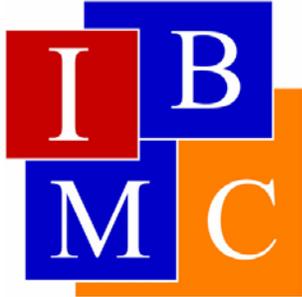


UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



Estudio del estado conformacional del filtro de selectividad del canal KcsA en condiciones de inactivación

TRABAJO FIN DE GRADO
Germán Antón Ruiz

Tutor

José Antonio Poveda Larrosa

Co-tutor

Ana Marcela Giudici Besseghini

Curso académico 2016/2017

Facultad de ciencias experimentales

Grado en Biotecnología

Índice

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Los canales iónicos: generalidades y función	4
1.2. Los canales de potasio	6
1.3. El canal de potasio KcsA	6
1.3.1. Características generales	6
1.3.2. Características estructurales	8
1.3.3. Características funcionales	11
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Expresión y purificación de la proteína	15
3.2. SDS-PAGE	16
3.3. Medición del espectro de fluorescencia intrínseca	16
3.4. Monitorización de la desnaturalización por fluorescencia	18
3.5. Esquemas de los procedimientos utilizados durante el trabajo	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Purificación KcsA	21
4.2. Estudio de la estructura terciaria del canal KcsA mediante fluorescencia	21
4.3. Estabilidad térmica	23
4.4. Estudios de unión de K^+ y Na^+ al canal KcsA	24
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	31
7. BIBLIOGRAFÍA	32

Palabras clave: Canales de potasio, inactivación, filtro de selectividad, sitios de unión a iones.

Resumen: En este trabajo se estudió el estado conformacional del filtro de selectividad del canal KcsA en condiciones de inactivación. En primer lugar, se expresó y purificó la proteína. Posteriormente, mediante la técnica de fluorescencia se estudió su estructura terciaria. A continuación, se determinaron las constantes de disociación aparentes, K_D , de los cationes Na^+ y K^+ al filtro de selectividad de KcsA, a través de la caracterización de la desnaturalización térmica de la proteína. Los resultados indicaron la presencia de dos sitios de unión para el ion K^+ (alta afinidad y baja afinidad) y un sitio de unión para ion Na^+ al igual que lo publicado para el canal KcsA en condiciones de reposo (pH 7). Sin embargo, los valores de la K_D determinados para pH 4 indicaron una disminución de la afinidad de K^+ en el primero evento de unión y un aumento de la afinidad en el segundo evento de unión comparados con el pH 7. Estos resultados sugieren que la inactivación de KcsA conllevaría solo ligeros cambios en la estructura del filtro de selectividad respecto al estado de reposo.

Abstract: In this work, the conformational state of the KcsA channel selectivity filter under inactivation conditions was studied. Firstly, the KcsA channel protein was expressed and purified. Secondly, through the fluorescence technique, its tertiary structure was studied. Next, the apparent dissociation constants, K_D , of the Na^+ and K^+ cations were determined through the thermal-induced denaturation of the protein. The results indicated the presence of two binding sites for the K^+ ion (high affinity and low affinity) and one ion binding site for Na^+ as previously reported for KcsA channel under resting conditions (pH 7). However, K_D values determined for pH 4 showed a decrease in K^+ affinity at the first binding event and an increase in affinity at the second binding event compared to pH 7. These results suggest that KcsA inactivation would only lead to slight changes in the selectivity filter structure with respect to the resting condition.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los canales iónicos: generalidades y función

Las membranas biológicas son intrínsecamente impermeables a los iones y moléculas polares, pero estas especies son necesarias para la función celular normal. La permeabilidad es conferida por dos tipos de proteínas integrales de membrana, las bombas y los canales iónicos. Las bombas utilizan fuentes de energía libre como el ATP o la luz para impulsar el transporte de iones o moléculas en condiciones termodinámicamente desfavorables (transporte activo). En cambio, los canales iónicos facilitan el flujo rápido de iones a través de la membrana a favor de gradiente (transporte pasivo). Los canales iónicos son un grupo diverso de proteínas formadoras de poros que atraviesan la membrana celular y conducen iones de manera selectiva a través de esta barrera. Son proteínas alostéricas que cambian entre dos conformaciones, abierta y cerrada, en respuesta a un estímulo externo en un proceso conocido como apertura o *gating* (Jiang, Y. y col., 2002). Dependiendo del tipo de canal, el estímulo de *gating* puede ser la unión de un ligando, el campo eléctrico de la membrana o ambos. De esta manera, los canales iónicos son los encargados de coordinar las señales eléctricas en la mayoría de los tejidos. Estas proteínas han evolucionado para proveer caminos selectivos por los cuales los iones se mueven a favor del gradiente electroquímico, tanto despolarizando las células (es decir, transportando cargas positiva hacia el interior) o repolarizándolas (moviendo cargas positivas al exterior).

Por tanto, los canales iónicos no son simples poros que atraviesan las membranas, sino que son proteínas integrales de membrana, generalmente oligoméricas, las cuales forman un poro central por donde fluyen los iones a favor del gradiente electroquímico a una elevada velocidad ($\sim 10^7$ - 10^8 iones/segundo) y de manera altamente selectiva, los cuales presentan ciertas características esenciales:

1. Pueden ser altamente selectivos para ciertos iones.
2. Pueden existir en los estados abierto o cerrado ([figura 1](#)).
3. Las transiciones entre los estados abierto y cerrado están reguladas (por ligandos o por voltaje).
4. Los estados abiertos a menudo se convierten espontáneamente en estados inactivos ([figura 1](#)) que no conducen iones. En ciertos casos, las transiciones espontáneas de los canales iónicos desde su estado abierto al inactivado actúan como interruptores que determinan la duración del flujo iónico.

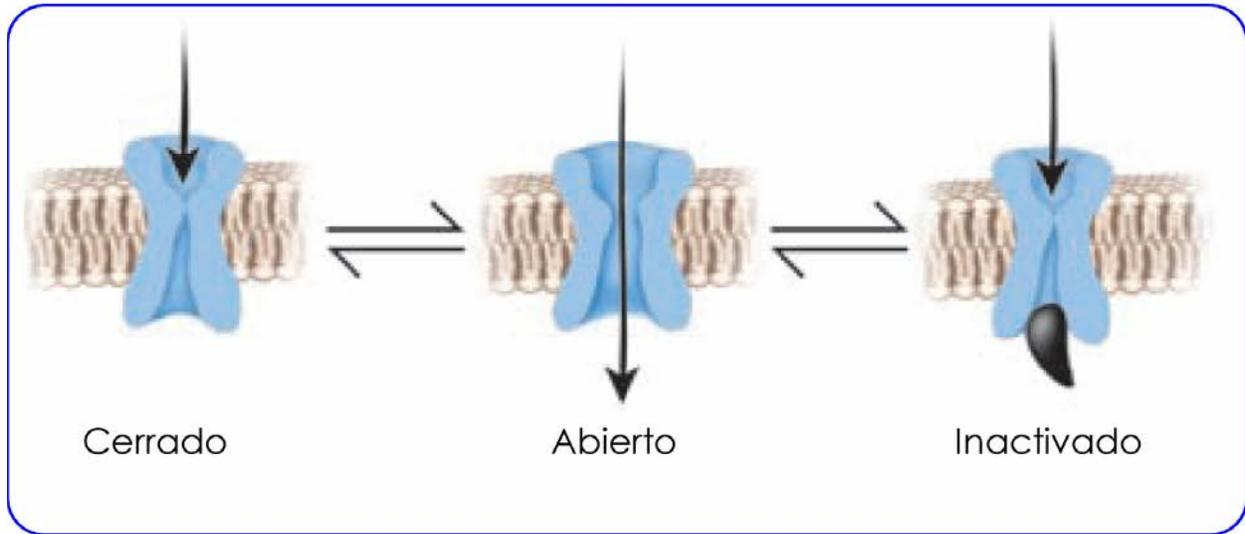


Figura 1: equilibrio entre los diferentes estados que pueden encontrarse en un canal iónico.

Cuando un canal iónico se abre los iones conductores son capaces de moverse a través de él y la dirección en que se mueven está determinada por el gradiente electroquímico, como se mencionó anteriormente, que representa la suma del gradiente químico a través de la membrana plasmática y el campo eléctrico que experimenta el ion.

Los canales iónicos pueden clasificarse en función de los iones que conducen: canales de Na^+ , de K^+ , de Ca^{2+} , de Cl^- .

Además, los canales iónicos se pueden clasificar en función del tipo de estímulo para su apertura o cierre en:

- Canales activados por voltaje: dentro de esta familia se encuentran canales de Na^+ , de K^+ , de Ca^{2+} y de Cl^- .
- Canales activados por ligando: poseen dos mecanismos de apertura: a) por unión directa del ligando al canal (receptores ionotrópicos); b) por unión del ligando a un receptor que no está asociado al canal. Esto provoca una cascada de eventos y la activación de proteínas G que promueven la apertura del canal debido a la actuación de enzimas fosforiladoras (canales metabotrópicos).
- Canales mecanosensibles: regulados por un impulso mecánico, como el estiramiento que sufre la membrana celular ante la aplicación de presión y/o tensión.

1.2. Los canales de potasio

Desde el punto de vista estructural, los canales de K^+ son proteínas integrales de membrana tetraméricas que forman un poro acuoso central por el que fluye específicamente el catión K^+ a favor de gradiente electroquímico.

La conducción de K^+ se haya involucrada en numerosos procesos celulares induciendo la regulación del volumen celular, la secreción hormonal y la formación del impulso nervioso en células excitables (Catterall, W.A., 1995; Suzuki, M. y col., 1994; Schrempf, H. y col., 1995).

Actualmente se conocen varias subfamilias moleculares de canales de K^+ , algunos sensibles a voltaje, otros a la concentración de Ca^{2+} , a la unión de proteínas G, o poliaminas.

Existen entre 30 a 100 genes de canales de K^+ en el ADN de organismos eucariotas tales como *Drosophila*, *C.elegans*, el ADN humano, cuyos ARN_m pueden ser también sometidos a procesos de *splicing* alternativo, lo que aumenta aún más la diversidad de estas proteínas (Miller, C., 2000). Ciertas enfermedades o síndromes tales como arritmias cardíacas, sordera, epilepsia, diabetes y alteraciones en la presión arterial han sido relacionados con mutaciones en genes que codifican canales de K^+ . A pesar de la variedad de tipos de canales de K^+ , todos comparten una secuencia aminoacídica fácilmente distinguible por estar altamente conservada que se denomina “secuencia de la firma” (del inglés “signature sequence”)

Tanto los canales de K^+ como los canales de Na^+ , Ca^{2+} y en cierta medida los canales de glutamato, presentan dos segmentos transmembrana separados por una hélice pequeña (*loop P*) que lleva incorporada la zona del filtro de selectividad. Además, todos estos canales poseen grandes similitudes en su topología transmembrana, en la estructura en hélice α de los segmentos transmembrana que delinean el poro central y en la disposición tridimensional del filtro de selectividad y de la zona de *gating*, lo cual sugiere que poseen una estructura espacial similar en la zona del poro.

1.3. El canal de potasio KcsA

1.3.1. Características generales

El canal KcsA (canal de potasio de *Streptomyces lividans*) fue identificado y clonado a partir de la bacteria del suelo *Streptomyces lividans* (Miller, C., 2000) y pudo ser purificado mediante expresión heteróloga en *E.coli* en cantidades suficientes para realizar diferentes estudios biofísicos (Miller, C., 2000; Heginbotham, L., y col., 1998; Splitt, H., y col., 2000).

Desde un punto de vista estructural presenta una elevada similitud con los canales de potasio eucariotas, sobre todo en la región del poro. Desde el punto de vista funcional presenta muchas similitudes con los correspondientes canales eucarióticos homólogos (Zagotta, W.N., 2006; Cordero-Morales, J.F., y col., 2007).

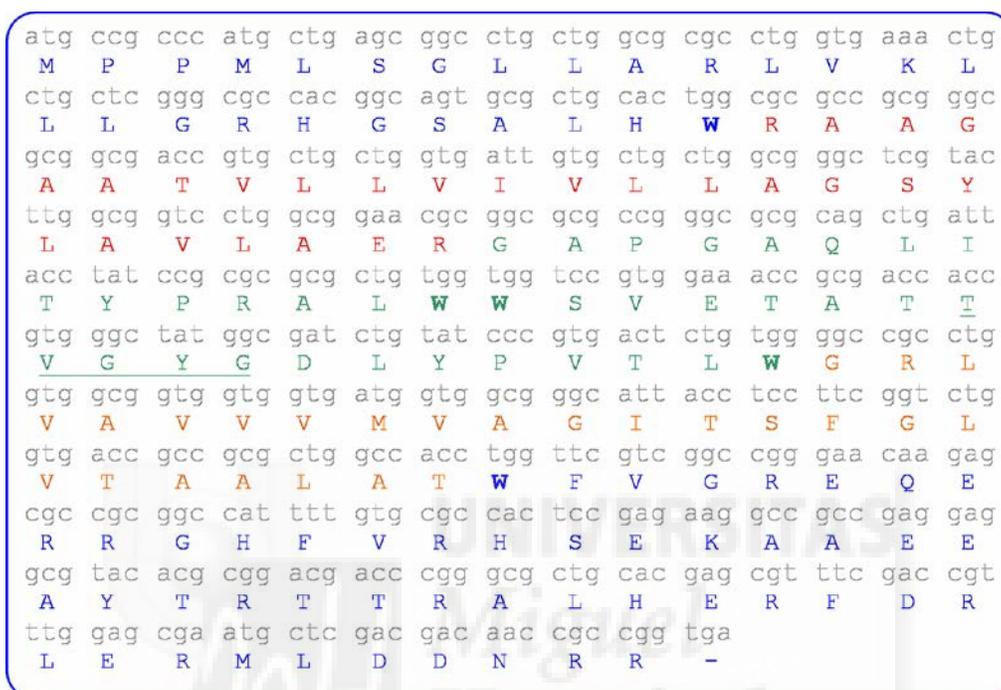


Figura 2: Secuencia nucleotídica (gris) y aminoacídica (color) del canal de potasio KcsA. La secuencia comienza en el extremo N-terminal y finaliza en el C-terminal. En rojo se resalta los aminoácidos que forman la hélice transmembrana 1 (M1) y en naranja la M2. En verde se muestra la zona del poro, y subrayada se presenta la secuencia de la firma que forma el filtro de selectividad. En azul se presentan los aminoácidos correspondientes a los dominios N y C- terminales. En negrita se resaltan los cinco triptófanos presentes en este canal, correspondientes a las posiciones 26, 67, 68, 87 y 113 en la secuencia primaria.

El gen *kcsa* presenta una pauta de lectura abierta que consta de 483 pares de bases con un alto contenido de G+C (guanina+citosina)(70,6%) y codifica para una proteína de 70,761 kDa (figura 2). En la secuencia primaria se reconoce fácilmente la secuencia de la firma típica de los canales de K^+ y el análisis de hidrofobicidad predice la existencia de dos hélices transmembrana (Schrempf, H., y col., 1995). Mediante la purificación posterior a la clonación se comprobó que KcsA es una proteína de membrana homotetramérica (Heginbotham, L., y col., 1997) que funciona como un canal selectivo a K^+ (Heginbotham, L., y col., 1998; LeMasurier, M., y col., 2001) y es bloqueado por Na^+ , Ba^{2+} y sales de amonio cuaternarias, entre otros (Heginbotham, L., y col., 1997; Kutluay, E., y col., 2005).

Otra consecuencia de la purificación exitosa de esta proteína de membrana fue la obtención de cristales y su resolución por difracción de rayos X, lo cual supuso la definición por primera vez de la estructura de un canal iónico a nivel atómico (Doyle, D.A., y col., 1998). En este cristal se observó que KcsA es una proteína organizada como un homotetrámero con subunidades de 160 aminoácidos, cada una de las cuales posee un extremo N- y C-terminal citoplásmicos (no resueltos a partir de los cristales iniciales), además de dos hélices transmembrana conectadas por otra hélice corta y el llamado fragmento del poro que contiene la secuencia de la firma característica que define el filtro de permeabilidad iónica (TVGYG).

1.3.2. Características estructurales

Como se ha mencionado previamente, la obtención de la estructura cristalográfica de alta resolución de KcsA, llevada a cabo por el grupo de Roderick MacKinnon en 1998 (Doyle, D.A., y col., 1998), supuso una revolución en el campo de los canales iónicos, ya que permitió conocer en detalle la organización de dichas proteínas y permitió establecer las bases estructurales de la conducción y selectividad iónica.

La primera estructura se estableció a 3,2 Å de resolución, aunque ésta fue posteriormente mejorada hasta 2,0 Å mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que se une a la zona extracelular del canal. En ambas publicaciones se pudo determinar únicamente la región transmembrana de KcsA (residuos 23-119). Por otra parte el grupo del Dr. Perozo consiguió obtener la estructura del canal completo mediante resonancia de spin electrónico y, posteriormente, mediante difracción de rayos X excepto el dominio N-terminal.

Las estructuras cristalográficas de KcsA, como se mencionó anteriormente, indican que se trata de un homotetrámero cuyas subunidades se disponen en forma de cono invertido alrededor de un poro central acuoso por donde fluyen los iones (figura 3). La sección que está en contacto con los lípidos de membrana celular tiene unos 34 Å de longitud y el diámetro del poro es variable siendo más estrecho en la parte extracelular (Doyle, D.A., y col., 1998). Estas estructuras estarían representando el estado cerrado del canal debido a la presencia de un entrecruzamiento en la parte final de las hélices transmembrana TM2 que impediría el tránsito de iones (Doyle, D.A., y col., 1998 y Zhou, Y., y col., 2001).

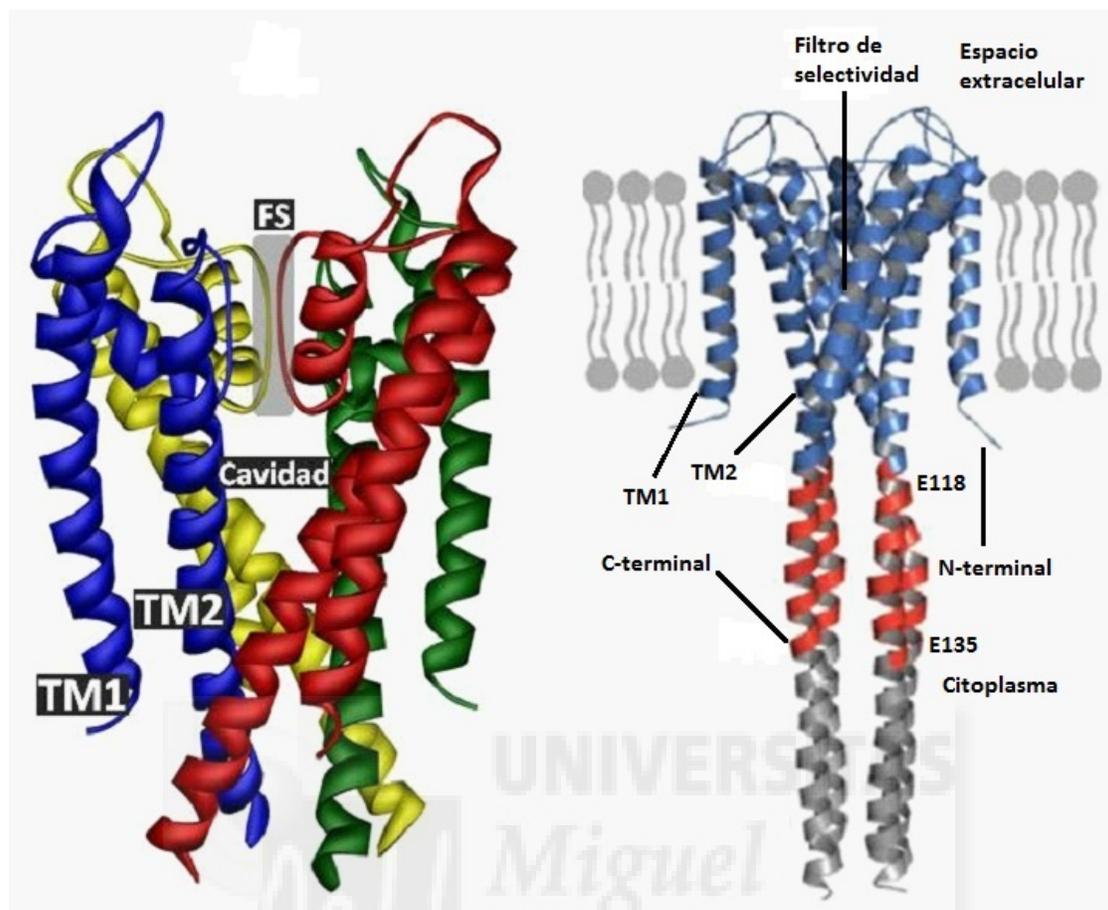


Figura 3: Representación en cintas de la estructura del KcsA. La imagen de la izquierda representa las cintas de la parte transmembrana del homotetrámero donde cada monómero se muestra de un color diferente y se señalan las hélices transmembrana (TM1 y TM2), el filtro de selectividad (FS, sombreado) y la cavidad (PDB 1K4C) (Zhou, Y., y col., 2001). La figura de la derecha representa la estructura del canal incluyendo el dominio C-terminal (PDB 3EFF) (Uysal, S., y col., 2009). En rojo se marca la región flexible de este dominio desde el aminoácido E118 hasta el E135.

El dominio N-terminal está formado por los 22 primeros aminoácidos del canal que son, principalmente, hidrofóbicos (leucinas) o cargados positivamente. Su estructura no se ha logrado determinar mediante difracción de rayos X, aunque los datos obtenidos a partir de simulaciones indican que formaría una hélice anfipática dispuesta en la interfase lípido-citoplasma de la membrana sugiriendo, de esta forma, que ejerce una función de anclaje (Cortes, D.M., y col., 2001).

Cada subunidad del canal presenta dos hélices α transmembrana (TM1 y TM2) conectadas por la región del poro (Doyle, D.A., y col., 1998). En el estado cerrado las 4 hélices TM2 están entrecruzadas a nivel del residuo Val115 (en la parte C-terminal) donde se producen movimientos necesarios para la apertura del canal constituyendo de esta forma la primera compuerta de paso iónico (puerta intracelular) (Uysal, S., y col., 2011).

El dominio C-terminal está constituido por los últimos 40 aminoácidos del canal que se extienden hacia el citoplasma. Su estructura fue inferida mediante resonancia de espín electrónico y resonancia magnética nuclear, que indicaron que este dominio adopta una estructura helicoidal y se entrecruzan entre sí (Cortes, D.M., y col., 2001; Baker, K.A., y col., 2007; Zimmer, J., y col., 2006). El dominio C-terminal forma una hélice α que se extiende unos 70 Å hacia el citoplasma y se entrecruza con las hélices del resto de subunidades, interaccionando mediante puentes de hidrógeno y puentes salinos entre cadenas laterales de determinados residuos de subunidades adyacentes. Además, la estructura del canal completo en la conformación abierta indica que este dominio presenta una región flexible (entre los residuos E118 y E135) que se expande durante la apertura de la puerta intracelular (figura 3) (Uysal, S., y col., 2011).

La región del poro consta de unos 30 aminoácidos ubicados en la mitad superior del canal que conectan las dos hélices transmembrana y se puede dividir en dos partes: la hélice del poro y, a continuación, el lazo del poro o *P-loop*. La primera parte consiste en una pequeña hélice α cuyo extremo C-terminal está orientado hacia el centro de la cavidad. Esta disposición espacial permite establecer numerosas interacciones entre las subunidades que favorecen el mantenimiento de la estructura tetramérica, así como la regulación de la conducción iónica (Doyle, D.A., y col., 1998). En segundo lugar, el *P-loop* es un segmento corto de aminoácidos situado en el poro iónico que contiene la secuencia consenso de los canales de potasio T₇₅VGYG₇₉, lo que estructuralmente se conoce como filtro de selectividad.

La caracterización estructural de éste fue crucial, puesto que es en esta zona dónde se encuentran los sitios de unión a iones (figura 4). Además, posteriores investigaciones han demostrado que tanto el tipo de ión (LeMasurier, M., y col., 2001; Demo, S.D., y col., 1992 - Swenson, R.P., y col., 1981) como mutaciones en el filtro (Lu, T., y col., 2001 - Sun, Z.P., y col., 1996) influyen sobre la apertura de los canales de potasio, lo que llevó a proponer al filtro de selectividad como la segunda compuerta (puerta extracelular) (Doyle, D.A., y col., 1998; Zhou, Y., y col., 2001).

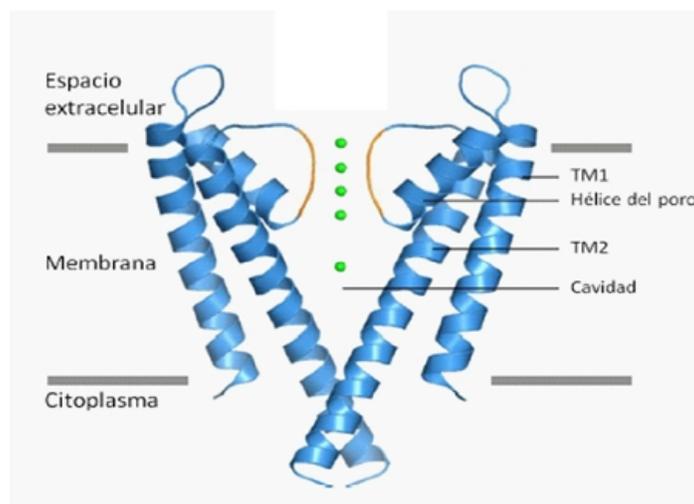


Figura 4: Representación de cintas de la estructura de KcsA con cuatro iones K^+ (esferas verdes) en el filtro de selectividad (en naranja) y uno en la cavidad. Se muestran dos subunidades del canal para mayor claridad. Las líneas grises señalan límite superior e inferior de la membrana.

La cavidad es una dilatación del poro acuoso que se prolonga hasta la mitad inferior del mismo y presenta un diámetro de unos 10 Å (Doyle, D.A., y col., 1998). Los residuos que revisten las paredes internas de la cavidad son predominantemente hidrofóbicos. A partir de datos cristalográficos se propuso que la cavidad contribuye a la estabilización de los cationes dentro del poro (Doyle, D.A., y col., 1998; Zhou, Y., y col., 2001).

1.3.3. Características funcionales

KcsA se activa tras la exposición a pH ácido en la zona intracelular de la proteína (Cuello, L.G., y col., 1998; Thompson, A.N., y col., 2008). Sin embargo, este estado activado es inestable y al poco tiempo el canal entra en un estado inactivado del cual se recupera lentamente, por lo cual su probabilidad de apertura es bastante baja ($\sim 0,1$) (Chakrapani, S., y col., 2007; Gao, L., y col., 2005; Cordero-Morales, J.F., y col., 2006).

Blunck, R., y col., 2006, detectaron mediante técnicas fluorescentes que KcsA posee lo que denominaron dos puertas de *gating*. Una de ellas está representada por el entrecruzamiento entre la zona C-terminal de las hélices M2 (residuos 112 a 119), la cual es sensible a pH ácido (Cuello, L.G., y col., 1998; Heginbotham, L., y col., 1999). Shimizu, H., y col. (2008) demostraron que durante el *gating*, las hélices TM2 realizan un movimiento rotacional que podría ser responsable de la apertura del poro. Por otra parte, la segunda puerta de *gating* correspondería al filtro de selectividad, el cual, dado sus características dinámicas, puede cambiar su conformación de acuerdo al tipo y concentración de iones

presentes, al voltaje aplicado y al paso desde el estado abierto o de reposo al estado inactivado (Cordero-Morales, J.F., y col., 2007).

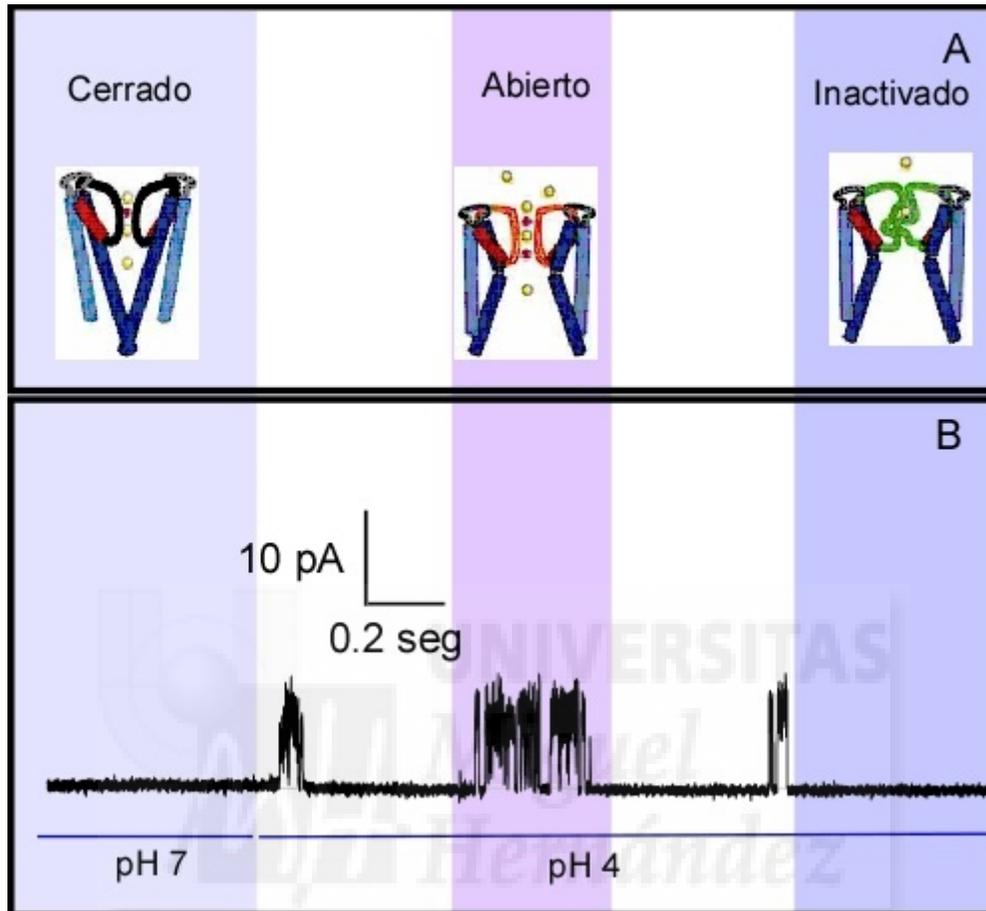


Figura 5: A. Representación de la conformación estructural asociada a cada estado cinético. B. Correlación de las transiciones cinéticas específicas con comportamiento de canal único. (Cordero-Morales, J.F., y col., 2006). Registros realizados a +150 mV, corriente detectada a 8 pA en condiciones simétricas de 100 mM KCl.

En la figura 5 se observa las tres conformaciones del canal, primero a pH 7 donde está cerrado (*resting* o reposo), y a continuación a pH 4 donde permanece en un estado abierto o inactivado. En un registro de la corriente que pasa por el canal con el tiempo, se observa que la intensidad de corriente permanece invariable mientras el pH sea 7. Sin embargo, cuando el medio está a pH 4, donde se abre el canal, aparecen cambios en la intensidad de corriente. El tiempo durante el cual el canal está en su forma abierta y conductora dura muy poco, del orden de milisegundos, tras lo que pasa al estado inactivado. En este estado, el filtro de selectividad estaría colapsado (no conductor) y de nuevo no se registra corriente.

La presencia de distintas conformaciones en el filtro de selectividad de los canales de potasio estaría relacionada, entre otras cosas, con la formación de estados conductores y no conductores de relevancia fisiológica (Morais-Cabral, J.H., y col., 2001; Yellen, G., 1997). El grupo del Dr. Mackinnon observó que, sorprendentemente, en presencia de bajas concentraciones de K^+ (KCl 3 mM y NaCl 150 mM) la estructura cristalográfica del filtro de selectividad sufre un cambio conformacional con respecto a la estructura en presencia de altas concentraciones de este ion (Zhou, Y., y col., 2001). El cambio más destacado radica en que, en estas condiciones, los carbonilos de los residuos V76 y G77 apuntan hacia fuera del poro, lo que impide que puedan coordinarse con los iones. De este modo, esta estructura no presenta iones en los sitios de unión S2 y S3, representando una conformación no conductora o colapsada del filtro de selectividad (figura 6), que se ha asociado a la conformación que pudiera adoptar el filtro en el estado inactivado (Zhou, Y., y col., 2001). En este caso, el grado de ocupación iónica (es decir, el número de iones presentes en el filtro al mismo tiempo) es de un ion distribuido entre dos posibles sitios de unión (S1 y S4), mientras que la conformación conductora presenta dos iones distribuidos entre cuatro posibles sitios (S1-S4) (Zhou, Y., y col., 2001-2003). Esta capacidad del filtro de adoptar dos conformaciones, una conductora y otra no conductora, sugiere que las transiciones entre estos estados podrían ser las responsables del control del flujo iónico en el filtro de selectividad (Zhou, Y., y col., 2001; Yellen, G., 2001).

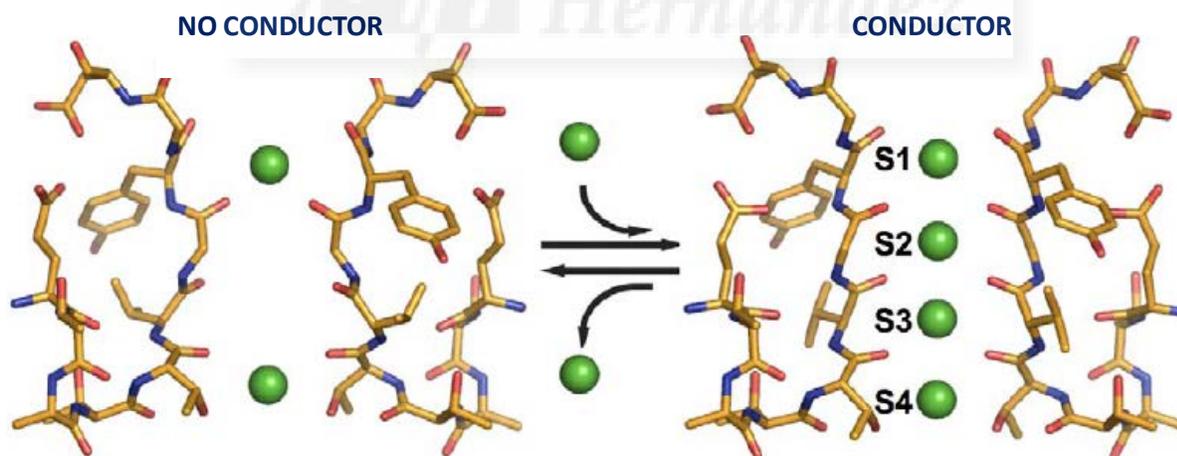


Figura 6: Equilibrio entre las dos conformaciones en las que se puede encontrar el filtro de selectividad en función de la concentración de K^+ : La conformación no conductora o colapsada presenta un ion K^+ (esferas verdes) distribuido entre dos sitios de unión (en los extremos del filtro), mientras que la conductora contiene dos iones distribuidos entre cuatro posibles sitios de unión (S1-S4) (Lockless, S.W., y col., 2007).

También se ha estudiado mediante técnicas de fluorescencia el estado conformacional del filtro de selectividad en estado *resting* (pH 7) donde los resultados indican que existen dos sitios de unión para el ion permeante K^+ . El primero de alta afinidad (bajas concentraciones), que se ha relacionado con la adopción de una conformación no conductora, y un segundo de baja afinidad (altas concentraciones), asociado a la conformación conductora. Sin embargo, para el ion bloqueante Na^+ se observó solo la presencia de un sitio de unión de baja afinidad (Renart, M.L., y col., 2006, 2010). En base a estos resultados, se ha planteado una hipótesis para la selectividad y conducción de KcsA. El primer sitio de alta afinidad para potasio, relacionado con los sitios S1 y S4 del filtro, sería, al menos en parte, responsable de la gran selectividad que tiene este canal para transportar K^+ frente a otros iones como el Na^+ , siendo 1000 veces más selectivo por K^+ que por éste a pesar de su poca diferencia de radio iónico (1,33 y 0,95 Å respectivamente) (Renart, M.L., y col., 2006, 2010). Sin embargo, una gran afinidad por K^+ estaría reñida con la alta velocidad de conducción de este ion. De ahí el cambio de conformación asociado al segundo evento de unión, pasando a ocupar los 4 sitios (S1-S4) del filtro de selectividad con una baja afinidad (Renart, M.L., y col., 2006, 2010).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el estado inactivado (pH 4) de KcsA, el filtro de selectividad está en una conformación que impide el paso de iones. Ciertos autores asocian este estado inactivado al colapso del filtro de selectividad que se da a concentraciones bajas de K^+ , mientras que otros apuestan por una conformación distinta.

Con lo expuesto en este punto se plantea un objetivo general del trabajo:

- ❖ Caracterizar el estado conformacional del filtro de selectividad del canal de potasio KcsA en estado inactivado (pH 4).

Para lograr este objetivo es necesario conocer las siguientes características específicas:

- Caracterizar la estructura terciaria de KcsA en estado inactivado mediante fluorescencia.
- Caracterizar la afinidad y el grado de ocupación del filtro de selectividad del canal de potasio KcsA por parte de los iones K^+ y Na^+ , en estado inactivado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Expresión y purificación de la proteína

Para el proceso de expresión y purificación se utilizó un plásmido pQe30 que contiene el *kcsA* al que se le había añadido una cola de 6 Histidinas para su posterior purificación por cromatografía de afinidad. El plásmido, además, contiene un gen que le otorga resistencia a ampicilina.

Con este plásmido se transformó *E. coli* M15 pRep4 (resistente a kanamicina) mediante choque térmico y se seleccionaron las bacterias transformadas haciéndolas crecer en una placa de LB agar suplementado con ampicilina (100 µg/ml concentración final) y kanamicina (25 µg/ml concentración final). Con las bacterias seleccionadas se preparó un preinóculo haciéndolas crecer a 37 °C con agitación en medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 µg/ml concentración final), kanamicina (25 µg/ml concentración final) y glucosa (0,04 % p/v) durante toda la noche. Después se preparó el inóculo en un medio 2xYT líquido, al cual se le añadieron el preinóculo, los antibióticos (ampicilina y kanamicina) y la glucosa y posteriormente, tras comprobar mediante medición de la absorbancia que la densidad óptica del inóculo era de 0,8 (mientras se incubaba en agitación a 30 °C), se adicionó IPTG (0,5 M concentración final) con el objetivo de inducir la síntesis de la proteína. Tras 2 h de incubación a 30 °C con agitación se centrifugó 15 min a 6500 xg para sedimentar las bacterias; los pellets resultantes se congelaron para su posterior procesamiento.

Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en tampón HEPES 20 mM, pH 7,5, sacarosa 0,45 M adicionado con un cocktail de inhibidores de proteasas y lisozima de huevo 0,4 mg/ml; se sonicaron en series de 45 s a potencia creciente y se ultracentrifugaron 45 min a 100000 xg para aislar la fracción de membrana. El pellet obtenido se resuspendió en tampón HEPES 20 mM, n-Dodecil-β-D-maltósido (DDM) 10 mM, imidazol 50 mM, pH 7,5 suplementado con KCl 200 mM y se terminó de disgregar mediante politrón. Tras un mínimo de 2 horas de solubilización con agitación leve se ultracentrifugó 45 min a 100000 xg para eliminar la fracción de membrana no solubilizada. Luego se mezcló el sobrenadante con un volumen adecuado de resina de Ni²⁺ y se dejó incubando con agitación leve toda la noche. Durante este tiempo la cola de Histidinas de la proteína se une a la resina. El uso de este tipo de “cola” de histidina permite su unión específica a una matriz o fase estacionaria que contiene grupos quelantes de Ni²⁺, el cual forma un complejo de coordinación entre los componentes de la fase estacionaria y el grupo imidazol de los residuos de la cola de histidinas.

Posteriormente se procedió a realizar una cromatografía de afinidad, trasvasando la mezcla a una columna cromatográfica, lavando con tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM, imidazol 50 mM, pH 7,5 suplementado con KCl 200 mM hasta que el tampón recogido tras su paso por la columna alcance una absorbancia inferior a 0,1 ($\lambda=280$ nm), y eluyendo con tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM, imidazol 500 mM, pH 7,5 suplementado con KCl 100 mM. Durante este proceso el imidazol del tampón de elución desplaza a la cola de histidina. El resultado de la elución se recogió en alícuotas de 1,5 ml, las cuales se sometieron a una electroforesis en gel de SDS-PAGE de acrilamida al 13,5%. Se conservaron las alícuotas que presentaban banda con una movilidad electroforética de 50-60 kDa según el patrón de peso molecular. Dichas alícuotas se introdujeron en membranas de diálisis y se dializaron en tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM, pH 7 suplementado con KCl 100 mM con el objetivo de eliminar el imidazol de las alícuotas. Luego se procedió a su cuantificación mediante la medida de absorbancia a 280 nm y el cálculo de la concentración mediante la aplicación de la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = C \cdot \epsilon \cdot l$$

Eq. 1

Donde A es la absorbancia medida, C es la concentración molar de la proteína, ϵ es el coeficiente de extinción molar ($34.950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y l es el paso óptico de la cubeta en cm.

3.2. SDS-Page

Se prepararon alícuotas que contenían KcsA en tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM, pH 7 suplementado con KCl 100 mM, y tampón de carga de electroforesis Tris 100 mM, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0,2%, SDS 4%, pH 6,8. Posteriormente se hicieron correr las alícuotas en un gel de acrilamida al 13,5% en presencia de SDS 0,1%. Finalmente se procedió a la tinción de los geles con azul Coomassie para su visualización.

3.3. Medición del espectro de fluorescencia intrínseca

Esta técnica se basa en que ciertas moléculas (fluoróforos) son capaces de absorber radiación electromagnética, pasar a un estado excitado y volver al estado fundamental mediante la emisión de fotones, fenómeno conocido como fluorescencia (Lackovicz, J.R., 2007).

Los fluoróforos suelen estar compuestos por enlaces conjugados y anillos aromáticos. En las proteínas, los principales fluoróforos son los aminoácidos aromáticos: triptófano, tirosina y fenilalanina. La emisión de fluorescencia en proteínas suele estar dominada por los triptófanos, debido a que presentan un

mayor rendimiento cuántico (número de fotones emitidos por fotón absorbido) (Lackovicz, J.R., 2007). Esta emisión de fluorescencia se representa mediante un espectro de emisión, en el que se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia emitida en un rango de longitudes de onda.

La fluorescencia emitida por los fluoróforos es muy sensible a su entorno, por lo que el estudio de su espectro de emisión en distintas condiciones experimentales puede aportar información valiosa sobre la estructura terciaria de la proteína en esa zona. En el caso del triptófano, el espectro de emisión se desplazará hacia menores longitudes de onda y aumentará su intensidad cuando éste pase a un entorno menos polar (por ejemplo en una región hidrofóbica de la proteína), mientras que se desplazará hacia longitudes de onda mayores y disminuirá su intensidad cuando esté expuesto a un entorno polar (por ejemplo tras la desnaturalización de la proteína) (Renart, M. L., y col., 2006, 2010; Lackovicz, J.R., 2007). Una forma matemática para describir la forma y ubicación del espectro de emisión de fluorescencia es el cálculo del “centro de masas” o longitud de onda promedio ponderada por la intensidad, $\langle \lambda \rangle$ (Lopes, D.H., y col., 2004).

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_i \lambda_i I_i}{\sum_i I_i}$$

Eq. 2

Donde I_i es la intensidad medida a una longitud de onda λ_i . El uso del parámetro $\langle \lambda \rangle$ permite seguir con alta precisión pequeños cambios en el espectro, ya que se integra información de todas las longitudes de onda del mismo.

La espectroscopia de fluorescencia resultó ser una técnica muy útil en el estudio de KcsA, gracias a que cada una de sus subunidades contiene cinco residuos de triptófano, dos de ellos ubicados en las inmediaciones del filtro de selectividad, donde se producen los principales cambios estructurales como consecuencia de la unión de iones (Doyle, D.A., y col., 1998).

El espectro de emisión de fluorescencia intrínseca fue tomado en un espectrofotómetro SLM 8000 usando cubetas de cuarzo de 0,5 cm de paso óptico en las que se introdujo la muestra solubilizada en tampón HEPES, DDM 5 mM, N-metil-D-glucamina (NMG) 5 mM, pH7. Las muestras fueron excitadas a 280 nm (máximo de absorción del triptófano) y la emisión se registró entre 300 y 400 nm en incrementos de 1 nm. Todos los datos fueron normalizados para la representación de los espectros.

3.4. Monitorización de la desnaturalización térmica por fluorescencia

La dependencia de la intensidad de fluorescencia de los triptófanos con las características del entorno también permitió estudiar el proceso de desnaturalización térmica de KcsA en distintas condiciones experimentales. La desnaturalización térmica se llevó a cabo en un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, en el que se recogió la emisión a 340 nm tras excitar a 280 nm, desde una temperatura de 25 °C hasta 98 °C a intervalos de 1 °C. Las muestras fueron diluidas en tampón DDM 5 mM, ácido succínico 20 mM y NaCl 100mM, a pH 4 hasta una concentración de 1 μM, llevadas a distintas concentraciones de la sal correspondiente (KCl o NaCl) e introducidas en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La temperatura media de desnaturalización del estado tetramérico (T_m) fue calculada mediante el ajuste matemático de los datos a la ecuación. (Triano, I., y col., 2010):

$$F_{340} = \frac{(\alpha_N + \beta_N(T - 298)) + (\alpha_D + \beta_D(T - 298))e^{\frac{-\Delta H_{D-N}}{R}(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m})}}{1 + e^{\frac{-\Delta H_{D-N}}{R}(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m})}}$$

Eq. 3

Donde F_{340} es la fluorescencia observada a 340 nm, α_N y α_D son la fluorescencia intrínseca del estado nativo y desnaturalizado respectivamente a 298 K, β_N y β_D son la pendiente de las líneas base del estado nativo y desnaturalizado respectivamente, T es la temperatura en grados K, T_m es la temperatura media de desnaturalización en grados K, ΔH_{D-N} es el cambio de entalpía de la desnaturalización y R es la constante de los gases.

La variación de la T_m en función de la concentración de ligando fue utilizada para calcular la constante de disociación K_D para el complejo KcsA-cation mediante el programa Origin (OriginLab), según la ecuación (Renart, M.L., y col., 2006, 2010):

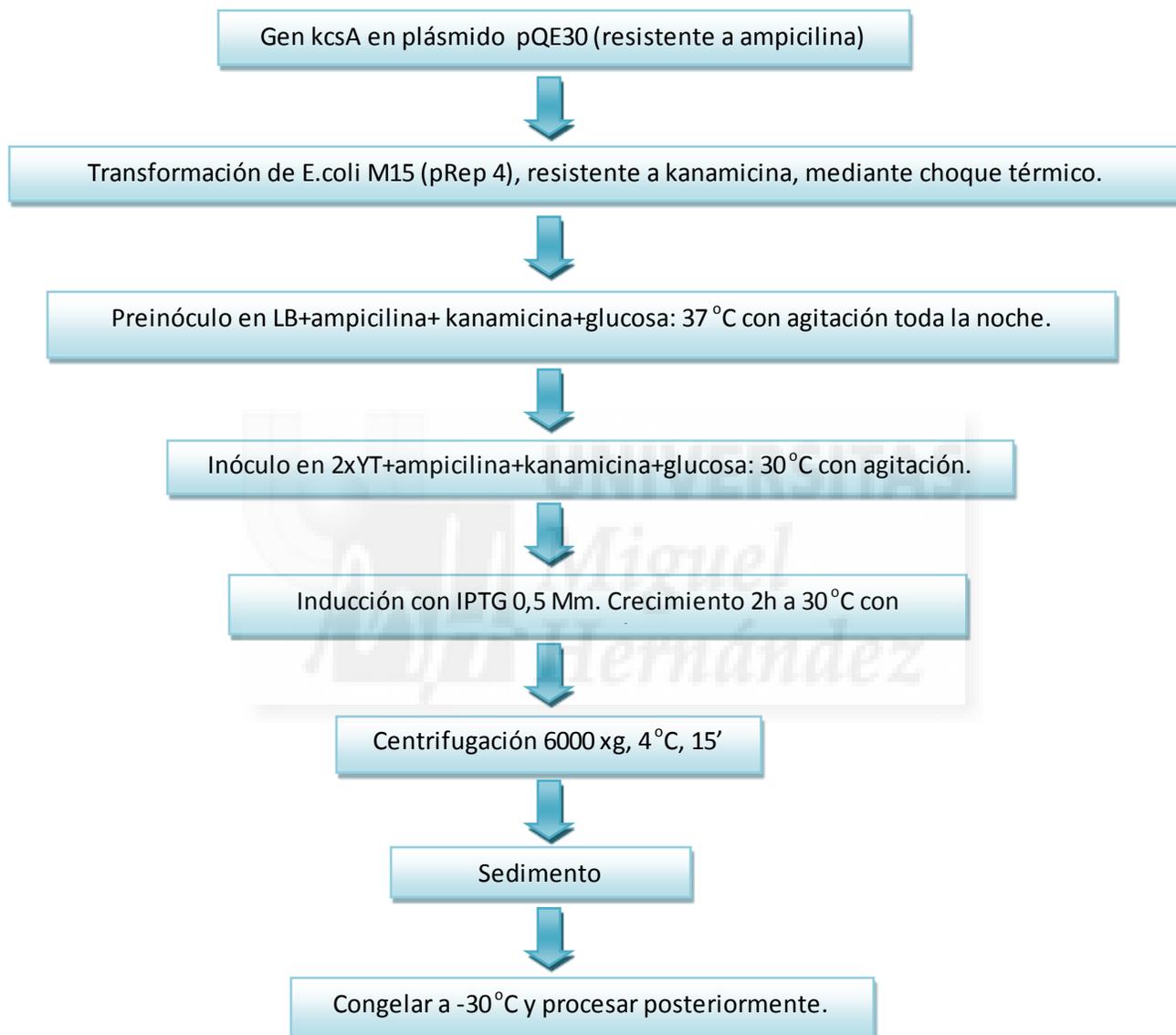
$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{T_m - (T_m)_0}{T_m} = \frac{R(T_m)_0}{\Delta H_0} \ln\left(1 + \frac{[L]}{K_D}\right)$$

Eq. 4

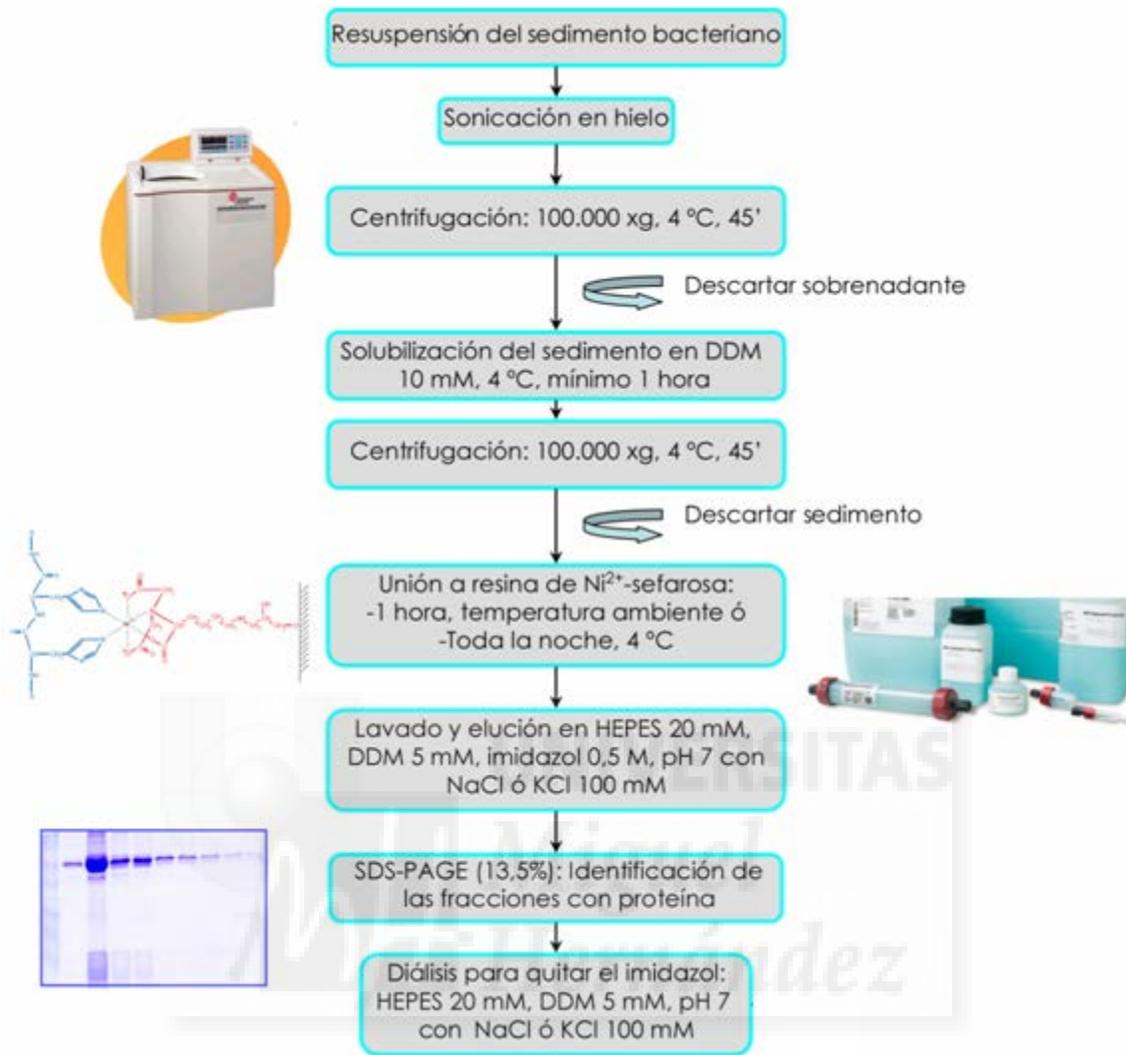
Donde T_m y $(T_m)_0$ representan las temperaturas de desnaturalización en presencia y ausencia de ligando respectivamente en grados K, R es la constante de los gases y ΔH_m es la variación de entalpía de la desnaturalización en ausencia de ligando. Para preparar las muestras por dilución se parte de una concentración mínima de Na^+ equivalente a 1,75 mM, debido a la dependencia estructural del KcsA por

la presencia de iones para mantener el estado tetramérico. De esta manera en cada muestra ya hay una concentración de 1,75 mM de Na^+ de partida. Este valor se tuvo en cuenta para el cálculo de K_D en la unión de Na^+ a KcsA.

3.5. Esquemas de los procedimientos utilizados durante el trabajo



Esquema 1: representación de los principales pasos a seguir para la producción heteróloga del canal de K^+ KcsA en *E.coli*.



Esquema 2: ilustración resumida de la purificación de KcsA a partir de los sedimentos de *E.coli* donde se indujo la producción de la proteína.

4. RESULTADOS

4.1. Purificación KcsA

Un pequeño volumen de cada fracción recogida de la columna de afinidad, utilizada durante la purificación del canal se carga en el gel SDS-PAGE 13,5%, siguiendo el orden de elución. Tras la tinción del gel con azul de coomasie se detecta principalmente una banda superior de aproximadamente 70 kDa que corresponde al tetrámero y otra de aproximadamente 17 kDa que corresponde al monómero.

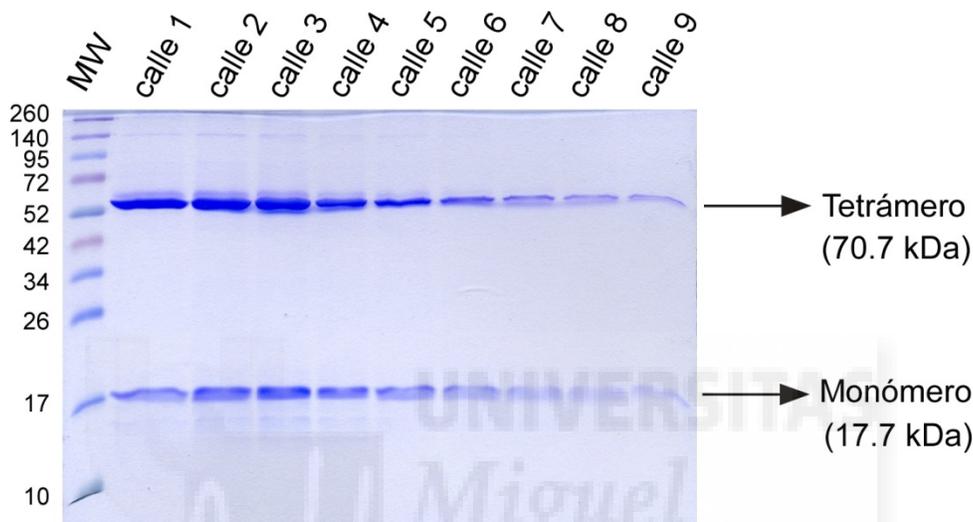


Figura 7: SDS-PAGE 13,5% obtenido tras realizar la purificación de la proteína KcsA. Cada calle corresponde a la elución de un fragmento de proteína de la cromatografía de afinidad.

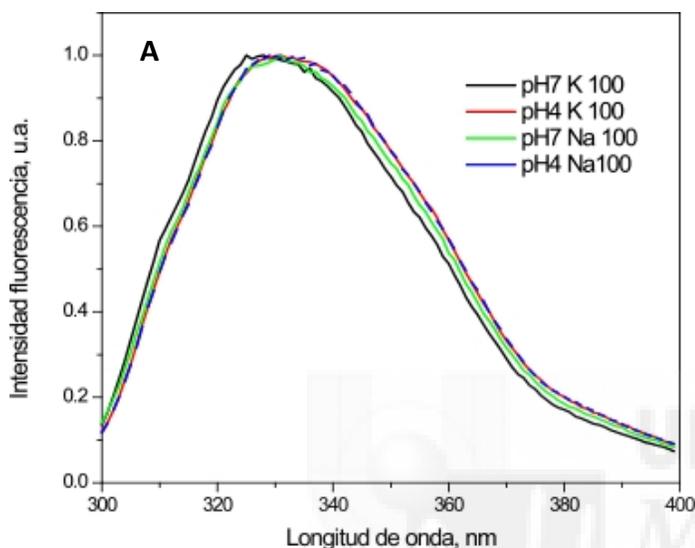
Luego de asegurarnos que la proteína se encuentra en estado tetramérico para poder caracterizarla mediante estudios de fluorescencia, se seleccionaron las alícuotas de las calles 2 y 3 que contienen más cantidad de proteína (figura 7). Posteriormente se retira el imidazol de la muestra mediante una diálisis y se cuantifica la concentración mediante absorbancia a 280 nm.

4.2. Estudio de la estructura terciaria del canal KcsA mediante fluorescencia

Aprovechando la presencia de triptófanos en la secuencia de KcsA, y con el objetivo de estudiar la estructura terciaria del canal a pH 4 y compararla con la previamente publicada a pH 7 (Renart, M.L., y col., 2006, 2010), se realizó el espectro de fluorescencia intrínseca a pH 4 en presencia de KCl 100 mM o NaCl 100 mM. También se realizó un espectro a pH 7 como control. Cabe destacar que resultados previos indican que el espectro de fluorescencia de KcsA a pH 7 sufre un desplazamiento hacia el rojo en presencia de Na^+ respecto a cuando está en K^+ . Este cambio en la fluorescencia estaría reflejando las

diferencias en la conformación que presenta en presencia de un ion conductor (K^+) o no conductor (Na^+) (Renart, M.L., y col., 2006, 2010).

Los espectros se recogieron en las mismas condiciones en todas las muestras para evitar variaciones instrumentales. La emisión de fluorescencia se registró excitando a una longitud de onda de 280 nm y se recogió entre 300 y 400 nm. Los resultados se muestran en la siguiente figura.



B	WT	$\langle \lambda \rangle$, nm
	100 mM KCl pH 7	338,58
	100 mM NaCl pH 7	339,64
	100 mM KCl pH 4	340,55
	100 mM NaCl pH 4	340,42

Figura 8: A. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del KcsA. Comparación entre los espectros de KcsA en tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM, KCl 100 mM, pH 7 (línea negra); en ácido succínico 20 mM, DDM 5 mM, KCl 100 mM pH 4 (línea roja), HEPES 20 mM, DDM 5 mM, NaCl 100 mM pH 7 (línea verde) y en ácido succínico 20 mM, DDM 5 mM, NaCl 100 mM pH 4 (línea azul discontinua). B. Resumen de los valores de $\langle \lambda \rangle$ hallados mediante el tratamiento matemático adecuado de cada uno de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de KcsA en distintas condiciones de pH.

Como se observa en las figuras 8, A y B el espectro de emisión de fluorescencia para el ion Na^+ a pH 7 ($\langle \lambda \rangle = 339,64$ nm) sufre un desplazamiento hacia el rojo con respecto al ion K^+ ($\langle \lambda \rangle = 338,58$ nm) en las mismas condiciones, lo que indica que en presencia de Na^+ (ion no conductor), KcsA presenta una estructura terciaria en la que los triptófanos se encontrarían más expuestos al disolvente o en un ambiente más polar, lo que conlleva a que pueda haber un tipo de interacciones algo diferentes con los aminoácidos adyacentes. Sin embargo, a pH 4 no se observa cambio en el espectro de emisión al pasar de Na^+ ($\langle \lambda \rangle = 340,42$ nm) a K^+ ($\langle \lambda \rangle = 340,55$ nm), por lo que para esta condición, en presencia de cualquiera de estos iones, los triptófanos estarían expuestos al disolvente de forma altamente similar. Esto sugiere que la estructura terciaria sería similar para ambos iones.

4.3. Estabilidad térmica

Tal como se ha demostrado en estudios previos, la desnaturalización de KcsA solubilizado en 5 mM DDM por temperatura comprende la disociación del canal desde el estado tetramérico al monomérico, y la pérdida parcial de la estructura de manera irreversible (Triano, I., y col., 2010). Este proceso se ha utilizado para caracterizar la unión de los iones a nuestro canal, para lo que se realiza una monitorización de la fluorescencia intrínseca emitida a 340 nm a medida que aumenta la temperatura, bajo condiciones en las cuales diferentes concentraciones de ambos iones, tanto Na^+ como K^+ , están presentes en la solución. En este experimento la proteína registra su comportamiento de forma sigmoidal cuando se representa en términos de la intensidad de fluorescencia registrada frente a temperatura. La razón de esto es que en el estado tetramérico los triptófanos emiten con mayor intensidad debido a que no están en contacto directo con el disolvente. Conforme la temperatura aumenta y la proteína se desnaturaliza comienza a observarse una caída en la fluorescencia (*quenching*), ya que los triptófanos se exponen más al disolvente durante la desnaturalización, hasta que finalmente solo se registra la fluorescencia procedente del monómero. El punto medio de la caída que representa la transición entre los dos estados se denomina T_m y da una idea de la estabilidad del canal en las condiciones estudiadas. Estos valores de T_m son característicos de la disociación térmica y el proceso de desplegamiento que es dependiente del tipo y concentración del ion presente en el tampón. Esto se debe al papel de ciertos iones en la estabilización del estado nativo de la proteína KcsA. Particularmente, los iones K^+ en concentraciones suficientemente altas aumenta la T_m a valores cercanos al punto de ebullición del agua, lo cual impide la adquisición de una buena línea base para el estado desnaturalizado en muestras acuosas (Renart, M.L., y col., 2006, 2010). Al bajar la concentración de K^+ se observa un gran descenso en la T_m proporcionando así un experimento mucho más sensible que el desplazamiento espectral anteriormente usado de la emisión de fluorescencia para probar los efectos de los iones de K^+ en la estructura y estabilidad de la proteína. En el caso del Na^+ este incremento en la T_m es más suave, no es tan notorio al disminuir la concentración como en el potasio. En la representación gráfica de la [figura 9](#) puede observarse este fenómeno.

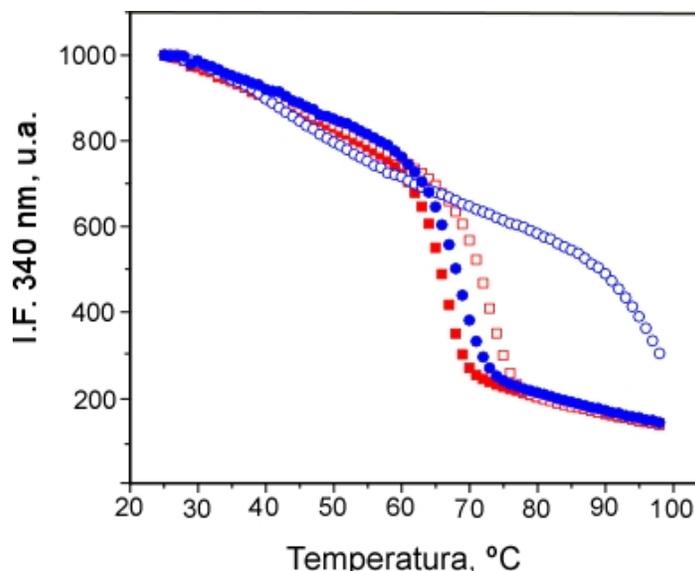


Figura 9: Monitorización de la fluorescencia de la desnaturalización térmica de KcsA solubilizado en DDM. Las trazas experimentales seleccionadas para ilustrar estos experimentos muestran los cambios en la emisión de fluorescencia intrínseca en el KcsA a 340 nm sobre la excitación a 280 nm, al incrementar la temperatura. Las muestras están realizadas en ácido succínico 20 mM, DDM 5mM, pH 4 en presencia de 1,75 mM NaCl (cuadrados rojos) o 100 mM NaCl (cuadrados blancos), y 2 mM KCL (círculos azules) o 100 mM KCl (círculos blancos).

Se observa que a mayor concentración de K^+ , mayor es el valor de la T_m , siendo 70,04 °C a 2 mM, mientras que para 100 mM la T_m no puede ser determinada debido a la gran estabilidad térmica del canal en esta condición. En el caso de Na^+ presenta un valor de T_m de 66 °C a 1,75 mM y 79,5 °C a 100 mM. Por lo tanto se puede afirmar que el aumento de la concentración del ion permeante K^+ conlleva un mayor incremento respecto al valor de T_m que en el caso del ion no permeante Na^+ , donde esta diferencia es menor.

4.4. Estudios de unión de K^+ y Na^+ al canal KcsA

La unión de K^+ y Na^+ puede evaluarse, entre otras, de las siguientes maneras: monitorizando los cambios en el espectro de emisión de fluorescencia (Renart, M.L., y col., 2006, 2010) o el aumento del parámetro T_m obtenido a partir de las curvas de desnaturalización térmica del canal con concentraciones crecientes de ambos iones (Renart, M.L., y col., 2006, 2010). Este último tipo de ensayo se realizó para verificar la unión de Na^+ y K^+ al canal y caracterizar dicha unión en términos de afinidad, número de eventos o clases de sitios de interacción y grado de estabilización en cada caso.

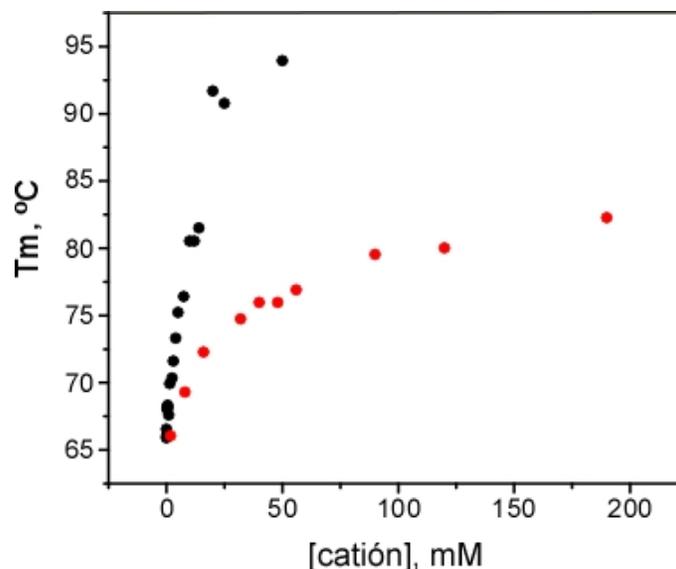


Figura 10: Dependencia de la estabilidad térmica del KcsA en función de la concentración de cationes. Círculos negros representan la estabilización de KcsA ($1 \mu\text{M}$, 20 mM ácido succínico, $\text{pH } 4$, 5 mM DDM y $1,75 \text{ mM}$ NaCl) tras la adición de cantidades cada vez mayores de KCl. Los círculos rojos representan la estabilización térmica de KcsA inducido por la unión de Na^+ al canal.

Los resultados obtenidos a través del ensayo de estabilización térmica sobre KcsA se ilustran en la [figura 10](#). Se observa que el aumento en la estabilidad térmica es debido al aumento de la concentración de K^+ , Con una concentración de K^+ de 50 mM se alcanza la máxima estabilidad térmica detectable. En el caso del ion Na^+ presenta una estabilización menor, sus T_m a diferentes concentraciones de ion están por debajo de las alcanzadas por el ion K^+ . Por lo tanto, de nuevo se constata que el ion K^+ es mucho mejor estabilizador que el ion Na^+ .

Los datos de las T_m obtenidas a distintas concentraciones se ajustaron matemáticamente con el objetivo de calcular los valores de las constantes de disociación aparente (K_D) para cada ion. ([figura 11](#) y [figura 12](#)).

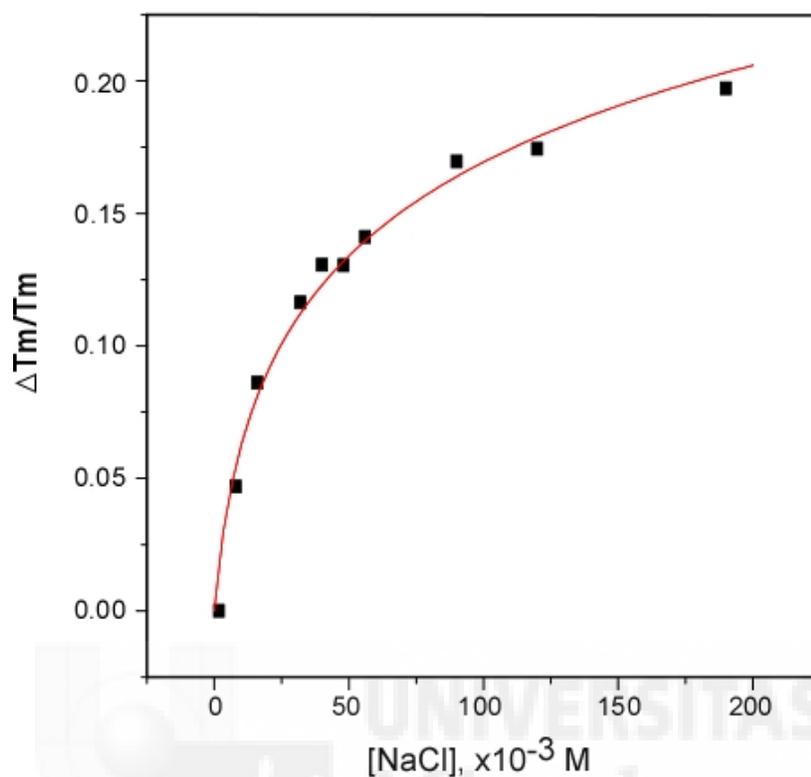


Figura 11: Determinación de la afinidad de Na⁺ a KcsA en estado inactivado. A partir de los datos experimentales de la [Figura 10](#) para Na⁺ y pH 4, y mediante ajuste con la [ecuación 4](#) (ver materiales y métodos), se obtuvo el valor de K_D (4,68 ± 1,2 mM). La línea continua representa el mejor ajuste para la unión de Na⁺ a un único lugar de unión en el canal.

El efecto del Na⁺ en la desnaturalización térmica de KcsA responde a un único evento de unión con una K_D aparente de 4,68 mM, suficiente para ajustarse a los datos experimentales.

Estos resultados se pueden contrastar claramente con los del caso del K⁺, donde el ajuste a un único evento de unión falló (de la [figura 12A](#)), siendo necesario el ajuste a dos sitios de unión ([figuras 12B y 12C](#)), lo que sugiere la existencia de dos lugares de unión termodinámicamente diferentes para el ion que parecen ser ocupados sucesivamente cuando la proteína se satura con el ion (K⁺).

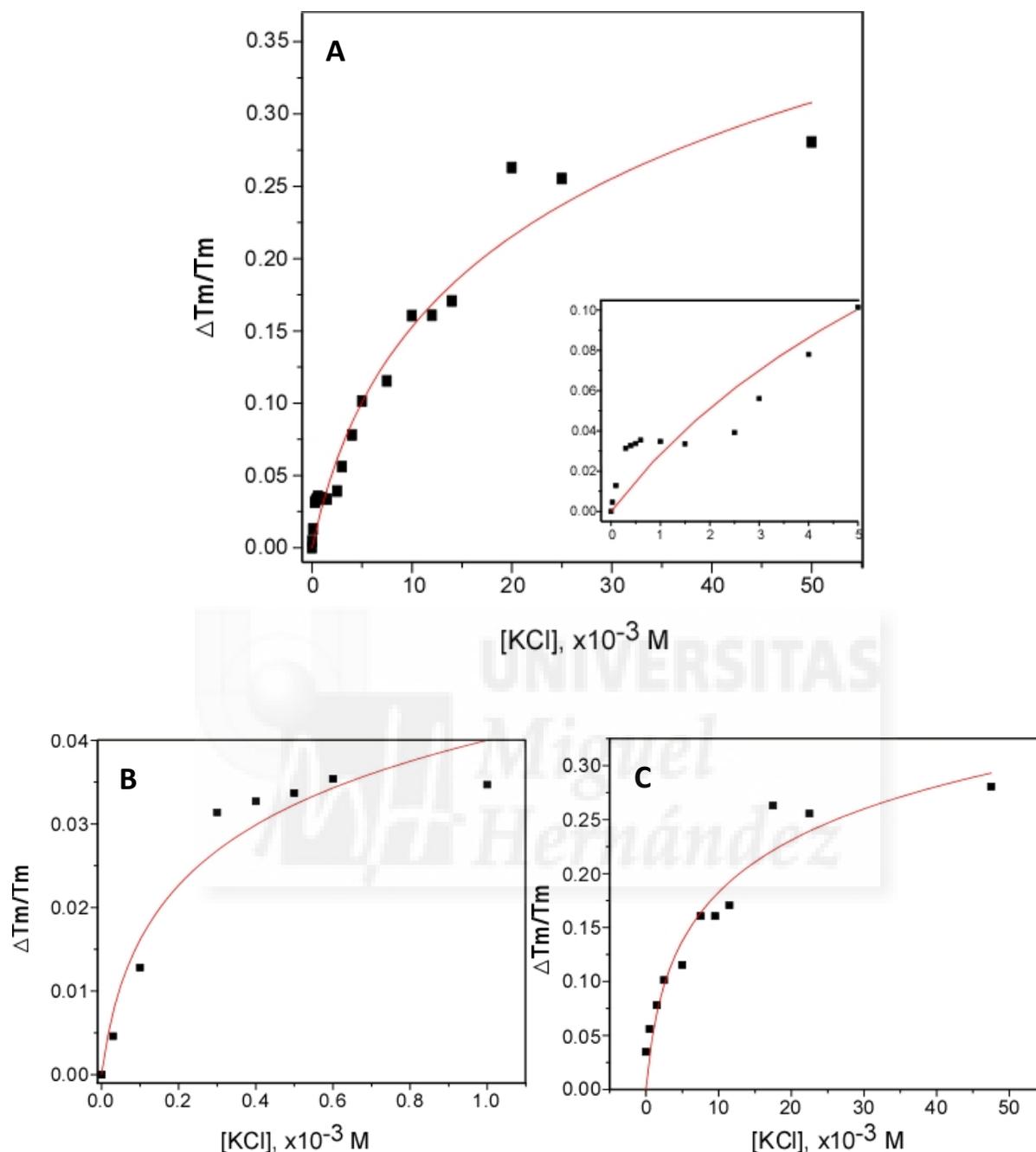


Figura 12: Determinación de la afinidad de K^+ a KcsA en estado inactivado. A partir de los datos experimentales de la [figura 10](#) para K^+ y pH 4, y mediante ajuste con la [ecuación 4](#) (ver materiales y métodos) se obtuvieron las K_D para este ion. Este ajuste falla cuando solo se tiene en cuenta un solo evento de unión ([panel A](#)). En el inset se puede ver con más detalle cómo falla el ajuste a bajas concentraciones de K^+ . Sin embargo, con dos sitios de unión, uno en el rango concentración de 0 mM a 1 mM de K^+ ([panel B](#)), y otro en el rango de concentración de 1 mM a 47,5 mM de K^+ ([panel C](#)), el ajuste es bueno. Esto sugiere la presencia de al menos dos sitios de unión para K^+ en la proteína KcsA. Las constantes de disociación (K_D) estimadas para los sitios de alta y baja afinidad de K^+ en KcsA son $0,03 \pm 0,02$ mM y $0,93 \pm 0,50$ mM, respectivamente.

A modo de resumen, en la [Tabla 1](#) se muestran las K_D y el grado de estabilización (ΔT_m) de cada uno de los eventos de unión detectados para Na^+ y K^+ a pH 4.

KcsA wt	Catión	Sitios de unión	ΔT_m (°C)	K_D (mM)
pH4	Na^+	1	16	$4,68 \pm 1,2$
pH4	K^+	2 (1er evento)	3	$0,03 \pm 0,02$
pH4	K^+	2 (2º evento)	24	$0,93 \pm 0,50$

Tabla 1: Resumen de los parámetros obtenidos tras el ajuste de los datos experimentales a la unión de Na^+ y K^+ a KcsA a pH 4.

Como se aprecia en la [tabla 1](#) el grado de estabilización de la proteína para K^+ es mucho mayor en el segundo evento de unión que en el primero.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado la conformación del filtro de selectividad de KcsA en estado inactivado (pH 4), a través de la interacción del canal con los iones K^+ y Na^+ . Se ha podido comprobar que la presencia de diferentes tipos de cationes alcalinos en el poro del canal induce determinados cambios de estructura terciaria, que si bien no son muy importantes en magnitud, sí lo son en su consecuencia sobre la estabilidad proteica. Ambos tipos de cambios fueron medibles, permitiendo caracterizar la afinidad de KcsA por cada catión.

KcsA a pH 4 presenta cambios en su estructura terciaria con respecto al estado *resting* (pH 7), reflejado en las variaciones detectadas de emisión de fluorescencia intrínseca. Para pH 7 se observan diferentes valores para el parámetro $\langle \lambda \rangle$ en cada ion (338,58 para K^+ y 339,64 para Na^+), hecho que muestra que el ion Na^+ se encuentra desplazado hacia el rojo, por lo que en su estructura terciaria sus triptófanos podrían estar más expuestos al medio o en un ambiente más polar, es decir, podrían darse interacciones diferentes con los aminoácidos adyacentes. Este fenómeno indica la presencia de dos posibles conformaciones diferentes en función del ion, hecho que apoya la presencia de un estado conductor con dos sitios de unión para el K^+ (de alta y baja afinidad) a diferencia del Na^+ que presentaría uno (Renart, M.L., y col., 2006, 2010). Para pH 4, a diferencia de pH 7, la conformación de K^+ podría ser similar a la de Na^+ , ya que sus $\langle \lambda \rangle$ son muy parecidas (340,55 para K^+ y 340,42 para Na^+). Esto podría explicarse si el filtro de selectividad estuviera en un estado colapsado (no conductor) con un solo sitio de unión como ocurre con el ion Na^+ . Sin embargo, este análisis entre iones (K^+ pH 7 - K^+ pH 4 y Na^+ pH 7 - Na^+ pH4) no sería determinante para realizar un estudio conformacional, ya que las diferencias entre iones podrían

en parte ser debidas a un cambio inespecífico por el cambio de pH, por lo tanto podrían ser resultados no concluyentes.

En cuanto a la estabilización térmica el canal presenta una mayor estabilidad en el estado inactivado (pH 4) que en el estado de reposo (pH 7), como queda reflejado con el aumento de la temperatura de desnaturalización térmica de la proteína a diferentes concentraciones para cada ion ([tabla 2](#)).

KcsA wt	Catión	Concentración(mM)	T _m (°C)
pH7	Na ⁺	1,75	52
pH7	K ⁺	2	67
pH7	Na ⁺	100	70
pH4	Na ⁺	1,75	66
pH4	K ⁺	2	70,04
pH4	Na ⁺	100	79,5

Tabla 2: Comparativa de los T_m a pH 4 contra los publicados a pH 7 (Renart, M.L. y col., 2006, 2010).

La T_m de KcsA en presencia de 2 mM K⁺ a pH 4 es 3°C mayor que a pH 7, mientras que en presencia de 1,75 mM Na⁺ a pH 4 es 14°C mayor que a pH 7. En presencia de 100 mM Na⁺ a pH 4 la T_m es 9,5°C mayor que a pH 7. Cabe destacar que la T_m en presencia de 100 mM de K⁺ no se puede determinar. Estos resultados indican que en condiciones de inactivación (pH 4) el canal presenta una estabilidad térmica mayor que en estado *resting* (pH 7), si bien podría ser en mayor o menor parte, debido a un efecto inespecífico por el cambio de pH. En cualquier caso, de estos datos se puede extraer como conclusión que las T_m del K⁺ para pH 4 son mayores que para el Na⁺, al igual que ocurre para pH 7. Por lo tanto, al contrario de lo que sugieren los espectros, esto plantea una conformación diferente para el filtro de selectividad para K⁺ respecto a Na⁺, hecho que lo asemeja con el estado *resting* (pH 7).

Por último, los resultados obtenidos del ajuste de los datos de desnaturalización térmica a concentraciones variables de iones a pH 4, muestran la presencia de dos eventos de unión, uno de alta y otro de baja afinidad para el K⁺, mientras que sólo habría uno para Na⁺, al igual que a pH 7 ([tabla 3](#)).

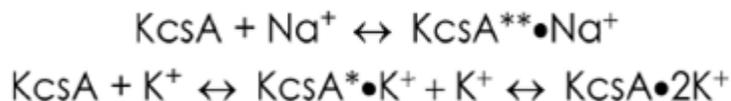
KcsA wt	Catión	Sitios de unión	K_D (mM)	ΔT_m (°C)
pH7	Na ⁺	1	3,3 ± 0,5	16
pH7	K ⁺	2 (1er evento)	0,0019 ± 0,0005	8
pH7	K ⁺	2 (2º evento)	2,5 ± 0,2	35
pH4	Na ⁺	1	4,68 ± 1,2	16
pH4	K ⁺	2 (1er evento)	0,03 ± 0,02	3
pH4	K ⁺	2 (2º evento)	0,93 ± 0,50	24

Tabla3: Comparativa de los resultados a pH 4 frente a los publicados a pH7 (Renart, M. L. y col., 2006, 2010).

Cabe destacar que los valores del ΔT_m para el ión K⁺ muestran un valor menor para el primer evento de unión, y otro mayor para el segundo en ambas condiciones (pH 4 y pH 7). Para el Na⁺ el valor ΔT_m es igual en ambas condiciones. Sin embargo los valores de estas ΔT_m para el ión K⁺ son algo diferentes por lo que se podría pensar que se aproxima al estado (pH 7) aunque no son idénticos.

Lo más destacado es que, tal y como se ha publicado para WT a pH 7 (Renart, M.L., y col., 2006, 2010), para el estado inactivado a pH 4, también hay dos sitios de unión para el K⁺, uno de alta afinidad, y otro de baja afinidad, y sólo uno para el sodio de baja afinidad. Sin embargo, se observan algunas diferencias con respecto a la unión a pH 7, ya que en el primer evento de unión hay una ligera disminución de la afinidad por K⁺ y en el segundo evento de unión hay un pequeño aumento de la afinidad por K⁺. La K_D para el evento de unión de alta afinidad a pH 4 es de 0,03 mM frente a 0,0019 mM a pH 7, y en el evento de unión de baja afinidad es de 0,93 mM a pH 4, siendo 2,5 mM a pH 7. Puesto que el primer evento de unión a K⁺ se ha relacionado con la selectividad del canal (Renart, M.L., y col., 2006, 2010), este resultado sugiere que hay una pequeña pérdida de selectividad a pH 4 con respecto a pH 7 (Starkus, J.G., y col., 1997). El segundo evento de unión ha sido relacionado con la conducción, por lo que el hecho de que el estado inactivado (pH 4) presente una ligera mayor afinidad por K⁺ que el estado *resting* (pH 7) podría estar relacionado con la pérdida de conductancia.

Para el ion Na⁺ el ajuste de los datos a pH 4 proporciona una K_D de 4,68 mM (figura 11). Este valor comparado con lo reportado a pH 7 (K_D de 3,3 mM) indica que en el estado de inactivación (pH 4) se presenta una afinidad similar por este ion en condiciones de reposo (pH 7). Esto apoya la hipótesis de que en el estado de inactivación, tal y como en el estado de *resting*, el K⁺ desplaza al Na⁺ del su sitio de unión en el filtro de selectividad. A continuación se muestran los equilibrios que se presentan en los sitios de unión a los iones:



Finalmente, de todos estos datos, podemos deducir que el estado inactivado no es equivalente al estado colapsado en el que habría un solo sitio de unión (ver [figura 6](#) de la Introducción), sino que es un estado de gran similitud al estado *resting* aunque con ligeras diferencias que serían las responsables de la disminución en la conductancia del K^+ . Estas sutiles diferencias también serían responsables del desplazamiento al rojo del espectro de fluorescencia en K^+ a pH 4, haciéndolo similar al espectro en Na^+ .

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

- El canal en estado inactivado, al igual que en el estado de reposo (pH 7), presenta dos conjuntos de sitios de unión para potasio: uno de alta afinidad a bajas concentraciones de ion (no conductora), y otra de baja afinidad a altas concentraciones de ion (conductora).
- El grado de ocupación en el estado inactivado (pH 4) del filtro de selectividad al igual que en el estado *resting* (pH 7) es de dos iones K^+ .
- El estado inactivado (pH 4) es un estado intermedio entre el colapsado y el conductor (pH 7), aproximándose más a este último.

Una vez realizado el trabajo se puede aducir que en el estado inactivado (pH 4) existen cambios conformacionales a nivel del filtro de selectividad, aunque existe la posibilidad que parte de los cambios conformacionales observados sean debido a efectos inespecíficos debido al nuevo pH del medio. Este pH ácido puede protonar residuos de la proteína y por tanto alterar la carga e influir en la interacción de los cationes con KcsA. Un experimento para comprobar si los cambios observados son debidos a la formación del estado inactivado, sería realizar experimento a pH 7 cortando con la enzima quimiotripsina el residuo C-terminal de la proteína. De este modo quedaría una proteína más corta de 125 aa, que se la conoce como mutante $\Delta 125$, que presenta a pH 7 un estado conformacional con la puerta intracelular abierta y el filtro de selectividad inactivado, al igual que para los experimentos realizados durante este trabajo (pH 4) (Cuello L.G., et al., 2010; Devaraneni P.K., et al., 2013; Lockless S.W., y col., 2007; Liu S., y col., 2012). De este modo se podrían cuantificar los cambios en el filtro y comparar los resultados obtenidos con los del presente trabajo

7. BIBLIOGRAFÍA

- Baker, K.A., Tzitolonis, C., Kwiatkowski, W., Choe, S., and Riek, R. (2007) Conformational dynamics of the KcsA potassium channel governs gating properties. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1089-1095.
- Blunck, R., Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Perozo, E., and Bezanilla, F. (2006) Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction, *J. Gen. Physiol.* 128, 569-581.
- Catterall, W. A. (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels, *Annu. Rev. Biochem.* 64, 493-531.
- Chakrapani, S., Cordero-Morales, J.F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating I: macroscopic currents, *J. Gen. Physiol.* 130, 465-478.
- Chakrapani, S., Cordero-Morales, J.F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents, *J. Gen. Physiol.* 130, 479-496.
- Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 311-318.
- Cordero-Morales, J.F., Jogini, V., Lewis, A., Vasquez, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2007) Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1062-1069.
- Cortes, D.M., Cuello, L.G., and Perozo, E. (2001) Molecular architecture of full length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating. *J. Gen. Physiol.* 117, 165-180.
- Cuello L.G., et al. (2010) Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K⁺ channels. *Nature* 466, 272-275.
- Cuello, L.G., Romero, J.G., Cortes, D.M., and Perozo, E. (1998) pH dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel, *Biochemistry* 37, 3229-3236.
- Demo, S.D. and Yellen, G. (1992) Ion effects on gating of the Ca²⁺ activated K⁺ channel correlate with occupancy of the pore. *Biophys. J.* 61, 639-648.
- Devaraneni P.K., et al. (2013) Semisynthetic K⁺ channels show that the constricted conformation of the selectivity filter is not the C-type inactivated state. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 15698-15703.

- Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science* 280, 69-77.
- Gao, L., Mi, X., Paajanen, V., Wang, K., and Fan, Z. (2005) Activation coupled inactivation in the bacterial potassium channel KcsA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17630-17635.
- Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel, *J. Gen. Physiol.* 111, 741-749.
- Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) Single *Streptomyces lividans* K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation, *J. Gen. Physiol.* 114, 551-560.
- Heginbotham, L., Odessey, E., and Miller, C. (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel, *Biochemistry* 36, 10335-10342.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels, *Nature* 417, 523-526.
- Kutluay, E., Roux, B., and Heginbotham, L. (2005) Rapid intracellular TEA block of the KcsA potassium channel, *Biophys. J.* 88, 1018-1029.
- Lackovicz, J.R. (2007) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 118, 303-314.
- Liu S., Bian X., Lockless S.W. (2012) Preferential binding of K⁺ ions in the selectivity filter at equilibrium explains high selectivity of K⁺ channels. *J Gen Physiol.* 140, 671-679.
- Lockless, S.W., Zhou, M., and Mackinnon, R. (2007) Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K⁺ channel. *PLoS. Biol* 5, e121.
- Lopes, D.H., Chapeaurouge, A., Manderson, G.A., Johansson, J.S., and Ferreira, S.T. (2004) Redesigning the folding energetics of a model three helix bundle protein by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.* 279, 10991-10996.
- Miller, C. (2000) An overview of the potassium channel family, *Genome Biol.* 1, REVIEWS0004.
- Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., and Mackinnon, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter, *Nature* 414, 37-42.
- Renart, M.L., Barrera, F.N., Molina, M.L., Encinar, J.A., Poveda, J.A., Fernandez, A.M., Gomez, J., and Gonzalez-Ros, J.M. (2006) Effects of conducting and blocking ions on the structure and stability of the potassium channel KcsA 281, 29905-29915.

- Renart, M.L., Triano, I., Poveda, J.A., Encinar, J.A., Fernandez, A.M., Montiel, A.V., Gomez, J., and Gonzalez-Ros, J.M. (2010) Ion binding to KcsA: implications in ion selectivity and channel gating, *Biochemistry* 49, 9480-9487.
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*, *EMBO J.* 14, 5170-5178.
- Shimizu, H., Iwamoto, M., Konno, T., Nihei, A., Sasaki, Y.C., and Oiki, S. (2008) Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating, *Cell.* 132, 67-78.
- Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M., and Schrempf, H. (2000) Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans*, *FEBS Lett.* 472, 83-87.
- Starkus, J.G., Kuschel, L., Rayner, M.D. and Heinemann, S.H. (1997) Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels *J. Gen. Physiol.* 110, 539-550.
- Suzuki, M., Takahashi, K., Ikeda, M., Hayakawa, H., Ogawa, A., Kawaguchi, Y., and Sakai, O. (1994) Cloning of a pH-sensitive K⁺ channel possessing two transmembrane segments, *Nature* 367, 642-645.
- Swenson, R.P., Jr. and Armstrong, C.M. (1981) K⁺ channels close more slowly in the presence of external K⁺ and Rb⁺. *Nature* 291, 427-429.
- Thompson, A.N., Posson, D.J., Parsa, P.V., and Nimigean, C.M. (2008) Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6900-6905.
- Triano, F.N. Barrera, M.L. Renart, M.L. Molina, G. Fernández-Ballester, J.A. Poveda, A.M. Fernández, J.A. Encinar, A.V. Ferrer-Montiel, D. Otzen, and González-Ros, J.M. (2010) Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein, *Biochemistry* 49, 5397-5404.
- Uysal, S., Cuello, L.G., Cortes, D.M., Koide, S., Kossiakoff, A.A., and Perozo, E. (2011) Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11896-11899.
- Uysal, S., Vasquez, V., Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F.A., Sidhu, S.S., Koide, S., Perozo, E., and Kossiakoff, A. (2009) Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6644-6649.
- Yellen, G. (1997) Single channel seeks permeant ion for brief but intimate relationship, *J. Gen. Physiol.* 110, 83-85.

- Yellen, G. (2001) Keeping K^+ completely comfortable. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1011-1013.
- Zagotta, W.N. (2006) Membrane biology: permutations of permeability, *Nature* 440, 427-429.
- Zhou, Y., and Mackinnon, R. (2003) The occupancy of ions in the K^+ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underline high conduction rates. *J. Mol. Biol.* 333, 965-975.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., and Mackinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a k^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43-48.
- Zimmer, J., Doyle, D.A., and Grossmann, J.G. (2006) NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles. *Protein Sci.* 15, 684-698.

