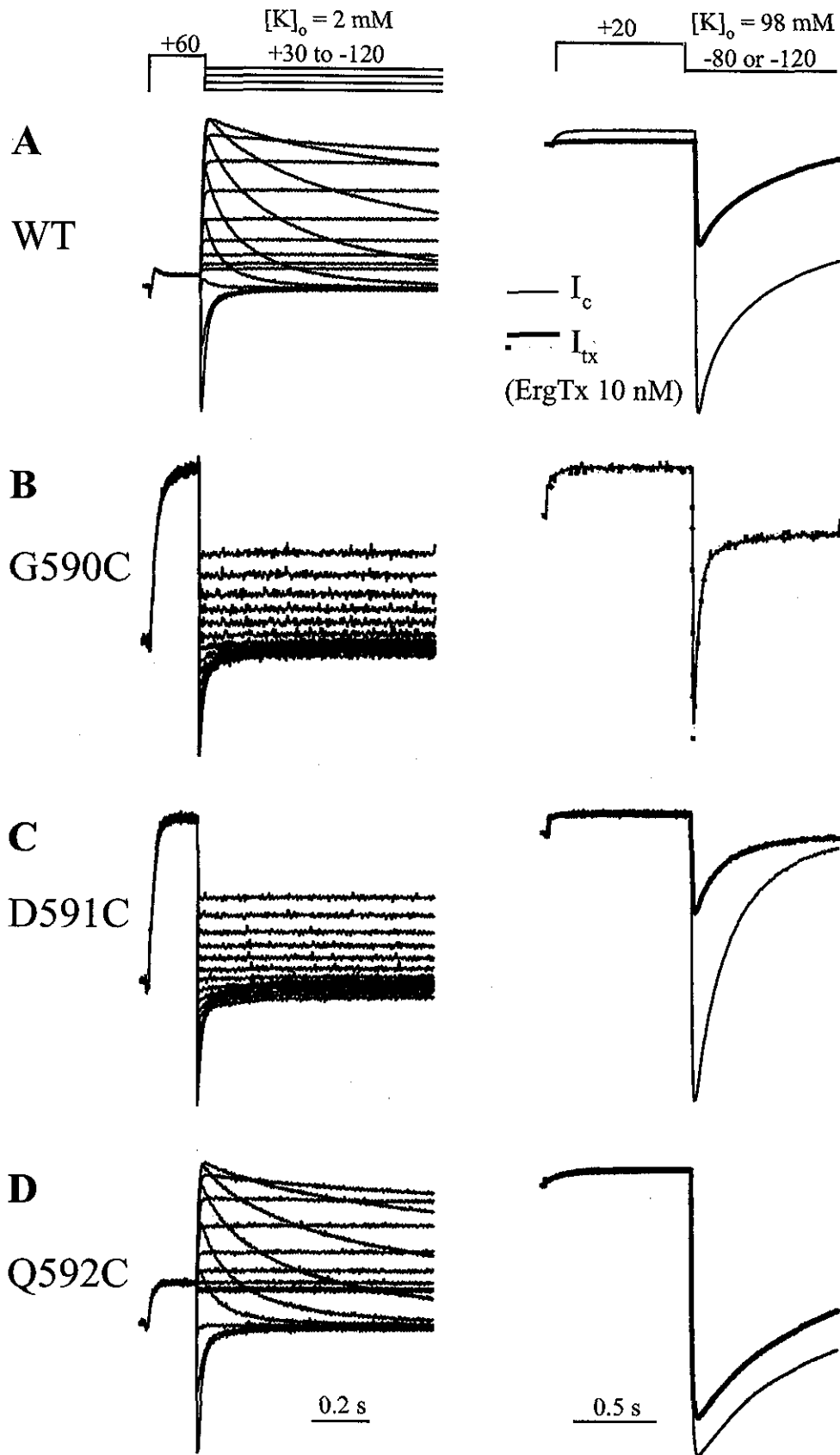


Fig. 6

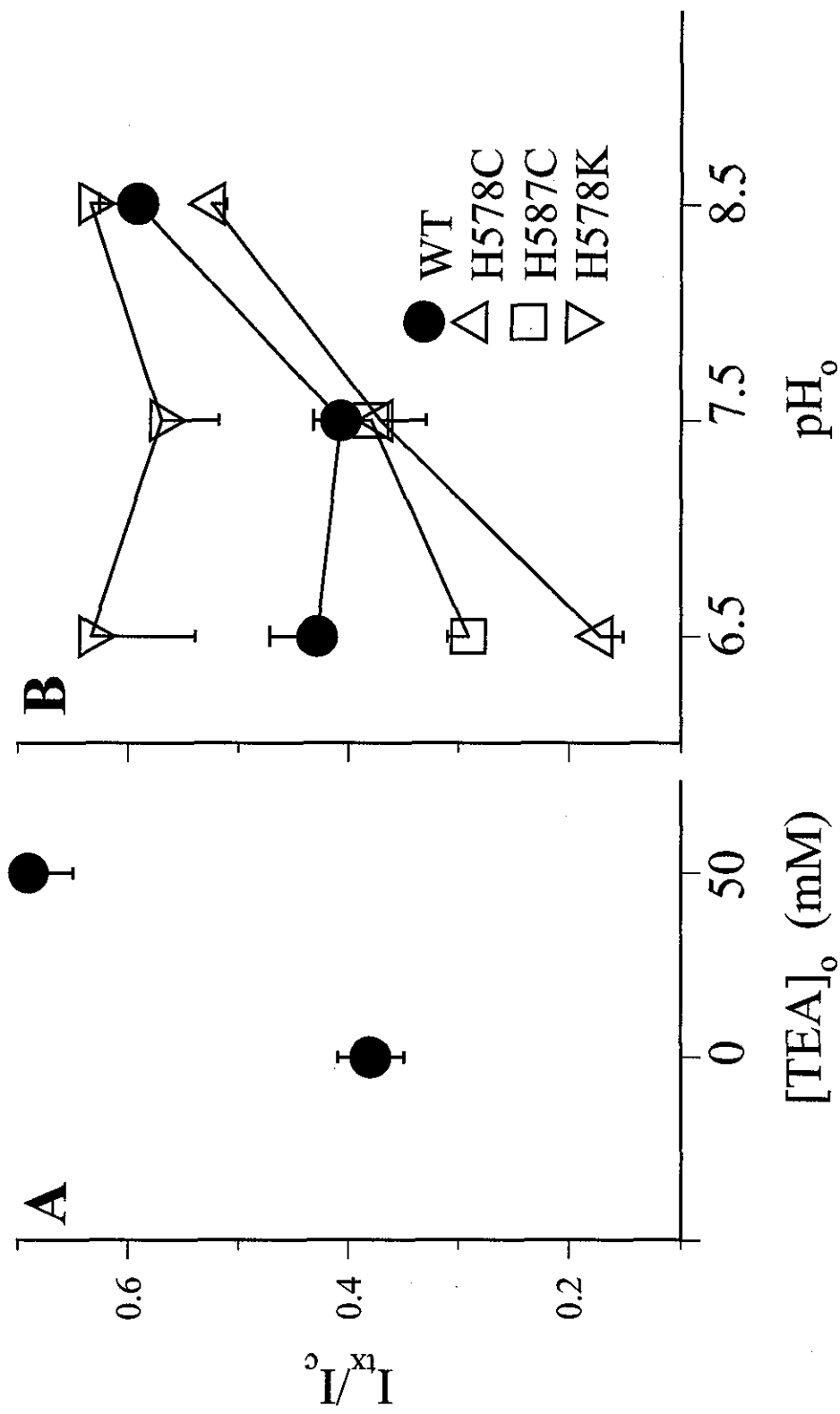
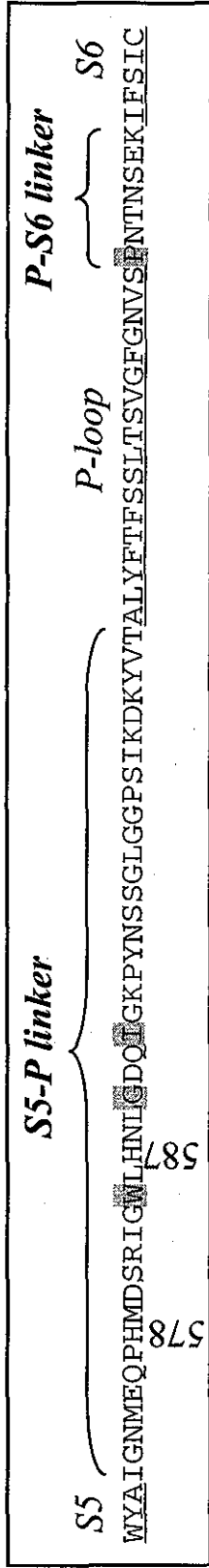


Fig. 7

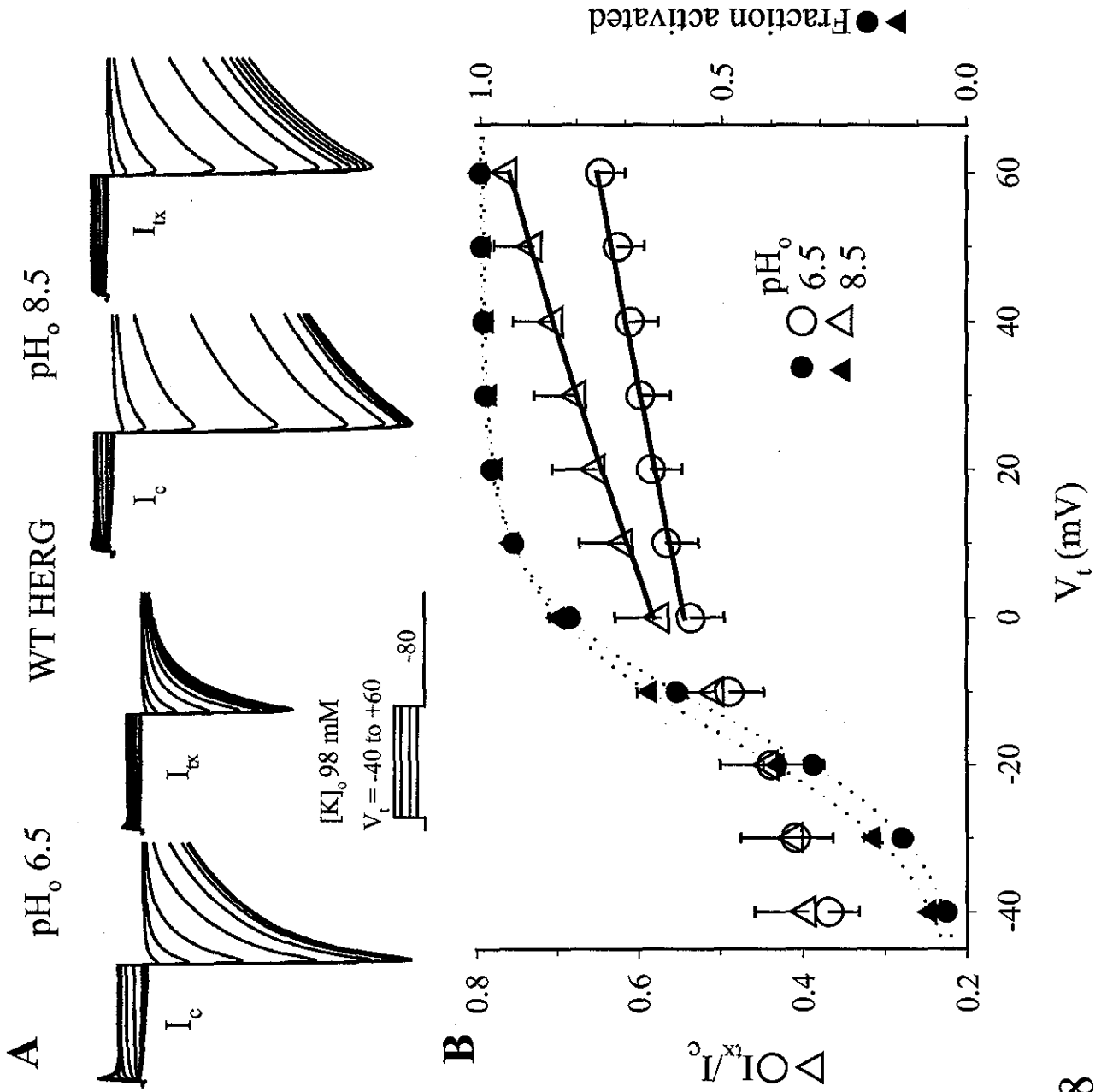
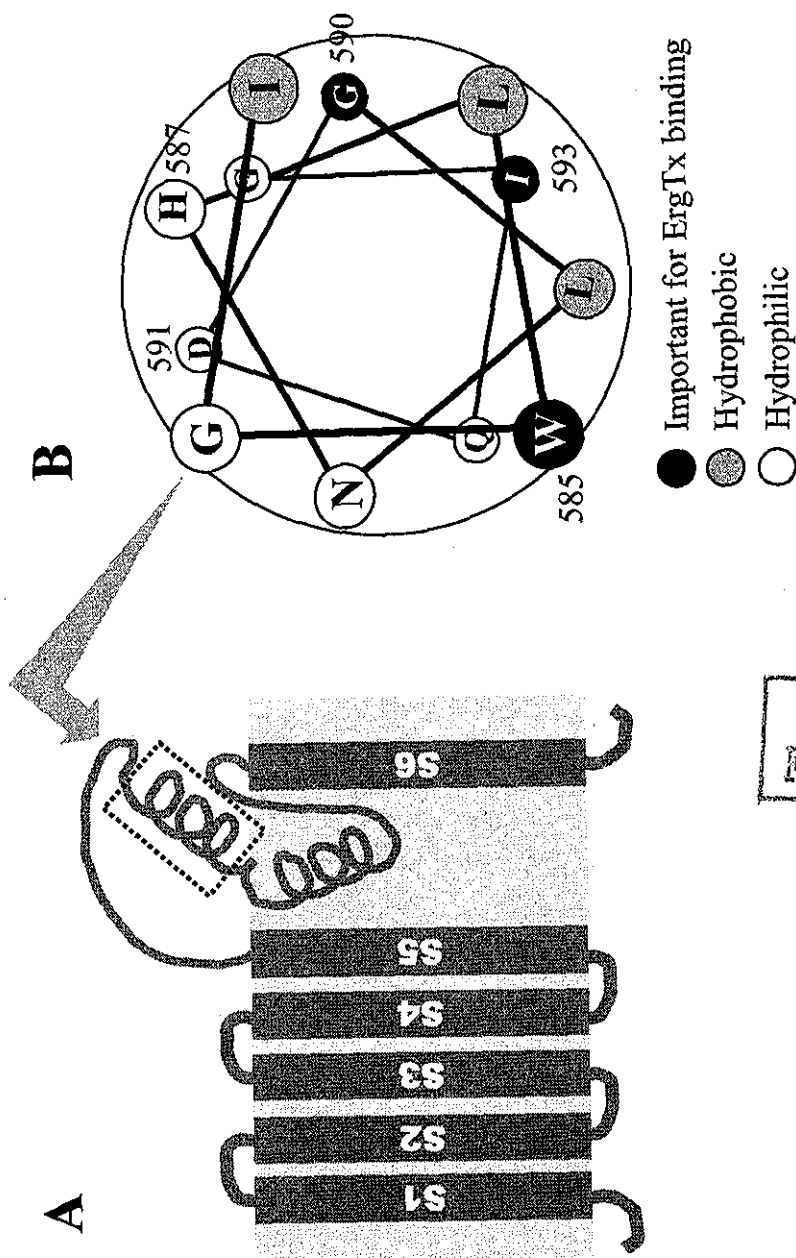


Fig. 8



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 9