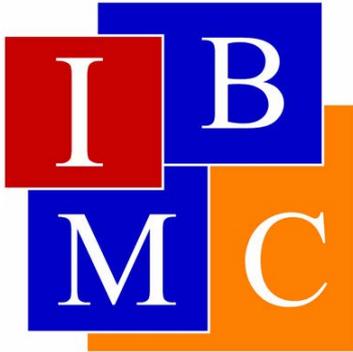


UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MUTANTES DE KcsA

TRABAJO DE FIN DE GRADO
Eduardo Puerta Baile

4º DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE AGROQUÍMICA Y MEDIO AMBIENTE

AREA DE QUÍMICA FÍSICA

TUTOR

José Antonio Poveda Larrosa

CO-TUTOR

María Lourdes Renart Pérez

CONTENIDO

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	3
3. PALABRAS CLAVE	4
4. INTRODUCCIÓN	5
A. LOS CANALES IÓNICOS: GENERALIDADES Y FUNCIÓN	5
B. LOS CANALES DE POTASIO	7
C. EL CANAL DE POTASIO KCSA	9
a) <i>Características generales</i>	9
b) <i>Características estructurales</i>	11
c) <i>Características funcionales</i>	13
5. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
A. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA	18
B. SDS-PAGE	19
C. RECONSTITUCIÓN EN LIPOSOMAS DE ASOLECTINA	20
D. OBTENCIÓN DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN LIPOSOMAS	20
E. MEDICIÓN DEL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA	21
F. MONITORIZACIÓN DE LA DENATURALIZACIÓN TÉRMICA POR FLUORESCENCIA.....	21
G. DICROÍSMO CIRCULAR.....	22
7. RESULTADOS	23
A. PURIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y	23
B. ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DE LA ESTRUCTURA TETRAMÉRICA POR SDS-PAGE DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y .	24
C. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA POR DICROÍSMO CIRCULAR DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y	25
D. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA POR FLUORESCENCIA DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y.....	26
E. CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE IONES PERMEANTES AL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y	27
F. PERMEACIÓN DE POTASIO A TRAVÉS DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y	29
8. DISCUSIÓN	30
9. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN	35
10. BIBLIOGRAFÍA	36

1. RESUMEN

En este trabajo se ha realizado un estudio sobre la relación estructura-función en canales de K^+ usando como modelo el canal procariota KcsA, una proteína integral de membrana homotetramérica que permite el flujo selectivo de iones K^+ a través de la membrana plasmática. En concreto se ha evaluado la influencia del triptófano 68, situado en la hélice del poro del canal, en la estructura y función del mismo. Para ello, se ha comparado la mutación de dicho residuo a tirosina hecha en este trabajo (W68Y), frente al mutante a fenilalanina (W68F) de un estudio anterior. Así, se ha observado una menor estabilidad a causa de la mutación W68Y, como se demuestra por la monomerización del canal en presencia de Na^+ y las bajas temperaturas medias de desnaturalización del estado tetramérico en presencia de cationes permeantes, hecho que no se observa en el mutante W68F. Aun así en ambos casos parece conservarse la capacidad del canal silvestre de interactuar de modo eficaz con los cationes permeantes K^+ , Rb^+ y Cs^+ , como se demuestra en la similitud entre las diferentes constantes de disociación obtenidas. Finalmente se ha comprobado que el proceso de conducción iónica ha sufrido cambios notables sólo para W68Y con respecto a la proteína silvestre, en diferentes parámetros como son una menor intensidad de corriente o un menor tiempo de apertura del canal. En base a estos resultados se vislumbra un papel relevante del residuo W68 en la estabilidad y función de KcsA que podrán ser desarrollados en mayor profundidad en un futuro.

2. ABSTRACT

This study has investigated the structure-function relationship in K^+ channels using as a model the prokaryotic channel KcsA, a homotetrameric integral membrane protein that allows the selective flow of K^+ ions through the plasmatic membrane. In particular, the influence of the tryptophan 68, located in the pore helix of the channel, has been evaluated on its own function and structure. With this aim, the mutation of this residue to tyrosine made in this work (W68Y), has been compared with the mutation to phenylalanine (W68F) from a previous study. It has been observed to have less stability due to the W68Y mutation, proved by the monomerization of the channel in presence on Na^+ and by the low denaturation temperatures of the tetrameric state in presence of permeant cations, a fact that has not been observed in W68F mutant. However, in both cases it seems that the capacity of the wild-type channel to interact with efficacy with permeant cations K^+ , Rb^+ y Cs^+ is conserved, as it is observed in the similarity of the obtained dissociation constants. Finally it has been found that the ionic conduction process has undergone significant changes only with respect to W68Y compared to wild-type protein, in different parameters such as a lower current intensity or a shorter channel opening time. Based on these results, W68 residue is likely to have an important role in the stability and function of the KcsA that can be investigated in-depth in the future.

3. PALABRAS CLAVE

- KcsA
- Canales de potasio
- Unión de iones
- Mutagénesis dirigida
- Fluorescencia
- Electrofisiología



4. INTRODUCCIÓN

A. LOS CANALES IÓNICOS: GENERALIDADES Y FUNCIÓN

Los canales iónicos son una clase de proteínas integrales de membrana que permiten el flujo de iones a gran velocidad ($\sim 10^7$ - 10^8 iones/segundo) y de manera selectiva a través de la membrana a favor de gradiente electroquímico y, por tanto, sin gasto de ATP (transporte pasivo). Dichos iones pueden estar implicados en procesos de despolarización de la célula o en procesos de repolarización. [1]

El nacimiento del concepto del canal iónico fue durante la década de los 50 a partir de los estudios de Alan Hodgkin y Andrew Huxley sobre el impulso nervioso en el axón del calamar gigante [2], [3]. Ellos propusieron que las corrientes de Na^+ y K^+ se daban lugar en sitios específicos de la membrana denominados “parches activos”, los cuales fueron estudiados mediante la técnica de “voltage clamp”, lo que les valió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1963. Posteriormente en 1983, se clonó la subunidad α del receptor nicotínico de acetilcolina, convirtiéndose en el primer canal iónico clonado, purificado y caracterizado a nivel molecular [4], [5]. Un gran avance en el conocimiento de los canales iónicos se dio con el desarrollo de la técnica del “patch clamp” (fijación de membrana) por Erwin Neher y Bert Sakmann. Ellos usaron un microelectrodo de vidrio con su punta pulida y lo aplicaron a la superficie de una célula, de manera que se pudiera aislar un parche pequeño de membrana. El voltaje a través de este parche se mantuvo estable por un amplificador de retroalimentación y de esta manera pudieron medir las corrientes que fluían a través de los canales presentes en él. Esta técnica que le valió el premio Nobel a sus creadores en 1991, revolucionó el estudio de los canales iónicos ya que permitió reducir el “ruido” o interferencia y registrar la actividad de un sólo canal y actualmente cada año se publican miles de trabajos realizados con esta técnica.

Ya en la década de los 90, el equipo de Roderick MacKinnon obtuvo mediante cristalografía y difracción de rayos X, la primera estructura en alta resolución del KcsA, un canal de K^+ procedente la bacteria *S. lividans* [6]. Sus posteriores estudios sobre dicha proteína y otros canales iónicos le valieron el premio Nobel de Química en 2003. Más adelante se mencionarán en esta introducción resultados correspondientes a dichas investigaciones.

Toda esta información estructural y funcional posibilitó la entrada de la investigación sobre canales iónicos en el área de la investigación médica, adoptándose el término canalopatía para designar a los trastornos producidos por la mutación o disfunción de estas proteínas de membrana.

Los canales se pueden clasificar en canales abiertos (pasan la mayor parte del tiempo con su compuerta abierta, permitiendo el paso de iones sin regulación), o en canales tipo compuerta [7], los cuales pasan la mayor parte del tiempo cerrados, alternando entre dos conformaciones (abierta y cerrada) dependiendo de la acción de un estímulo externo, proceso conocido como *gating*. Dicho estímulo varía en función del tipo de canal, pudiendo ser la unión de un ligando, el campo eléctrico de la membrana o ambos. Los estados abiertos a menudo se convierten espontáneamente en estados inactivados que no conducen iones (Fig. 1). 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.

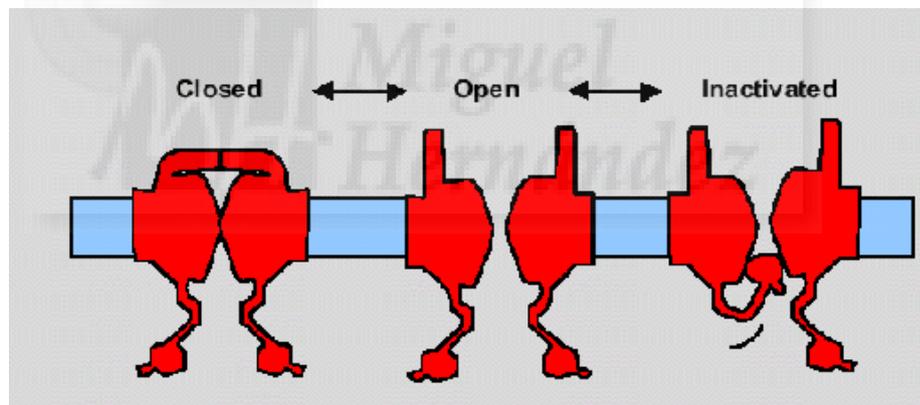


Fig. 1: Transición entre los estados cerrado, inactivado y abierto en un canal iónico

En función de qué estímulo controla la apertura y cierre de dichos canales se clasifican en [7]:

- **Canales activados por ligando:** El cambio depende de la unión de un ion o molécula. A su vez pueden clasificarse en:
 - Ionotrópicos: El ligando es un ion.
 - Metabotrópicos: El ligando es un mensajero intracelular.

- **Canales activados por voltaje:** El cambio se produce dependiendo de la diferencia de potencial de la membrana celular.
- **Canales activados por estímulos mecánicos:** El cambio se produce por un cambio físico, como un aumento de temperatura o un aumento de tensión en la membrana celular.

B. LOS CANALES DE POTASIO

Los canales de potasio conducen iones K^+ a través de la membrana celular a favor del gradiente electroquímico. Intervienen en varios procesos celulares como la regulación de volumen celular, la secreción hormonal o la producción del impulso nervioso en células excitables. [8]

Se pueden encontrar en bacterias, arqueas y células eucariotas (tanto de plantas como de animales). La primera secuencia correspondiente a un canal de potasio fue la del canal *Shaker* obtenida por Tempel y cols. [9] mediante la secuenciación de una región del genoma de *Drosophila Melanogaster*. Posteriormente Schwarz y cols., Timple y cols. y Kamb y cols. [10]–[12] encontraron varios subtipos de canales de K^+ en dicho genoma, poseyendo todos una región central común (signature sequence o secuencia firma) y difiriendo en los extremos carbonilo y amino. Dicha diversidad se produce por un proceso denominado splicing alternativo de intrones (Fig 2). Esta secuencia firma ha demostrado estar muy conservada incluso entre canales procedentes de diferentes especies de organismos, [13] tanto eucariotas como procariotas. (Fig. 2)

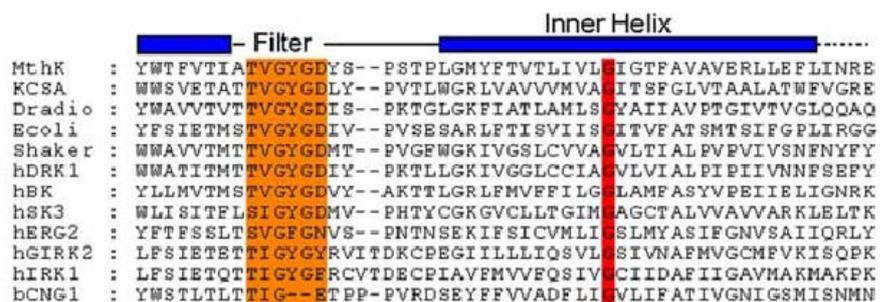


Fig. 2: Comparación de la secuencia primaria de distintos tipos de canales de K^+ tanto de origen procariota como eucariota. En naranja se puede observar la secuencia firma, altamente conservada.

Existen muchas variedades de canales de K^+ , la mayoría de ellas activadas por voltaje, diferenciándose entre ellas principalmente por la presencia o no de inactivación y por la

distinta afinidad a diversas toxinas; aunque también existen canales de potasio activados por Ca^{2+} , proteínas G o poliaminas.

Atendiendo a la topología podemos clasificar a los canales de K^+ en:

- Canales formados por 2 segmentos transmembrana (M1 y M2) y 1 poro. También son llamados canales rectificadores de entrada (K_{IR}).
- Canales formados por 6 segmentos transmembrana (S1, 2, 3, 4, 5 y 6) y 1 poro. A este grupo pertenecen los canales voltaje-dependientes (K_{V}). Además de esta descripción topológica general, existen variaciones a nivel estructural como los canales activados por Ca^{2+} , los cuales presentan un segmento transmembrana extra cercano al amino terminal.
- Canales formados por 4 segmentos transmembrana (M1, 2, 3 y 4) y 2 poros o $\text{K}_{2\text{P}}$. Mientras que canales K_{IR} y K_{V} se ensamblan como tetrámeros, los canales $\text{K}_{2\text{P}}$ se supone que forman dímeros a fin de mantener la simetría de 4 subunidades α alrededor del poro.

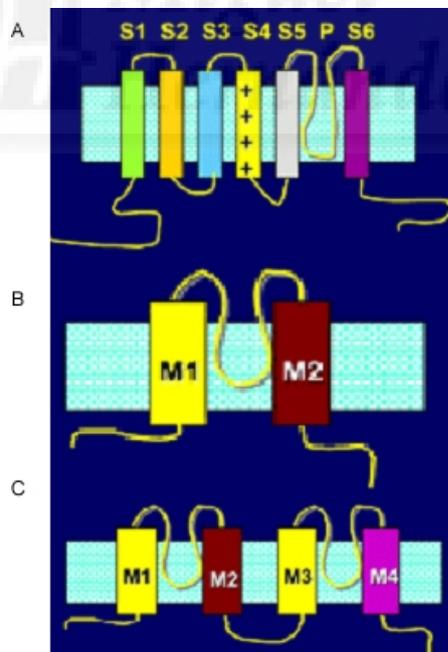


Fig. 3: Clasificación de los canales iónicos atendiendo a su topología. Todos los canales se representan con su extremo N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha. (A) Canales K_{V} , de 6 segmentos transmembrana (S1-S6). El S4 actúa de sensor de voltaje. (B) Canales K_{IR} , de 2 segmentos transmembrana (M1, M2). (C) Canales $\text{K}_{2\text{P}}$, de 4 segmentos transmembrana (M1-M4)

Como se puede observar en la **Fig. 3** cada tipo de canal contiene un “loop” transmembrana que contiene la secuencia firma, y que se localiza entre los segmentos S5 y S6 en los K_v , entre M1 y M2 en los K_{IR} , y los K_{2P} tienen dos: uno entre M1 y M2, y otro entre M3 y M4. Este “loop” transmembrana, también conocido como “loop” P lleva incorporado el filtro de selectividad, que es la estructura formada por la secuencia de la firma y la responsable de seleccionar a K^+ frente a Na^+ (bloqueador fisiológico). También se puede observar que en los canales de tipo K_v el segmento transmembrana S4 actúa como sensor de voltaje, gracias a una secuencia de aminoácidos rica en arginina y lisina. Estos canales presentan además la particularidad de presentar el dominio conocido como T1, altamente conservado, ubicado en la zona amino terminal. Esta estructura estaría relacionada con la oligomerización del canal. [14]–[16]

C. EL CANAL DE POTASIO KCSA

a) Características generales

El canal KcsA es un canal de K^+ procariota clonado de *Streptomyces lividans*, una bacteria gram positiva, filamentosa, y la primera estructura de canales resuelta por el grupo del prof. MacKinnon. [6] A pesar de ser un canal procariota de 2 segmentos transmembrana por subunidad, su estructura está muy próxima a los canales eucariotas activados por voltaje de 6 segmentos transmembrana. En particular, su secuencia en la región del poro, localizada entre los segmentos transmembrana y portadora de la secuencia firma, es casi idéntica a las halladas en el canal Shaker de *Drosophila* y otros canales de K^+ activados por voltaje pertenecientes a vertebrados. [6]

```

atg ccg ccc atg ctg agc ggc ctg ctg gcg cgc ctg gtg aaa ctg
M P P M L S G L L A R L V K L
ctg ctc ggg cgc cac ggc agt gcg ctg cac tgg cgc gcc gcg ggc
L L G R H G S A L H W R A A G
gcg gcg acc gtg ctg ctg gtg att gtg ctg ctg gcg ggc tcg tac
A A T V L L V I V L L A G S Y
ttg gcg gtc ctg gcg gaa cgc ggc gcg ccg gcc gcg cag ctg att
L A V L A E R G A P G A Q L I
acc tat ccg cgc gcg ctg tgg tgg tcc gtg gaa acc gcg acc acc
T Y P R A L W W S V E T A T T
gtg ggc tat ggc gat ctg tat ccc gtg act ctg tgg ggc cgc ctg
V G Y G D L Y P V T L W G R L
gtg gcg gtg gtg gtg atg gtg gcg ggc att acc tcc ttc ggt ctg
V A V V V M V A G I T S F G L
gtg acc gcc gcg ctg gcc acc tgg ttc gtc gcc cgg gaa caa gag
V T A A L A T W F V G R E Q E
cgc cgc ggc cat ttt gtg cgc cac tcc gag aag gcc gcc gag gag
R R G H F V R H S E K A A E E
gcg tac acg cgg acg acc cgg gcg ctg cac gag cgt ttc gac cgt
A Y T R T T R A L H E R F D R
ttg gag cga atg ctc gac gac aac cgc cgg tga
L E R M L D D N R R -

```

Fig. 4: 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.

Como se puede ver en la **Fig. 4** la secuencia del KcsA consta de 483 pb (70,6% de G+C) que codifican para una proteína de 160 aminoácidos. y 17,6 KDa. En la secuencia aparece la típica secuencia firma presente en los canales iónicos subrayada, y un análisis de hidrofobicidad demuestra la presencia de 2 hélices transmembrana. [17]

El equipo del prof. MacKinnon determinó por cristalografía y difracción de rayos X la estructura del canal desde la posición 23 hasta la 119 (los extremos N y C-terminales no fueron resueltos), concluyendo en que el KcsA es un homotéramero con simetría central alrededor del poro, formado por cuatro subunidades (cada una de las cuales con su propio extremo N y C-terminal citoplasmáticos), teniendo cada subunidad 2 hélices α transmembrana conectadas por los 30 aminoácidos de la región del poro, que consiste en la torreta, la hélice del poro y el filtro de selectividad con la secuencia firma (TVGYG) [6]. Más

recientemente se ha descrito que el tetrámero de KcsA puede también autoasociarse formando unas asociaciones supramoleculares llamadas “clusters”. [18]

b) Características estructurales

La primera estructura cristalina obtenida del KcsA fue en 1998 a una resolución de 3,2 Å [6] pudiendo solo resolverse la región transmembrana perteneciente a los aminoácidos 23-119, la cual presenta una forma de cono invertido de 34 Å, de diámetro 25 Å para el lado intracelular y 40 Å para el lado extracelular. En la **Fig. 5B** se pueden apreciar los dos “anillos” aromáticos, uno cercano a la cara extracelular (W67, 68, 87) y otro cercano a la intracelular (W26, 113), los cuales se ha propuesto que estabilizan la estructura proteica dentro de la membrana lipídica.

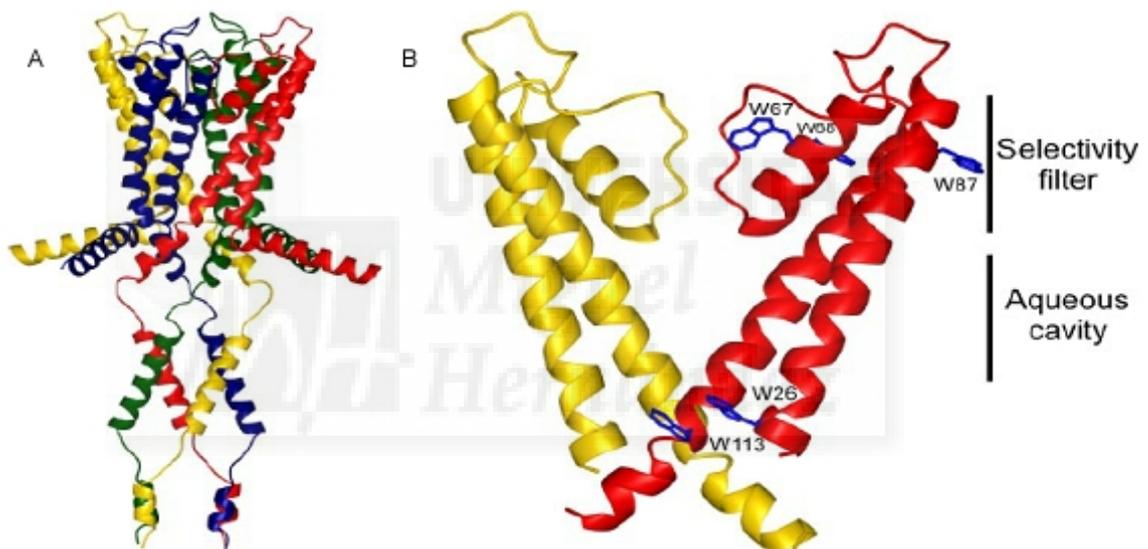


Fig. 5: Representaciones de la estructura cristalina del KcsA. **(A)** Representación en cintas de la estructura completa (1-160) del KcsA a partir de los modelos de Cortes y cols. [19] y Doyle y cols. [6]. Los monómeros se muestran en diferentes colores. **(B)** Representación de la región transmembrana de del canal, (solo se han representado 2 subunidades para mejorar la claridad del dibujo) indicando la posición del filtro de selectividad y la cavidad acuosa. También se han representado los 5 residuos de triptófano en una de las subunidades. [20]

Los estudios cristalográficos, combinados con los datos provenientes de otras técnicas estructurales, permiten diseccionar claramente la estructura de KcsA en regiones con características bien definidas:

- **Dominio N-terminal:** éste segmento no ha podido resolverse en ningún caso mediante difracción de rayos X debido a su elevada movilidad. En la **Fig 5A** se puede observar una representación en la que se situaría en la interfase lípido-agua de la membrana, y que se orienta de tal manera que no interacciona con el resto del canal. No obstante, mediante comparaciones con estudios realizados en otros canales similares [21], [22], se presupone más una orientación tangencial al poro, rodeándolo, en lugar de alejarse de él.
- **Dominio C-terminal:** Al igual que en el caso del dominio N-terminal, los primeros experimentos con cristalografía de rayos X no resolvieron el extremo C-terminal. Sin embargo, este dominio sí ha sido resuelto en experimentos posteriores [23], mostrándolo como un conjunto de hélices α de 70 Å de longitud que se extendían en el citoplasma y que mediante puentes de hidrógeno y salinos entre cadenas laterales de ciertos aminoácidos de cadenas adyacentes, mantenían la estabilidad. Se ha demostrado que el dominio C-terminal influye sobre la estabilidad térmica de la proteína, además de mejorar la eficacia de la tetramerización durante los procesos de plegamiento y ensamblaje [24].
- **Hélices transmembrana:** El KcsA por cada una de sus 4 subunidades tiene dos hélices transmembrana: M1 y M2. M1 es la hélice externa que interacciona con los lípidos de la membrana, mientras que M2 se orienta hacia el poro de forma inclinada (unos 25° con respecto a la membrana) y ligeramente curvada de forma que las subunidades se abren como los pétalos de una flor hacia el lado extracelular. Ciertos aminoácidos de esta zona del canal están involucrados en los movimientos del canal asociados al proceso de *gating*. [24]
- **Cavidad acuosa:** Se sitúa cerca de la mitad de la membrana, tiene un diámetro de 10 Å y está formada en su mayoría por aminoácidos hidrofóbicos, con el objetivo de presentar una superficie inerte a los iones y facilitarles el paso. Contribuye a disminuir la barrera electrostática que debe superar el catión para pasar la membrana lipídica mediante el mantenimiento de la esfera de hidratación del catión dentro de esta estructura. [6]

- **Hélice del poro:** Se sitúa en la mitad del canal más próxima al medio extracelular y el KcsA presenta 4 (1 por tetrámero). Al igual que la cavidad central, participa en el proceso de disminuir la barrera electrostática que debe superar el ion. Para ello se dispone de manera que el extremo carboxi terminal apunte hacia dentro del canal y el amino terminal hacia fuera; esto genera un potencial electrostático negativo que ayuda al ion a alcanzar el centro de la membrana, donde llegará a la cavidad central. [6]
- **Filtro de selectividad:** Estructura con una longitud de unos 12 Å y un diámetro interno de unos 3 Å formado por la secuencia firma (T₇₅VGYG₇₉), la cual dispone sus cadenas laterales hacia el interior proteico y los grupos carbonilos de su esqueleto hacia el poro, formando así una serie de anillos de oxígeno que a su vez forman entre ellos una serie de sitios adecuados para la coordinación de un ion K⁺ deshidratado, numerados del 1 al 4 desde extracelular a intracelular (S1-S4). Así el ion tiene solo una pequeña distancia para difundir entre un sitio y otro dentro del filtro de selectividad. Además, se considera que justo por encima del S1 se encuentra el denominado sitio externo, S_{ext} o S0, en el cual el K⁺ comienza a deshidratarse/hidratarse. Las cadenas de la tirosina 78 de la secuencia TVGYG interactúan con los triptófanos de la hélice del poro, formando una red de interacciones que se comporta como una capa de muelles, manteniendo el diámetro apropiado para el poro [25], [26].

c) Características funcionales

El canal KcsA es un canal con una baja probabilidad de apertura (~ 0.1), debido a que tras entrar en el estado abierto por la acción de pH ácido intracelular el canal entra en un estado de inactivación del cual se recupera lentamente volviendo a subir el pH a 7. [27], [28]

El canal KcsA tiene una gran selectividad para el K⁺ frente a otros iones como el Na⁺, teniendo entre 20 y 100 veces más preferencia por K⁺ que por éste a pesar de su poca diferencia de radio iónico (1.33 y 0.95 Å respectivamente) [20]. Varias teorías se han desarrollado para explicar el proceso de selectividad K⁺/Na⁺. La más simple indica que cuando un ion entra en el canal de K⁺, se deshidrata. Para compensar el coste energético de esta deshidratación, los átomos de oxígeno de los carbonilos deben ocupar el lugar de los átomos de oxígeno del agua, manteniendo un íntimo contacto con el ion y actuando como una esfera de hidratación. El ion K⁺ encaja perfectamente en esta “jaula” formada por los

carbonilos, a diferencia del Na^+ . En este caso, la rigidez de esta parte del poro impediría la acomodación de este ion, causando que sea mucho más difícil asumir el coste energético del reemplazo de la esfera de hidratación [29]. Por otro lado, algunos autores proponen que el filtro de selectividad sí es lo suficientemente flexible para acomodar cationes de diversos radios iónicos, y que las propiedades electroestáticas (como el momento dipolar) de los carbonilos que recubren el filtro serían los responsables de la selectividad, más que la geometría que delimitarían estos grupos si estuviesen en un entorno rígido [30]. De cualquier manera, el o los mecanismos responsables de la selectividad en canales de potasio todavía son materia de estudio en el ámbito científico.

El filtro de selectividad puede adoptar 2 conformaciones. Una de ellas en presencia de alta concentración de K^+ ($> 20 \text{ mM}$) y se denomina conductora, y otra en presencia de bajas concentraciones de K^+ ($\sim 5 \text{ mM}$) que se denomina no conductora o colapsada, ya que la ruta por la que discurren los iones K^+ ha sido alterada (Fig 6). A la conformación conductora se la ha asociado con un estado de baja afinidad por K^+ , mientras que a la no conductora se la ha asociado con un estado de alta afinidad por cationes permeantes. [31]



Fig. 6: Representación del equilibrio entre las dos conformaciones del filtro de selectividad detectadas mediante cristalografía y difracción de rayos X. Las condiciones utilizadas para detectar cada conformación fueron: 5 mM KCl + 150 NaCl para la colapsada (Código PDB: 1K4D) y 200 mM KCl para la conductora (Código PDB: 1K4C). [6], [25], [26]

En contraposición a estos dos “sets” de sitios de unión K^+ , el Na^+ tiene solo un “set” de sitios y aunque el KcsA no permite prácticamente el paso de iones Na^+ , la unión de éstos a su “set” de sitios de unión contribuye a la estabilidad de la proteína. [32]

Para el proceso de conducción iónica a una alta velocidad, Morais-Cabral y cols. [33] propusieron un modelo a partir de las estructuras cristalográficas. En él, dos iones K^+ acceden al filtro de selectividad. La entrada de un tercer ión K^+ causa la salida concertada hacia el medio extracelular de un ión K^+ (que se encontraba previamente en el filtro) por repulsión electroestática, produciéndose de esta manera la conducción. En base a este modelo, podemos encontrar las siguientes configuraciones dentro del filtro: 1- K^+ , 2-agua, 3- K^+ , 4-agua (configuración 1-3) y 1-agua, 2- K^+ , 3- agua, 4- K^+ (configuración 2-4) (Fig. 7).

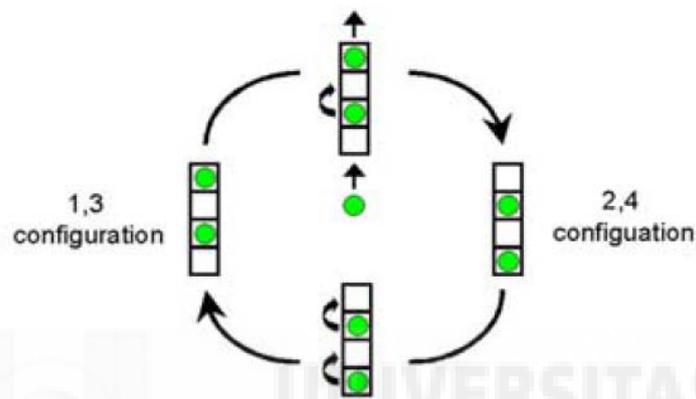


Fig. 7: Representación del mecanismo implicado en la conducción iónica.

El KcsA, además del K^+ también permite el paso (con menor velocidad) a una determinada serie de iones denominados iones permeantes (Rb^+ , Cs^+ , Tl^+ y NH_4^+), en contraposición a los iones no permeantes (Na^+ , Ba^+ y Li^+) que no pueden pasar y actúan como bloqueadores. Un ejemplo de ion permeante distinto al K^+ es el Rb^+ , el cual tiene un sistema de conducción basado en la ocupación de los sitios S1, 3 y 4 (a diferencia del K^+ que también ocupa el S2), una saturación de la conducción a concentraciones del ion superiores a 100 mM (no presente en el K^+) y se ha comprobado que en presencia de este ion la inactivación ocurre 10 veces más despacio [28], [34]. Otro ejemplo de ion permeante es el Cs^+ . Aunque inicialmente se le consideró como un ion no permeante [35], posteriores estudios sugieren que el paso de iones Cs^+ por el canal hace que éste adopte una conformación conductora, lo que incita a pensar que sí es un ion conductor. [36]

El proceso de *gating* o apertura y cierre en KcsA está regulado por dos “puertas”. La primera de ellas se corresponde con el entrecruzamiento en el C-terminal de las hélices TM2 (residuos 112-119), entrecruzamiento que se rompe a pH ácido, provocando la apertura del canal por la cara intracelular [37]. La segunda de ellas se encuentra asociada al filtro de

selectividad y regulada mediante la denominada inactivación de tipo C, un proceso lento por el cual el canal entra en una conformación no conductora y sensible a la concentración externa de K^+ . Este proceso depende de la red de puentes de hidrógeno entre los aminoácidos de la llamada “triada de inactivación”, formada por Asp80, Trp67 y Glu71 [38], [39]. (Fig. 8)

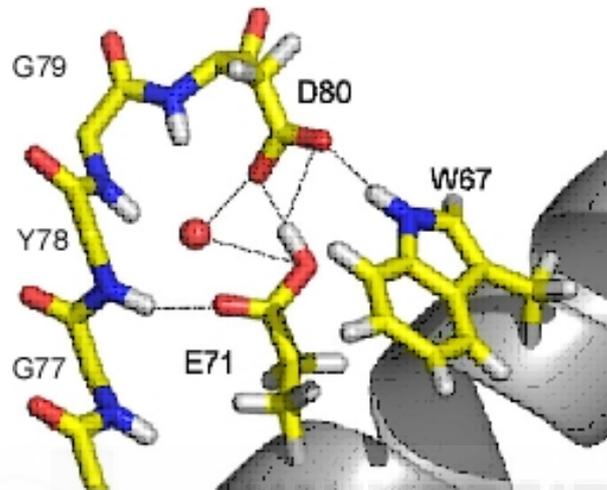


Fig 8: Estructura cristalina en alta resolución publicada por Mackinnon y cols. del filtro de selectividad y estructuras adyacentes. Los puentes de hidrógeno entre Glu71, Trp67 y Asp 80 están implicadas en la inactivación de tipo C, formando la denominada triada de inactivación. [40]

De esta manera, al bajar el pH el entrecruzamiento entre las TM2 se rompe, provocando que el canal entre en el estado abierto. Este movimiento mecánico favorece las interacciones de la triada de inactivación de una manera todavía no descrita, provocando que el canal solo se mantenga abierto un corto periodo de tiempo [37].

5. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El canal KcsA se ha tomado como modelo de estudio de los canales de K^+ , debido a que fue el primer canal del que se resolvió su estructura, a su gran similitud con el resto de canales de K^+ (incluidos los eucariotas), a su gran resistencia a las condiciones experimentales adversas, a la menor complejidad que sus equivalentes eucarióticos y a que puede obtenerse en cantidad suficiente y con un elevado grado de pureza como para desarrollar diferentes tipos de estudios biofísicos.

En el siguiente trabajo se pretenden continuar la línea de investigación llevada a cabo por el equipo que incluye: caracterizar el canal de K^+ KcsA, estudiar el proceso de selectividad presente en su función y estudiar el fenómeno de inactivación rápida (o inactivación de tipo C) en la cual está implicada una estructura: el filtro de selectividad. Este filtro contiene cuatro sitios de unión teóricos y puede adoptar dos conformaciones diferentes: conductora y no conductora o colapsada (como se explicó en la sección 4.C.c). Esta última conformación se ha propuesto para describir el estado inactivado del canal (abierto pero no conductor). En base al modelo propuesto por el equipo del Dr. Perozo [38] la inactivación del canal KcsA vendría regulada por las interacciones de puentes de hidrógeno (explicadas en la sección 4.C.c) entre 3 aminoácidos: la llamada triada de inactivación compuesta por Asp80, Glu71 y Trp67.

Mediante mutagénesis dirigida se ha obtenido un mutante, llamado 3WF-W68Y en el cual 3 de los 5 Trp (Trp26, 87 y 113) presentes en cada monómeros se han reemplazado por Phe y el Trp68 se ha reemplazado por Tyr, quedando como único Trp el 67, el cual funcionará como “reporter” fluorescente de los cambios conformacionales que se produzcan en el filtro de selectividad. Se ha elegido el Trp68 para mutar a tirosina debido a su posición cercana al filtro de selectividad, a su cercanía al Trp67, que haría más fácil monitorizar las posibles alteraciones estructurales y funcionales presentes en la proteína; a su alta conservación (junto con el Trp67) en canales eucariotas y procariotas; y debido a su estudio en experimentos anteriores en los cuales se mutó a fenilalanina [41] (mutante 3WF-W68F).

En base a esto, los objetivos de este trabajo son:

- Caracterizar estructuralmente el canal mutante 3WF-W68Y embebido en micelas de DDM.
- Explorar la acción de iones permeantes y bloqueadores sobre la estructura y estabilidad del mutante de KcsA.
- Caracterizar funcionalmente el canal mutante 3WF-W68Y reconstituido en liposomas de asolectina.
- Comparar el nuevo mutante creado para este trabajo con el mutante 3WF-W68F utilizado en trabajos anteriores.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

A. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA

Para el proceso de expresión y purificación se utilizó un plásmido pQe30 que contiene el *kcsa* en el cual se han sustituido los Trp26, 87 y 113 por Phe y el Trp68 por Tyr mediante mutagénesis dirigida, a la 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 transformados 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, las cuales 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 cocktail de inhibidores de proteasas Roche 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 sedimento 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⁺-sefarosa (General Electric) 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.

Posteriormente se procedió a realizar una cromatografía de afinidad, trasvasando la mezcla a una columna cromatográfica (BioRad, 3x50 cm), 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 His. 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% y 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:

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot l$$

Eq. 1

Donde A es la absorbancia medida, C es la concentración molar de la proteína, ε es el coeficiente de extinción molar ($14440 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y l es el paso óptico de la cubeta en cm.

Para su posterior uso en ensayos con diferentes iones, después de esta diálisis se volvieron a dializar diferentes alícuotas frente al mismo tampón, pero sustituyendo KCl 100 mM por RbCl 100 mM, CsCl 100 mM o NaCl 1M dependiendo del ion que se quisiera poner a prueba.

B. SDS-PAGE

Se prepararon alícuotas que contenían 3WF-W68Y en tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM, pH7 suplementado con KCl 100mM, NaCl 1 M, RbCl 100 mM o CsCl 100 mM según la alícuota, y tampón de carga de electroforesis Tris 50 mM, Glicerol 6%, Azul de bromofenol 0,004%, SDS 2%, 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 Coomasie para su visualización.

C. RECONSTITUCIÓN EN LIPOSOMAS DE ASOLECTINA

Se prepararon vesículas unilaminares de asolectina (L- α -fosfatidilcolina, Soy PC, Avanti Polar Lipids) a 10 mg/ml, en HEPES 10 mM a pH 7,5 adicionado con KCl 100 mM y se almacenaron en N₂ líquido [24].

Se mezcló la proteína solubilizada en tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM, pH7 suplementado con KCl 100mM con la asolectina, previamente sonicada, según una relación lípido/proteína en peso de 100/1, y se eliminó el detergente mediante la adición de BIO-BEADS SM-2 (BioRAD) a una relación en peso de 100:1 atendiendo a la cantidad de DDM utilizado y luego se dejan en agitación leve durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó 65 min a 300000 xg para aislar los proteoliposomas formados y finalmente se resuspendió en tampón HEPES 10 mM, pH 7 suplementado con KCl 100 mM a una concentración final de lípido de 0,1 mg / μ l. y se dividió en alícuotas de 20 μ l que se congelaron a -80 °C para su almacenamiento.

Para formar liposomas gigantes multilamelares, se colocan 5 μ l de la mezcla de los proteoliposomas en un portaobjetos de vidrio y se deja secar durante toda la noche en un desecador a 4°C. Al día siguiente la muestra se rehidrata con 20 o 10 μ L de HEPES 10 mM (pH 7.0).

D. OBTENCIÓN DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS EN LIPOSOMAS

Los registros de “patch clamp” se realizaron en parches formados por proteoliposomas gigantes usando un sistema automático de “patch clamp” con perfusión externa (Nanion Technologies). Se utilizaron chips NPC-I de borosilicato con resistencias de 8 M Ω . Al comenzar, se aplicó una presión negativa para colocar una vesícula de asolectina en la abertura del chip y como resultado se formó un parche de membrana en la apertura, dando lugar a un sello. Después de la formación del sello, se llevó a cabo un lavado con el correspondiente tampón intracelular. Las corrientes se registraron usando un amplificador EPC-10 (HEKA Electronic) con una ganancia de 10 o 50 mV/pA. Los datos fueron digitalizados a 8 kHz y se filtraron a 1,6 kHz y se analizaron utilizando el programa de ordenador Clampfit (Axon Instruments). Todas las medidas fueron tomadas a temperatura ambiente, con una

solución extracelular compuesta por el tampón 10 mM HEPES (pH 7) y una solución intracelular compuesta por el tampón 10 mM MES, pH 4, ambas soluciones con las condiciones iónicas indicadas (100 mM KCl).

E. MEDICIÓN DEL ESPECTRO DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA

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 295 nm y la emisión se registró entre 302 y 400 nm en incrementos de 1 nm. La fluorescencia registrada proviene únicamente del Trp67 (puesto que el resto han sido reemplazados por distintos aminoácidos) y contiene una contribución despreciable de emisión por parte de las Tyr. Todos los datos fueron normalizados para la representación de los espectros. Para calcular el centro de masas del espectro de emisión ($\langle \lambda \rangle$) se utilizó la siguiente ecuación [20]:

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

Eq. 2

Donde I_i es la intensidad de fluorescencia medida a una longitud de onda λ_i en nm.

F. MONITORIZACIÓN DE LA DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA POR FLUORESCENCIA

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, mientras la temperatura aumentaba a razón de 0.6 °C/min de manera que se tomaban los registros a intervalos de 1 °C. Las muestras fueron diluidas en tampón HEPES, 5 mM de DDM, 5 mM de NMG, pH7 hasta una concentración de 1 μM, llevadas a distintas concentraciones de la sal correspondiente (KCl, RbCl y CsCl) 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 la introducción de datos en el programa KaleidaGraph (Synergy Software) y el ajuste se realizó usando la ecuación [42]:

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

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-cación mediante el programa Origin (OriginLab), según la ecuación [43]:

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

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_0 es la variación de entalpía de la desnaturalización en ausencia de ligando. Al no tener ninguna muestra con ausencia de ligando debido a la dependencia estructural del mutante por la presencia de iones para mantener el estado tetramérico, se le restó a cada concentración la menor usada para cada ion (1.5 mM en el caso de K^+ y 6.5 en el caso de Rb^+ y Cs^+), de manera que la K_D real se obtiene sumando dicha concentración a la obtenida mediante el ajuste a la **Eq. 4**.

G. DICROÍSMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (Far-UV CD) fueron obtenidos en un espectropolarímetro Jasco J810, a una velocidad de escaneo de 100 nm/min y una resolución de 0,2 nm. Las muestras se midieron en cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico. La elipticidad molar por residuo $[\Theta]_{MRW}$ se calculó según la ecuación [44]:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{PM \cdot \theta}{10 \cdot l \cdot c \cdot (N - 1)}$$

Eq. 5

Donde θ es la medida de la elipticidad en grados, l es el paso óptico en cm, c es la concentración de KcsA en g/ml y N es el número de aminoácidos. Representando dicha elipticidad molar por residuo frente a la longitud de onda se realizó la deconvolución del espectro en los diferentes tipos de estructura secundaria mediante el programa CDNN (Applied photophysics)

7. RESULTADOS

A. PURIFICACIÓN Y EXPRESIÓN DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y

Con el fin de purificar el mutante 3WF-W68Y, se indujo su expresión en *E. Coli* M15 (como se explicó en la sección de métodos), se extrajo de la bacteria y finalmente se aisló mediante una cromatografía de afinidad. Las alícuotas obtenidas tras la elución de la columna cromatográfica se sometieron a una electroforesis (**Fig. 9**) para comprobar si la purificación tuvo éxito y se observó que varias alícuotas presentaban la característica banda correspondiente al tetrámero. También se observó, con una menor intensidad, la banda perteneciente al monómero.

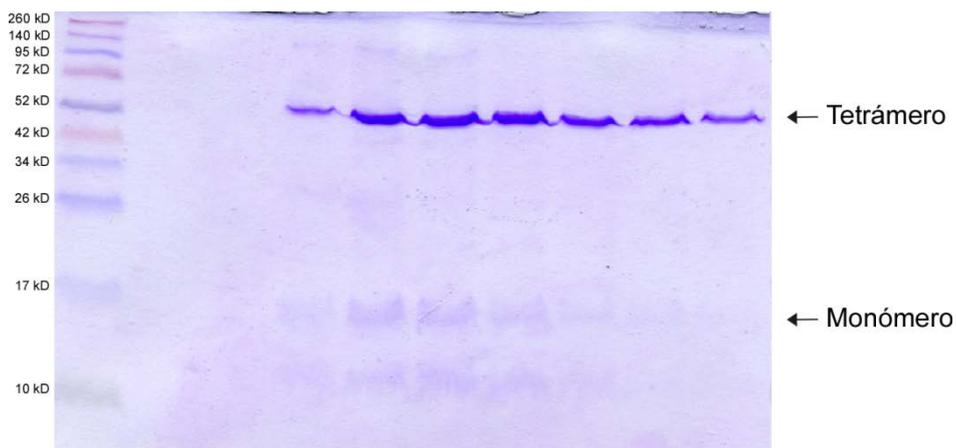


Fig. 9: Resultado de la purificación del mutante 3WF-W68Y. Las alícuotas se hicieron correr a través de un gel de acrilamida al 13,5%. La banda obtenida a 50-60 kDa se corresponde con el tetrámero, y la de 15 kDa con el monómero.

Posteriormente se procedió a realizar una cuantificación de la proteína purificada, la cual indicó que el rendimiento de la purificación fue de 0,16 mg KcsA/L de medio de cultivo, un rendimiento 10 veces menor al que se obtendría en la purificación del canal silvestre (WT).

B. ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DE LA ESTRUCTURA TETRAMÉRICA POR SDS-PAGE DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y

Tras la purificación y la posterior diálisis, se procedió a comprobar el estado de la proteína en términos de estructura tetramérica para una serie de iones conductores y no conductores de KcsA (K^+ , Rb^+ , Cs^+ y Na^+). Para ello se realizó una electroforesis (Fig. 10) y se comprobó la presencia o ausencia de tetrámero.

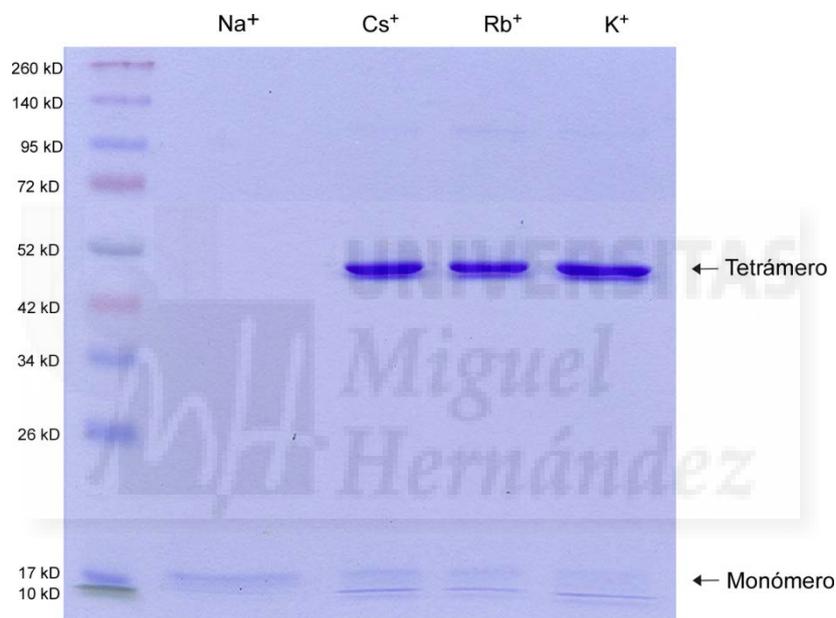


Fig. 10: Comprobación de la estructura cuaternaria de los mutantes 3WF-W68Y en KCl 100 mM, RbCl 100 mM, CsCl 100 mM o NaCl 1M según la muestra. Las alícuotas se sometieron a una electroforesis en gel de acrilamida al 13,5% en presencia de SDS al 0,1%. La banda con una movilidad electroforética de \approx a 50 kDa se corresponde con el tetrámero, y la de 15 kDa con el monómero.

Como se puede comprobar en K^+ , Rb^+ y Cs^+ la banda del tetrámero está presente, indicando que la proteína conserva su estructura tetramérica; mientras que en Na^+ solo se puede apreciar la banda perteneciente al monómero, indicando que la proteína no ha conseguido retener la estructura cuaternaria, aun habiendo usado una concentración muy alta del ion (1 M).

C. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA POR DICROÍSMO CIRCULAR DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y

Para el estudio de la estructura secundaria de la proteína se procedió a obtener el espectro de dicroísmo circular en el UV lejano y, tras su deconvolución, el porcentaje de aportación de cada tipo de estructura secundaria al total.

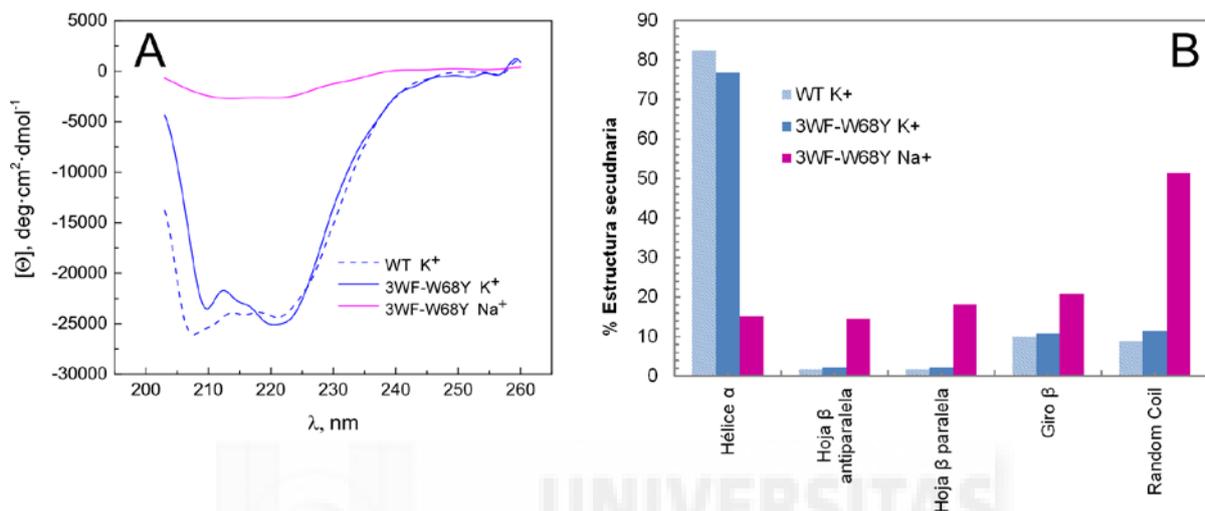


Fig 11: Análisis de la estructura secundaria mediante Dicroísmo circular (CD). **(A)** Espectro de CD en la región del UV lejano de la proteína WT (K^+ 100 mM) y 3WF-W68Y (K^+ 100 mM o Na^+ 1 M) obtenido mediante un barrido entre 203 y 260 nm. Las muestras estaban disueltas en tampón HEPES, 5 mM de DDM, 5 mM de NMG, pH7 **(B)** Deconvolución de los espectros obtenidos en sus respectivos tipos de estructuras secundarias expresadas en porcentaje.

Como puede verse en la **Fig. 11A**, la proteína 3WF-W68Y en presencia de K^+ mantiene casi la misma estructura secundaria que la proteína WT, siendo predominante la estructura en hélice α (como se puede comprobar por su forma con los típicos mínimos a 208 y 222 nm) aunque su porcentaje en esta estructura es ligeramente menor que en el WT (**Fig. 11B**), lo cual podría explicarse por la débil banda a 15 KDa presente en la electroforesis que indica la presencia de una pequeña fracción de la proteína en estado monomérico. La proteína 3WF-W68Y en presencia de Na^+ se observa que tiene una gran contribución de estructura desordenada o “random coil”, más incluso que de hélice α , debido a su estado monomérico en presencia de este ion (**Fig. 11B**), lo cual hace que en la **Fig. 11A** presente una forma mucho más próxima a una estructura irregular que a la de hélice α .

D. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA POR FLUORESCENCIA DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y

Para estudiar la estructura terciaria se obtuvo el espectro de fluorescencia intrínseca para el canal WT (en K^+ y Na^+) y el 3WF-W68Y (en K^+ , Rb^+ , Cs^+ y Na^+) excitando a una longitud de onda de 295 nm, en la cual el Trp67 es el único contribuyente a la intensidad de fluorescencia (la Tyr también pero a esa longitud de onda su contribución es despreciable). La forma y el desplazamiento de este espectro dependerán del entorno que rodee al Trp67.

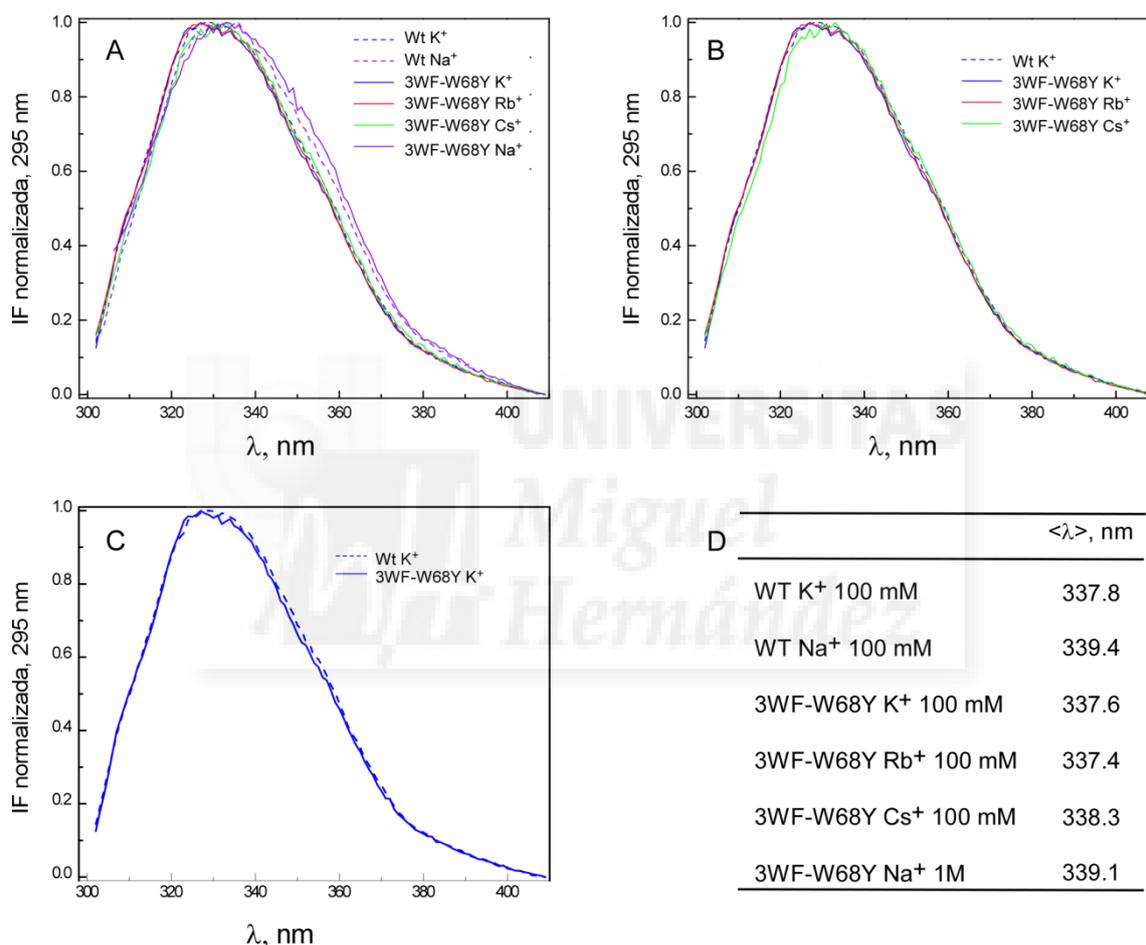


Fig. 12: Cambios inducidos por los cationes en la fluorescencia intrínseca del KcsA 3WF-W68Y. **(A)** Comparación global entre los espectros correspondientes a diferentes muestras de Wild Type (en tampón HEPES, 5 mM de DDM, 5 mM de NMG, pH7 con KCl 100 mM o NaCl 100 mM según la muestra) y 3WF-W68Y (en tampón con KCl 100 mM, Rb 100 mM, CsCl 100 mM o NaCl 1M según la muestra). **(B)** Comparación entre los espectros del mutante 3WF-W68Y en tampón HEPES, 5 mM de DDM, 5 mM de NMG, pH7 con KCl 100 mM, Rb 100 mM, CsCl 100 mM o NaCl 1M según la muestra. **(C)** Comparación entre los espectros de Wild Type y 3WF-W68Y, ambas en tampón HEPES, 5 mM de DDM, 5 mM de NMG, pH7 con KCl 100 mM. **(D)** Representación en tabla de los centros de masas calculados para cada muestra.

El rendimiento cuántico relativo de la proteína 3WF-W68Y fue de un 35 % con respecto al WT, lo cual tiene su explicación en que el mutante solo tiene un triptófano por monómero emitiendo fluorescencia, mientras que el WT tiene 5.

Como se ve en las **Fig. A y B** el espectro de WT en K^+ se encuentra desplazado hacia el azul con respecto al del Na^+ . Viendo la **Fig. 12A, B, C, D** se observa que en presencia de iones conductores (K^+ , Rb^+ , Cs^+) el espectro se mantiene igual en 3WF-W68Y y con respecto del WT es muy similar. En el caso del Na^+ , tanto el mutante como el WT se encuentran desplazados hacia el rojo con respecto a los iones conductores (**Fig. 12A, D**).

E. CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE IONES PERMEANTES AL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y

Posteriormente se procedió a estudiar el proceso de unión de diferentes iones al filtro de selectividad y la conformación del mismo, para lo cual se realizó una monitorización de la fluorescencia emitida a 340 nm a medida que aumentaba la temperatura. En este experimento la proteína registra su comportamiento de forma sigmoideal cuando lo representamos en términos de a intensidad de fluorescencia registrada frente a temperatura. La razón de esto es que en el estado tetramérico los Trp emiten más intensamente debido a que no están en contacto directo con el disolvente. Conforme la temperatura avanza y la proteína se desnaturaliza comienza a verse una caída en la fluorescencia, ya que los Trp 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. Como se ve en la **Fig. 13** a partir de las representaciones de las gráficas de la proteína en K^+ 100 mM y 1,5 mM a mayor concentración de un determinado ion permeante, mayor es el valor de la T_m , siendo 77,9 °C a 100 mM y 59,7 a 1,5 mM. Comparando las gráficas de los iones K^+ , Rb^+ y Cs^+ a 100 mM se ve que el K^+ es el que presenta mayor T_m (77,9 °C), seguido por el Rb^+ (72,9 °C) y por el Cs^+ (69,8 °C).

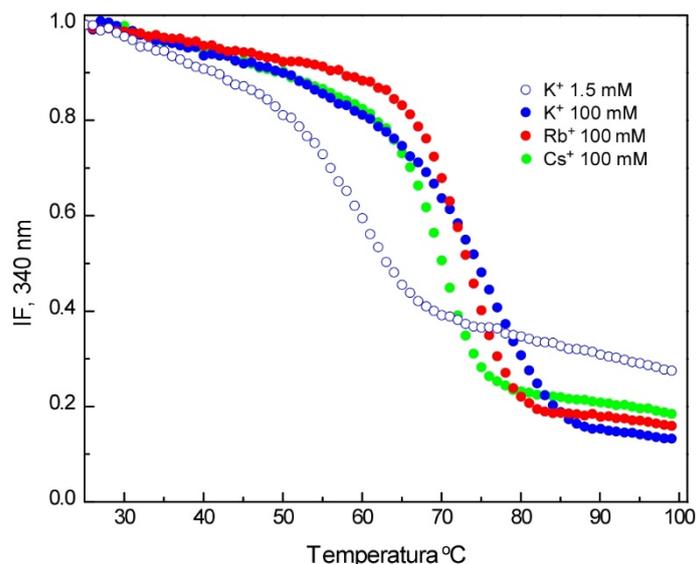


Fig. 13: Monitorización de la intensidad de fluorescencia a 340 nm durante la desnaturalización térmica de los mutantes 3WF-W68Y disueltos en tampón HEPES, DDM 5 mM, NMG 5 mM, pH7 en presencia de distintas concentraciones de la sal correspondiente (100 mM en el caso de RbCl y CsCl, y 1,5 y 100 mM en el caso de KCl).

Los datos de las T_m obtenidos a distintas concentraciones del ion correspondiente se ajustaron matemáticamente con el objetivo de calcular los valores de las constantes de disociación (K_D) para cada ion. Los valores obtenidos para los distintos iones fueron 6,7 mM para el K⁺, 9,4 mM para el Rb⁺ y 11,3 mM para el Cs⁺ (Fig 14).

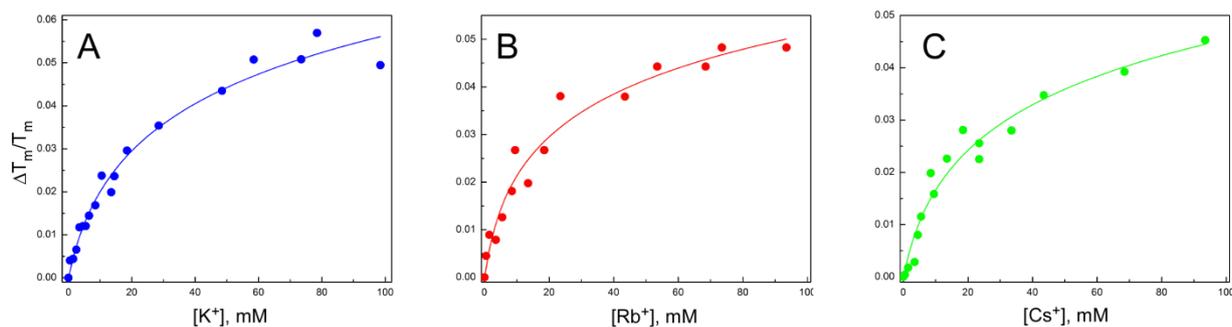


Fig. 14: Obtención de la K_D para K⁺ (A), Rb⁺ (B) y Cs⁺ (C) a partir de las T_m obtenidas en el experimento de desnaturalización térmica. A las K_D obtenidas por el ajuste se les ha de sumar el valor de la concentración más baja de la que se ha obtenido T_m para cada ion para obtener el valor corregido de, que en el caso del K⁺ es 6,7 mM (5,2 + 1,5), en el caso del Rb⁺ es 9,4 mM (2,9 + 6,5) y en caso del Cs⁺ es 11,3 mM (4,8 + 6,5).

F. PERMEACIÓN DE POTASIO A TRAVÉS DEL CANAL MUTANTE 3WF-W68Y

Para estudiar la actividad del canal, se utilizó la técnica de “patch-clamp”, en la cual se generó un parche de membrana a partir de liposomas en los cuales estaba embebida la proteína y se le aplicaron una serie de voltajes para registrar las corrientes de K^+ que pasan a través de ella. Se usó una solución extracelular a pH 7 y una solución intracelular a pH 4, ambas soluciones con las condiciones iónicas indicadas (100 mM KCl). Como se ve en la **Fig. 15A**, al representar el voltaje aplicado frente a la intensidad de corriente registrada se observa que la intensidad de corriente del mutante 3WF-W68Y es menor que la registrada en el WT, además de no observarse la asimetría presente en WT producida por una mayor intensidad de corriente a voltajes positivos que a negativos, conocida como rectificación de salida. También se observa un menor tiempo de apertura en el mutante y la ausencia de fluctuaciones en el estado abierto (“flickering”) a voltajes negativos. (**Fig. 15B**)



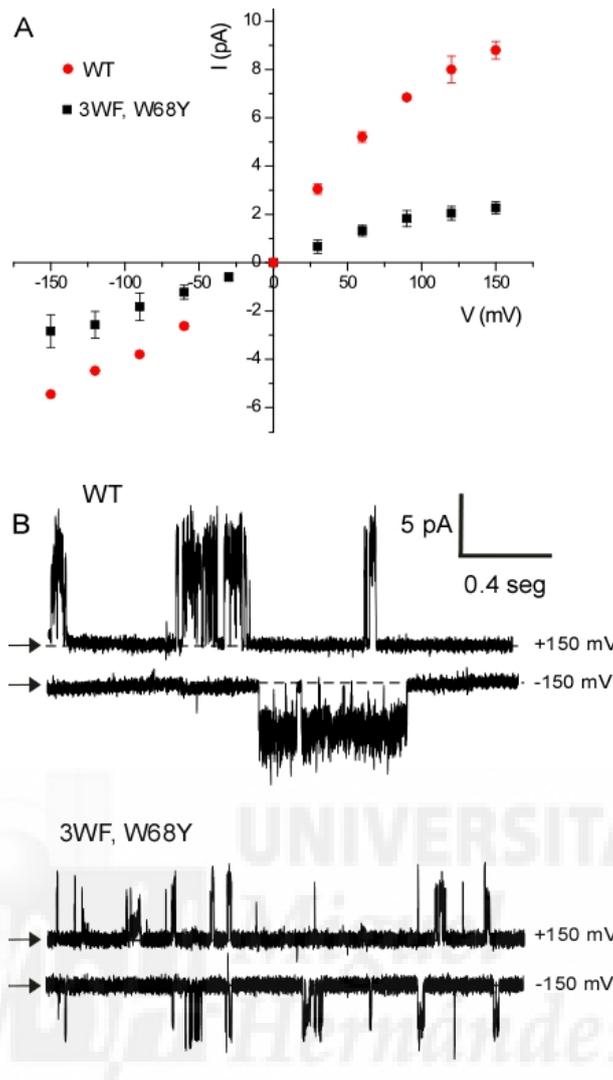


Fig. 15: Análisis de la permeación del K^+ a través del KcsA 3WF-W68Y. **(A)** Representación de la intensidad medida frente al voltaje aplicado (curva IV) de WT y 3WF-W68Y desde -150 mV hasta 150 mV de 30 en 30 mV. Los registros se tomaron con tampón intracelular MES 10 mM a pH4, 100 mM KCl, y extracelular HEPES 10 mM a pH7, 100 mM KCl. **(B)** Registros representativos tomados a +150 mV y -150 mV de WT (arriba) y 3WF-W68Y (abajo). El estado cerrado del canal se indica mediante una flecha y una línea discontinua.

8. DISCUSIÓN

Otros mutantes de Trp ya han sido usados previamente para estudiar el KcsA, con el objetivo de estudiar los efectos estructurales de la unión de iones a éste. En este caso, el objetivo es solamente conservar el Trp67 y mutar los demás a diferentes aminoácidos. Se ha comprobado que los Trp26, 87 y 113, al mutarlos a Phe conservan las características

estructurales y se expresan a rendimientos similares al WT, incluso en el caso del triple mutante W26, 87, 113F. En contraposición los mutantes del Trp67 y 68 presentan más dificultades a la hora de ser expresados, presentando menores rendimientos en su purificación y menor estabilidad, llegando al punto de que el doble mutante W67, 68F no mantenía su estructura tetramérica. [32]

Todo indica que ambos Trp 67 y 68 (**Fig. 16**) son responsables de detectar las conformaciones del filtro de selectividad (conductoras o no conductoras) de acuerdo con el tipo y concentración de cationes que haya en su entorno [32]. En estudios previos se decidió mantener el Trp67 mientras que el Trp68 se mutó, a Phe con el objetivo de conservar el carácter hidrofóbico pero perdiendo las interacciones de puentes de hidrógeno que el Trp establecía con aminoácidos de su entorno. En este trabajo se hizo la mutación a Tyr para conservar dichas interacciones pero perdiendo ese carácter hidrofóbico.

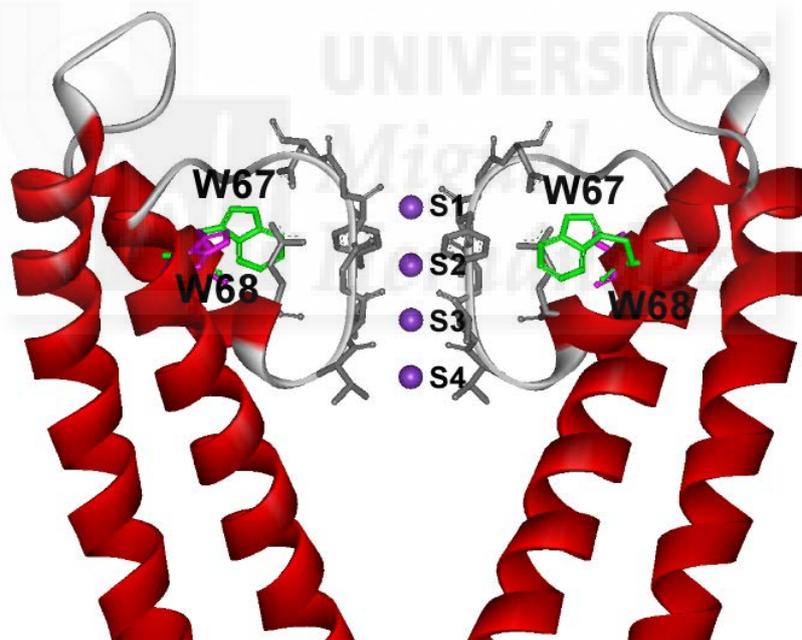


Fig. 16: Representación cristalográfica (Código PDB: 1K4C) del filtro de selectividad en la que se destaca en verde la posición relativa de los triptófanos 67 (en verde) y 68 (en magenta) en dos de los 4 monómeros que conforman el KcsA.

Los resultados de la mutación a Phe (mutante 3WF-W68F) se obtuvieron previamente en el laboratorio [41] y se resumen en la **Fig. 17**, la cual se comparará con los resultados obtenidos en el mutante 3WF-W68Y.

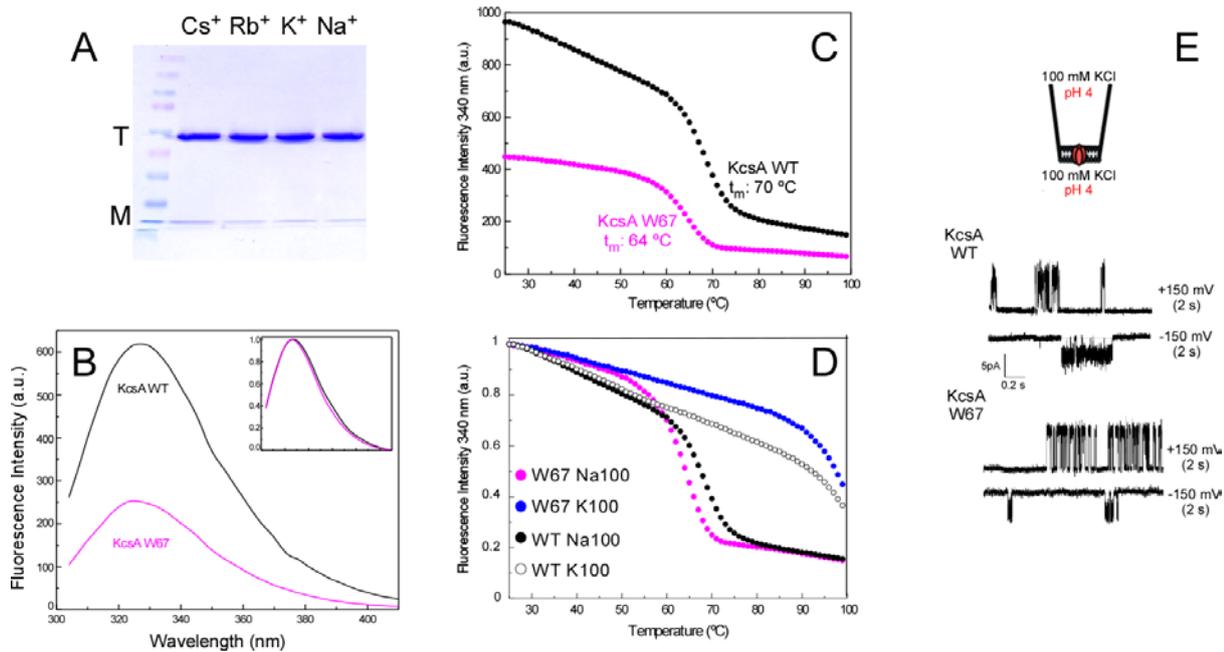


Fig. 17: Caracterización general del mutante de KcsA 3WF-W68F. **(A)** Análisis en SDS-PAGE de la integridad de la estructura tetramérica de la proteína solubilizada en detergente en tampón HEPES 20 mM, 5 mM DDM a pH 7 suplementado con 200 mM de CsCl, RbCl, KCl o NaCl (izquierda). Se indican los estados tetramérico (T) y monomérico (M). **(B)** Espectro de emisión fluorescente intrínseca del KcsA WT y 3WF-W68F (2 μ M) en tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM a pH 7 adicionado con NaCl 200 mM. 3WF-W68F retiene el 40-45% de fluorescencia de los 5 Trp del WT. **(C)** y **(D)** Comparación de la estabilidad térmica del KcsA WT y 3WF-W68F a pH 7. **(E)** Registros de “patch-clamp” en modo continuo a +/- 150 mV del KcsA WT y 3WF-W68F reconstituidos en liposomas de asolectina. La línea discontinua representa el estado cerrado. Las aperturas del canal aparecen hacia arriba (a voltajes positivos) o hacia abajo (a voltaje negativos) con respecto al estado cerrado. [41]

Al comparar la integridad de la estructura tetramérica en el mutante 3WF-W68Y (Fig. 10) y en el mutante 3WF-W68F (Fig. 17A) se puede observar que en ambos la estructura de tetrámero se mantiene excepto en el caso del Na⁺, que para el 3WF-W68Y monomeriza incluso a concentraciones de 1 M. Este hecho se ve reforzado en espectro de CD (Fig.11), donde se puede apreciar como la estructura secundaria del mutante 3WF-W68Y en K⁺ se conserva con escasas variaciones en las aportaciones relativas de cada tipo de estructura secundaria con respecto del WT, mientras que el mismo mutante en Na⁺, al haber monomerizado, se ha desnaturado parcialmente y como resultado presenta un porcentaje muy alto de estructura secundaria en “random coil”.

Como se comentó en la introducción, aunque el KcsA no permite prácticamente el paso de iones Na^+ , la unión de éstos a su “set” de sitios de unión contribuye a la estabilidad de la proteína. Estudios previos han propuesto que la localización del sitio de unión para el Na^+ (el denominado “sitio B”) se sitúa entre los sitios S3 y S4 en el filtro de selectividad, región próxima al W68 [45]. La mutación a Tyr, al perder hidrofobicidad podría implicar algún cambio en la forma del filtro en esa región y podría explicar porque este mutante no es estable en presencia de Na^+ , mientras que la mutación a Phe (que si es conservativa en términos de hidrofobicidad) sí que mantendría el sitio de unión a sodio y por tanto el estado tetramérico.

El estudio de fluorescencia intrínseca (**Fig. 12**) revela un comportamiento normal en el 3WF-W68Y en el sentido de que los iones permeantes (K^+ , Rb^+ y Cs^+) se encuentran desplazados hacia el azul con respecto a los no permeantes (Na^+). La comparación entre la **Fig. 12** y la **Fig. 17B** indica que, el espectro del 3WF-W68Y es similar al de 3WF-W68F en presencia de K^+ . Esto indicaría que el entorno del Trp 67 no se modifica significativamente cuando el residuo Trp68 se modifica a Phe o a Tyr, al menos desde el punto de vista de la fluorescencia en estado estacionario.

Los estudios de estabilidad térmica (**Fig.13**) indican que la estabilidad en el mutante 3WF-W68Y viene determinada por dos factores: La concentración del ion en la disolución, ya que la T_m a 100 mM de K^+ es 18 °C superior que la obtenida a 1,5 mM; y la permeación del ion, como se ve al comparar las gráficas de K^+ (más permeante), Rb^+ y Cs^+ (menos permeante), que presentan 77,9 °C, 72,9 °C y 69,8 °C respetivamente como valores de sus T_m a 100 mM de sus respectivos iones. Al comparar con la **Fig. 17D**, podemos observar que el mutante 3WF-W68F además de ser lo suficientemente estable en Na^+ como para presentar una gráfica de desnaturalización de tipo sigmoideal (a diferencia del 3WF-W68Y), presenta unas T_m a K^+ 100 mM similares a las del WT (de hecho eran tan altas que nos pudieron calcular), alrededor de 30 °C por encima de las del 3WF-W68Y. Este comportamiento se puede explicar por la conservación de las interacciones hidrofóbicas en la mutación del 3WF-W68F, a diferencia del 3WF-W68Y cuya mutación debe de comprometer las interacciones que se establecen para favorecer una estructura tetramérica estable del canal.

El estudio de las K_D (**Fig. 14**) indica que la afinidad del canal por los diferentes iones permeantes no cambia en el mutante 3WF-W68Y, siendo todos los valores obtenidos para la K_D casi iguales. En 3WF-W68F se pudieron detectar los dos eventos de unión de K^+ también descritos para el canal WT [41]. En nuestro caso para el canal 3WF-W68Y no fuimos capaces hasta el momento de detectar este primer evento (de alta afinidad), aunque sí el segundo (de baja afinidad), que fue relacionado con un filtro de selectividad en conformación conductora en KcsA WT. Se necesitan realizar mayor cantidad de experimentos para comprobar si este primer evento existe en este nuevo mutante o, si por el contrario, éste ha desaparecido. La dificultad en este mutante reside en que lo ideal sería partir de una muestra en Na^+ y en ausencia del ion conductor a probar, y continuar con una serie de muestras en las que progresivamente se aumenta la concentración del ion conductor que, si presentara un evento de alta afinidad, desplazaría de manera fácil al Na^+ , ion que no tiene un sitio de este tipo en el filtro. Sin embargo, dado que nuestra proteína no es estable en Na^+ , y el KcsA necesita la presencia de iones para mantener la estructura tetramérica, no se puede partir de una concentración nula de ion conductor.

A tenor de los datos de constante de afinidad, a priori podemos estimar que cuando se realicen en el futuro mediciones de función sobre el canal 3WF-W68Y en presencia de Rb^+ y Cs^+ también se detectarán corrientes, dada la similitud en el comportamiento frente a la unión de iones de esta proteína en presencia de los tres cationes permeantes utilizados en este proyecto.

La comparación de las **Fig. 15** y **Fig. 17E** indica que el patrón de actividad del 3WF-W68Y es distinto al de 3WF-W68F, que a su vez es similar al de WT. No presenta diferencias de intensidad de corriente a voltajes negativos y positivos, ni un "flickering" más intenso a voltajes negativos, además de presentar una menor intensidad de corriente que el WT. El tiempo de apertura es también menor que en el 3WF-W68F, aunque ambos son inferiores al WT. Todo esto indica que, aunque la red de interacciones de puentes de hidrógeno debería estar más conservada en el 3WF-W68Y, la pérdida de hidrofobicidad es un factor lo suficientemente decisivo como para alterar el proceso de conducción iónica.

9. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN

Las conclusiones obtenidas en este Trabajo de Fin de Grado son:

- El mutante 3WF-W68Y presenta una estructura tetramérica menos estable, tanto desde el punto de vista químico como térmico, que el 3WF-W68F. Podría deberse a una alteración estructural en el llamado “sitio B” para la unión de Na^+ , situado entre S3 y S4.
- La estructura secundaria del mutante 3WF-W68Y se conserva con respecto a la del WT.
- Desde el punto de vista de la fluorescencia en el estado estacionario, el entorno del Trp 67 no cambia significativamente cuando el residuo Trp68 se modifica a Phe o a Tyr.
- La afinidad del mutante 3WF-W68Y por los iones K^+ , Rb^+ y Cs^+ es prácticamente la misma para todos y no se ha podido detectar hasta el momento el “set” de sitios de unión de alta afinidad detectados en el canal silvestre para estos tres cationes.
- El mutante 3WF-W68Y presenta una conducción de K^+ alterada con respecto al WT y 3WF-W68F, lo que incluye: menor intensidad de corriente, pérdida de la rectificación de salida, menor tiempo de apertura en el mutante y la ausencia de diferencias entre los registros a voltajes negativos y a positivos. Estos resultados indican que el residuo W68 influye en gran medida en la conducción iónica del canal y por tanto de alguna manera en la estructura del filtro de selectividad del mismo.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se plantea como experimentos futuros en el laboratorio comprobar los resultados obtenidos, realizando experimentos con un mayor número de repeticiones por ensayo y, en el caso de los estudios de desnaturalización térmica, sería interesante usar concentraciones menores de iones conductores con el objetivo de intentar dilucidar si existe un evento de unión de alta afinidad en el mutante. También se debería realizar ensayos de dicroísmo circular y “patch-clamp” para el mutante en presencia de Rb^+ y Cs^+ , todo ello para profundizar en el conocimiento relativo a las bases estructurales de la conducción iónica, bloqueo y procesos de inactivación mediante la utilización del mutante 3WF-W68Y.

Finalmente la presencia de un solo residuo de Trp por monómero abre la posibilidad de realizar experimentos de espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo. Esta técnica puede revelar como un residuo de triptófano es afectado por las interacciones con sustratos y otras macromoléculas, la cercanía a un determinado sitio, si su fluorescencia es afectada por compuestos “apagadores” de manera estática o dinámica, o nos puede dar información acerca de la forma y flexibilidad de la macromolécula, entre otras muchas aplicaciones. En nuestro caso se aplicará al estudio de la regulación del proceso de inactivación lenta de KcsA por iones y fosfolípidos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Hille, *IONIC CHANNELS OF EXCITABLE MEMBRANES*, 3ª Edición. 2001.
- [2] a L. Hodgkin and a F. Huxley, “The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*,” *J. Physiol.*, vol. 116, no. 4, pp. 473–496, 1952.
- [3] a L. Hodgkin and a F. Huxley, “Propagation of electrical signals along giant nerve fibers.,” *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 140, no. 899, pp. 177–183, 1952.
- [4] J. Giraudat, A. Devillers-Thiery, C. Auffray, F. Rougeon, and J. P. Changeux, “Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor,” *Embo J*, vol. 1, no. 6, pp. 713–7., 1982.
- [5] M. Noda, Y. Furutani, H. Takahashi, M. Toyosato, T. Hirose, S. Inayama, S. Nakanishi, and S. Numa, “Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin,” *Nature*, vol. 295, no. 5846, pp. 202–206, 1982.
- [6] D. A. Doyle, J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, and R. MacKinnon, “The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity.,” *Science (80-.)*, vol. 280, no. 5360, pp. 69–77, 1998.
- [7] Silverthorn, “Fisiología Humana: Un enfoque integrado,” 4ª Edición., 2010.
- [8] W. a Catterall, “Structure and function of voltage-gated ion channels.,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 64, pp. 493–531, 1995.
- [9] F. L. R. Latorre, Ramón; López-Barneo, José; Benzanilla, “Biofísica y Fisiología Celular,” 1996.
- [10] A. Kamb, J. Tseng-Crank, and M. A. Tanouye, “Multiple products of the drosophila Shaker

- gene may contribute to potassium channel diversity," *Neuron*, vol. 1, no. 5, pp. 421–430, 1988.
- [11] L. C. Timpe, Y. N. Jan, and L. Y. Jan, "Four cDNA clones from the Shaker locus of *Drosophila* induce kinetically distinct A-type potassium currents in *Xenopus* oocytes," *Neuron*, vol. 1, no. 8, pp. 659–667, 1988.
- [12] T. L. Schwarz, B. L. Tempel, D. M. Papazian, Y. N. Jan, and L. Y. Jan, "Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*," *Nature*, vol. 331, no. 6152, pp. 137–142, 1988.
- [13] R. MacKinnon, "Potassium channels," *FEBS Lett.*, vol. 555, no. 1, pp. 62–65, 2003.
- [14] a Kreuzsch, P. J. Pfaffinger, C. F. Stevens, and S. Choe, "Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel.," *Nature*, vol. 392, no. 6679, pp. 945–948, 1998.
- [15] N. V. Shen and P. J. Pfaffinger, "Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins," *Neuron*, vol. 14, no. 3, pp. 625–633, 1995.
- [16] H. . P. Bixby, K. A; Nanao, M. H.; Shen, N. V.; Kreuzsch, A.; Bellamy and S. P. J.; and Choe, "Zn²⁺-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K⁺ channels," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 6, pp. 38–43, 1999.
- [17] H. Schrepf, O. Schmidt, R. Kümmerlen, S. Hinnah, D. Müller, M. Betzler, T. Steinkamp, and R. Wagner, "A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*," *EMBO J.*, vol. 14, no. 21, pp. 5170–5178, 1995.
- [18] M. L. Molina, F. N. Barrera, A. M. Fernández, J. A. Poveda, M. L. Renart, J. A. Encinar, G. Riquelme, and J. M. González-Ros, "Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 27, pp. 18837–18848, 2006.
- [19] D. M. Cortes, "Molecular architecture of full-length KcsA: Role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating," *J. Gen. Physiol.*, vol. 117, no. 2, pp. 165–180, 2001.
- [20] M. L. Renart, F. N. Barrera, M. L. Molina, J. A. Encinar, J. A. Poveda, A. M. Fernández, J. Gómez, and J. M. González-Ros, "Effects of conducting and blocking ions on the structure and stability of the potassium channel KcsA," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 40, pp. 29905–29915, 2006.

- [21] N. Shi, S. Ye, A. Alam, L. Chen, and Y. Jiang, "Atomic structure of a Na⁺- and K⁺-conducting channel.," *Nature*, vol. 440, no. 7083, pp. 570–4, 2006.
- [22] A. Kuo, J. M. Gulbis, J. F. Antcliff, T. Rahman, E. D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F. M. Ashcroft, T. Ezaki, and D. A. Doyle, "Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1. 1 in the Closed State," *Science*, vol. 300, no. June, pp. 1922–1926, 2003.
- [23] S. Uysal, V. Vásquez, V. Tereshko, K. Esaki, F. A. Fellouse, S. S. Sidhu, S. Koide, E. Perozo, and A. Kossiakoff, "Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 16, pp. 6644–9, 2009.
- [24] M. L. Molina, J. A. Encinar, F. N. Barrera, G. Fernández-Ballester, G. Riquelme, and J. M. González-Ros, "Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA," *Biochemistry*, vol. 43, no. 47, pp. 14924–14931, 2004.
- [25] J. H. Morais-Cabral, Y. Zhou, and R. MacKinnon, "Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter.," *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 37–42, 2001.
- [26] Y. Zhou, J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman, and R. MacKinnon, "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution.," *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 43–8, 2001.
- [27] S. Chakrapani, J. F. Cordero-Morales, and E. Perozo, "A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 130, no. 5, pp. 479–496, 2007.
- [28] S. Chakrapani, J. F. Cordero-Morales, and E. Perozo, "A Quantitative Description of KcsA Gating I: Macroscopic Currents," *J. Gen. Physiol.*, vol. 130, no. 5, pp. 465–478, 2007.
- [29] F. Bezanilla and C. M. Armstrong, "Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 60, no. 5, pp. 588–608, 1972.
- [30] S. Y. Noskov, S. Bernèche, and B. Roux, "Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands.," *Nature*, vol. 431, no. 7010, pp. 830–4, 2004.
- [31] A. M. J. VanDongen, "K channel gating by an affinity-switching selectivity filter.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 9, pp. 3248–52, 2004.

- [32] M. L. Renart, I. Triano, J. A. Poveda, J. A. Encinar, A. M. Fernández, A. V. Ferrer-Montiel, J. Gómez, and J. M. González Ros, "Ion binding to KcsA: Implications in ion selectivity and channel gating," *Biochemistry*, vol. 49, no. 44, pp. 9480–9487, 2010.
- [33] J. H. H. J. H. Morais-Cabral, Y. Zhou, R. MacKinnon, Ä. H. Morais-cabral, Y. Zhou, and R. MacKinnon, "Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter," *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 37–42, 2001.
- [34] A. G. Komarov, K. M. Linn, J. J. Devereaux, and F. I. Valiyaveetil, "Investigating interactions of the pore helix," vol. 4, no. 12, pp. 1029–1038, 2010.
- [35] M. Lemasurier, L. Heginbotham, and C. Miller, "KcsA : It ' s a Potassium Channel," vol. 118, no. September, 2001.
- [36] Y. Zhou and R. MacKinnon, "The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: Charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates," *J. Mol. Biol.*, vol. 333, no. 5, pp. 965–975, 2003.
- [37] R. Blunck, J. F. Cordero-Morales, L. G. Cuello, E. Perozo, and F. Bezanilla, "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*, vol. 128, no. 5, pp. 569–581, 2006.
- [38] J. F. Cordero-morales, L. G. Cuello, Y. Zhao, V. Jogini, D. M. Cortes, and E. Perozo, "Molecular determinants of gating at the potassium- channel selectivity filter," vol. 13, no. 4, pp. 311–318, 2006.
- [39] D. M. Cortes, J. F. Cordero-morales, V. Jogini, A. Lewis, V. Va, and E. Perozo, "Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation," vol. 14, no. 11, pp. 1062–1069, 2007.
- [40] J. F. Cordero-Morales, V. Jogini, S. Chakrapani, and E. Perozo, "A multipoint hydrogen-bond network underlying KcsA C-type inactivation," *Biophys. J.*, vol. 100, no. 10, pp. 2387–2393, 2011.
- [41] A. C. M. Lourdes Renart, Marcela Giudici, José A. Poveda, Aleksander Fedorov, Mario N. Berberan-Santos, Manuel Prieto, José M. González-Ros, "Homo-FRET studies of potassium channel KcsA: a closer look to selectivity filter dynamics and regulation (Manuscript in preparation)," 2016.
- [42] I. 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 J. M. González-Ros, "Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein," *Biochemistry*, vol. 49, no. 25, pp. 5397–5404, 2010.
- [43] M. L. Renart, E. Montoya, A. M. Fernández, M. L. Molina, J. A. Poveda, J. A. Encinar, J. L. Ayala, A. V. Ferrer-Montiel, J. Gómez, A. Morales, and J. M. González Ros, "Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel," *Biochemistry*, vol. 51, no. 18, pp. 3891–3900, 2012.
- [44] S. M. M. Kelly and N. C. C. Price, "The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function.," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 1, no. 4, pp. 349–84, 2000.
- [45] A. N. Thompson, I. Kim, T. D. Panosian, T. M. Iverson, W. Toby, and C. M. Nimigean, "Mechanism of potassium channel selectivity revealed by Na⁺ and Li⁺ binding sites within the KcsA pore," vol. 16, no. 12, pp. 1317–1324, 2010.

