



---

# Expresión y caracterización de la proteína mutante OPEN

---

Memoria de Trabajo de Fin de Grado

---

FACULTAD DE CIENCIAS  
EXPERIMENTALES

Grado en Biotecnología  
4º Curso

Universidad Miguel Hernández de Elche

Junio 2018

---

**Autor:** Miriam Nicolás Albuja

**Tutor:** José Antonio Poveda Larrosa

**Co-tutora:** Ana Marcela Giudici Besseghini

**Departamento:** Agroquímica y Medio Ambiente

**Área:** Química Física

**Modalidad:** Experimental

# Contenido

---

|  |    |
|--|----|
| 1. Resumen.....  | 3  |
| A. Resumen.....  | 3  |
| B. Abstract.....   | 4  |
| 2. Palabras clave.....   | 4  |
| 3. Introducción.....   | 5  |
| A. Canales iónicos.....  | 5  |
| B. Canales de potasio y KcsA.....  | 6  |
| Características generales y estructura.....  | 6  |
| Selectividad y conductividad de KcsA.....  | 7  |
| 4. Antecedentes y objetivos.....   | 14 |
| 5. Materiales y métodos.....   | 15 |
| A. Expresión y purificación de la proteína KcsA y su versión mutante, OPEN.....      | 15 |
| B. Monitorización mediante espectrofluorimetría de la desnaturalización térmica..... | 18 |
| 6. Resultados.....   | 20 |
| A. Expresión y purificación de la proteína OPEN.....                                 | 20 |
| B. Monitorización mediante espectrofluorimetría de la desnaturalización térmica..... | 21 |
| Ion Na <sup>+</sup> .....  | 24 |
| Ion K <sup>+</sup> .....   | 24 |
| Ion Rb <sup>+</sup> .....  | 25 |
| Ion Cs <sup>+</sup> .....  | 26 |
| 7. Discusión.....  | 29 |
| 8. Conclusiones y proyección futura.....   | 32 |
| 9. Bibliografía.....   | 33 |

# 1. Resumen

---

## A. Resumen

Los canales iónicos destacan por su importancia biológica al participar en numerosos y vitales procesos entre los que se encuentran la transmisión nerviosa o la secreción de determinados compuestos. La alteración de su función desemboca en importantes enfermedades que en general se conocen como canalopatías. Por todo ello, son objeto de estudio para multitud de grupos de investigación. Dentro de los canales iónicos, los canales de potasio se han estudiado profundamente gracias a la proteína KcsA, un canal de potasio modelo aislado a partir del microorganismo *Streptomyces lividans* y cuya estructura cristalográfica está resuelta facilitando así su estudio. El KcsA presenta dos compuertas conectadas alostéricamente, una primera cuya apertura es dependiente del pH y una segunda compuerta, el filtro de selectividad, que determina qué iones pueden atravesar el canal. El filtro de selectividad puede encontrarse en dos estados, conductor e inactivado, siendo ésta última conformación el objeto de estudio en este trabajo. En estado de reposo, el canal tiene la primera compuerta cerrada, mientras que el filtro está en su conformación conductora. La apertura de la primera compuerta a pH ácido permite el paso de iones a través del canal en un primer momento (canal en estado abierto). Sin embargo, esta apertura desencadena de manera alostérica la inactivación del filtro de selectividad, entrando en un estado en el que se impide el paso de iones (canal en estado inactivado). En este trabajo se ha realizado un estudio de la conformación del filtro de selectividad en estado inactivado haciendo uso de un mutante en el que la primera compuerta está permanentemente abierta incluso a pH neutro, permitiendo así una comparación directa con el estado en reposo nativo del canal a ese mismo pH, ya previamente caracterizado. Con este fin, se ha expresado y purificado el mutante OPEN de KcsA, para luego hacer una caracterización de la estructura de su filtro de selectividad mediante experimentos de unión de diferentes iones conductores y no conductores.

## B. Abstract

Ion channels stand out because their biological importance since they take part of a large number of life processes as nervous transmission or secretion of certain compounds. Alteration of these channels results in serious diseases known as channelopathies. Therefore, ion channels are under consideration for a multitude of research groups. As part of ion channels, potassium channels have been studied in detail thanks to the KcsA protein, which is a model potassium channel isolated from the microorganism *Streptomyces lividans*, whose structure has been determined crystallographically, making easier its study. KcsA has two gates allosterically connected. The opening of the first one is regulated by pH. The second one is the selectivity filter which determines the kind of ions which can pass through the channel. The selectivity filter has two states, conductive and inactivated, being this last conformation our subject of study in this project. At the resting state, the channel has its first gate closed while the selectivity filter remains in its conductive conformation. Opening of the first gate at low pH allows the passage of ions through the channel in first instance (channel in an open state). However, this opening triggers, in an allosteric way, the inactivation of the selectivity filter which enters a state which blocks the ionic conduction (channel in an inactivated state). In this project, a conformational study of the selectivity filter in its inactivated state has been performed. For this purpose, a mutant protein whose first gate is constantly open, even in a neutral pH, has been used since its study allows the direct comparison with the native resting state of the channel at the same pH, previously characterized. To this end, the OPEN mutant of KcsA has been expressed and purified in order to characterize its selectivity filter structure by performing binding experiments with different conductive and non-conductive ions.

## 2. Palabras clave

---

KcsA

Canales de potasio

Inactivación

Filtro de selectividad

Conformación

Unión de iones

## 3. Introducción

---

### A. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana especializadas en el transporte de iones. Esto implica que permiten el paso de los mismos a través de la membrana plasmática en forma de corriente eléctrica ya que, ésta última supone una barrera energética muy grande para el paso de partículas cargadas (1, 2). Estas proteínas transmembrana se encuentran en las membranas de todos los animales, plantas y bacterias (3). Tienen dos importantes propiedades que las caracterizan. Por un lado, en el proceso de apertura, que ocurre en respuesta a estímulos externos, cambian de una conformación cerrada (un estado en el que los iones no permean, no pasan) a una abierta (un estado que permite el paso de iones). Estos estímulos externos pueden consistir en la unión de un ligando, en cambios en el potencial de membrana o en una combinación de ambos (1,4). Por otro lado, estas proteínas presentan una alta selectividad que les permite discriminar entre los diferentes iones, no solo entre aniones y cationes, sino entre distintos iones monovalentes y también entre iones divalentes.

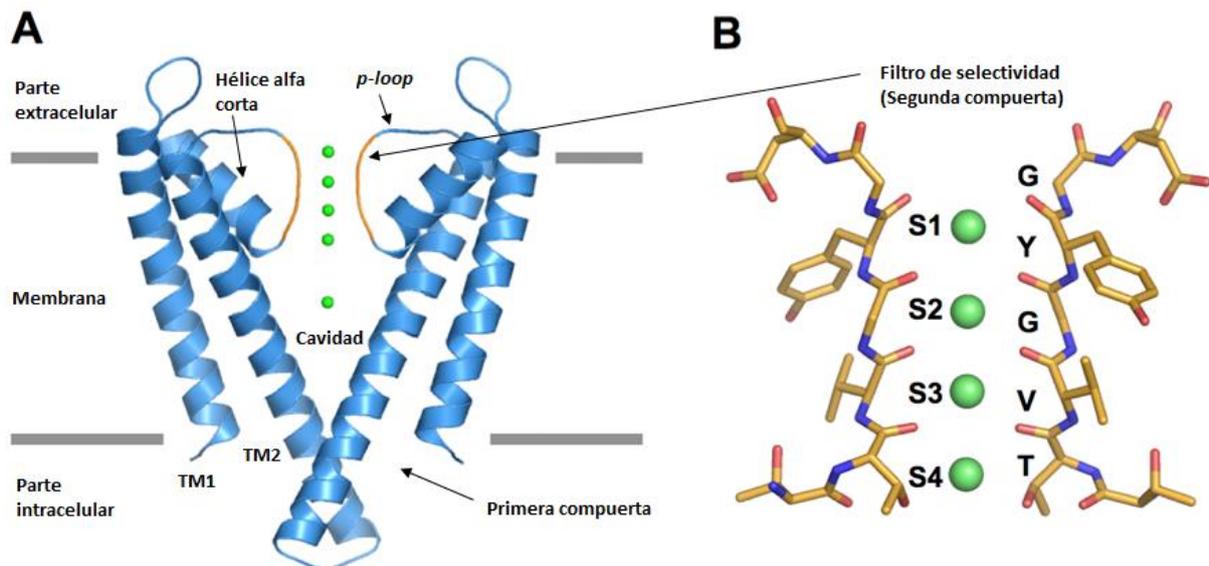
En general, todos los canales iónicos se componen de dos partes funcionales, una primera compuerta, que especifica en qué condiciones se abre el canal y una segunda compuerta, que es el filtro de selectividad, que determina el tipo de ion que puede atravesar el canal (1). En todas las células existe, como resultado de la semipermeabilidad de su membrana plasmática y de la distribución iónica desigual entre la parte extracelular e intracelular, un potencial de membrana o potencial de difusión. Los cambios en este potencial son responsables de numerosos e importantes procesos biológicos. Los canales iónicos, al permitir el paso de la corriente, son capaces de dar lugar a estos cambios en el potencial de membrana, lo que los convierte en proteínas de vital importancia ya que, gracias a ellos se regulan procesos como la excitación neuronal y muscular, la secreción hormonal, el aprendizaje y la memoria, la proliferación celular, la transducción sensorial y la regulación de la presión sanguínea y osmótica (1,3). Es por ello que los defectos en los canales iónicos dan lugar a importantes alteraciones fisiológicas que resultan en enfermedades conocidas como canalopatías, como por ejemplo la epilepsia (3,5).

## B. Canales de potasio y KcsA

### Características generales y estructura

Los canales de potasio transportan a través de la membrana y a favor de gradiente iones potasio ( $K^+$ ). Todos forman parte de una única familia de proteínas y son reconocibles fácilmente gracias a la secuencia firma altamente conservada (TVGYG) que da lugar a la estructura del filtro de selectividad (6, 7, 8). En general, los canales de potasio muestran una gran permeabilidad al  $K^+$  y al rubidio ( $Rb^+$ ), algo menos para los iones cesio ( $Cs^+$ ) y una permeabilidad bastante baja para iones más pequeños como el sodio ( $Na^+$ ) y el litio ( $Li^+$ ). Más concretamente, el  $K^+$  permea 10 000 veces más que el  $Na^+$ , una característica que permite dirigir el flujo de iones de forma correcta para que los canales de potasio puedan cumplir su función (5). Estas diferencias permiten clasificar a los iones en conductores y no conductores. Los iones conductores tienen una alta afinidad por el canal y permiten el paso de corriente a través de él. Son el  $K^+$ , el  $Rb^+$  y el  $Cs^+$ . Por otro lado, los iones no conductores tienen una baja afinidad y no permiten el paso de corriente, como por ejemplo el  $Na^+$  (9).

El canal KcsA es un canal propio del microorganismo *Streptomyces lividans* y se utiliza como modelo para el estudio de los canales de potasio. Su estructura fue resuelta por MacKinnon y colaboradores mediante cristalografía de rayos X (6). El canal es un homotetámero que cuenta, por subunidad, con dos hélices transmembrana, TM1 (residuos del 26 al 50) y TM2 (residuos del 90 al 120), además de una hélice alfa más corta tipo p cerca de la parte extracelular. A esta última le sigue la zona *p-loop*, una secuencia sin estructura secundaria que forma un giro (*loop*). Al formarse el complejo, las hélices alfa más cortas y la zona *p-loop* dan lugar, junto con la cavidad originada por las TM, a la región del poro. El filtro de selectividad está contenido en la región del poro, en la zona *p-loop*, tiene una longitud de 3 Å y está formado por las secuencias conservadas TVGYG (residuos 75-79) de cada monómero (Figura 1). El poro está formado por 35 residuos, tiene una longitud de 45 Å y un diámetro de 10 Å en su parte más amplia, formando una cavidad. El diámetro del poro se estrecha en la parte del filtro de selectividad (6, 8, 10, 11, 12).



**Figura 1. A:** Corte transversal de la porción transmembrana del canal de K<sup>+</sup> KcsA en el que se representan tan solo dos subunidades de las cuatro que forman el tetrámero. El filtro de selectividad se representa en color amarillo. **B:** Esquema más detallado de las secuencia firma que forma los cuatro sitios de unión (S4-S1) en el filtro de selectividad. En ambos casos se representan los iones de K<sup>+</sup> como esferas verdes (13).

### Selectividad y conductividad de KcsA

El trayecto de un ion de potasio a través del canal KcsA insertado en una membrana normalmente comienza en la parte intracelular del canal, que corresponde con el C-terminal, donde convergen las hélices transmembrana (TM1 y TM2) formando la primera compuerta del canal. El proceso por el cual esta primera compuerta se abre se denomina proceso de apertura. Dicho proceso está regulado por el pH, de manera que a un pH neutro, como pH 7, se encuentra en un estado cerrado mientras que a pH más ácido, pH 4, se encuentra en un estado abierto. El mecanismo molecular de estos eventos parece residir en el movimiento de las hélices transmembrana. A pH ácido, TM2 se movería en contra de las agujas del reloj a la vez que se alejaría del centro del canal por donde pasarían los iones, aumentando el diámetro de la cavidad interna. Como consecuencia o simultáneamente, TM1 rotaría también en contra de las agujas del reloj, resultando ambos movimientos en la apertura del canal (10).

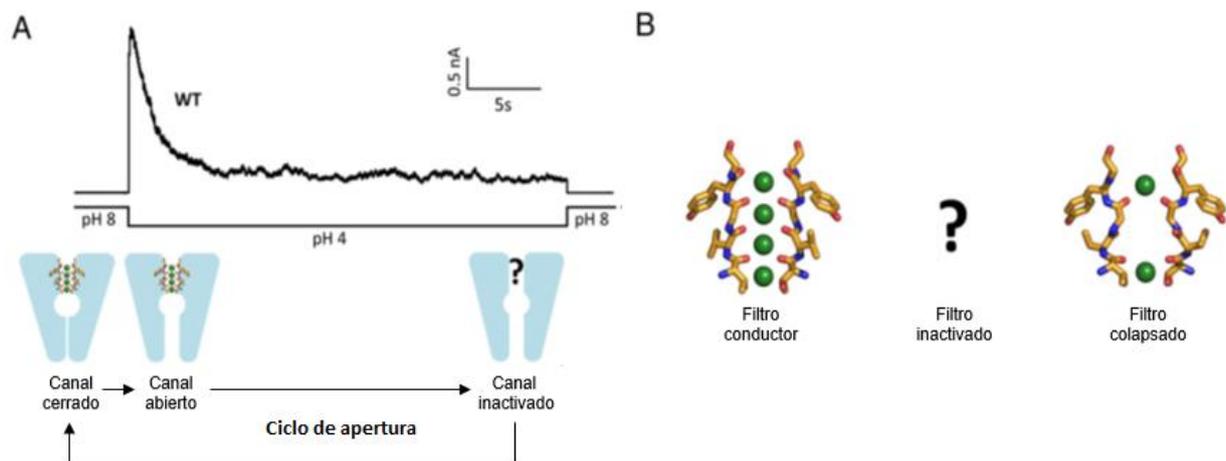
Si el canal se encuentra en un estado abierto, el K<sup>+</sup> pasa a la cavidad central llena de agua y llega hasta el filtro de selectividad (segunda compuerta) el cual atraviesa en una forma deshidratada. Para atravesar el filtro de selectividad el K<sup>+</sup> pasa por cuatro sitios de unión (S4-S1) hasta salir y llegar a la parte extracelular, donde vuelve a hidratarse. Finalmente, pasa al exterior a favor de gradiente electroquímico (Figura 1A). El K<sup>+</sup> es capaz de pasar en una forma deshidratada gracias a los cuatro sitios de unión (S4-S1). En estos sitios de unión

encontramos los oxígenos de los grupos carbonilos (y el de la cadena lateral en el caso de la treonina, T) de la secuencia aminoacídica TVGYG. Al encontrarse el canal en forma tetramérica, cada sitio de unión está formado por cuatro oxígenos de cuatro aminoácidos iguales de la secuencia TVGYG de cada monómero (Figura 1B). Estos oxígenos están colocados a la distancia exacta para sustituir a las interacciones de los oxígenos de las moléculas de agua con los iones  $K^+$  y que, de esta manera, los iones puedan acceder deshidratados sin un alto coste energético. Es por eso que el radio atómico de los iones influye mucho en su permeabilidad a través del canal. También explica que la velocidad de conducción del  $K^+$  esté cerca del límite de difusión (11). Esta hipótesis para explicar la permeación del  $K^+$  en la que el filtro de selectividad carece de flexibilidad se conoce como hipótesis del ajuste perfecto ("*snug-fit*" hypothesis) (14).

Existen otras hipótesis que explican la capacidad selectiva del filtro. Una de ellas es la hipótesis del ajuste inducido ("*induced-fit*"), defendida por el grupo de investigación con el cual se realizó este trabajo. Esta hipótesis explica la capacidad selectiva del filtro en base a que el filtro de selectividad es lo suficientemente flexible para cambiar a una conformación que favorezca el paso de ion con un tamaño concreto. De esta manera se explican mejor los efectos que tienen los iones al unirse al canal según sean conductores o no conductores, ya que a una determinada concentración pueden modular las propiedades selectivas y la apertura del canal (8). Siguiendo esta idea de la flexibilidad, se considera que el filtro de selectividad puede encontrarse en un estado conductor o en uno no conductor. El paso de un estado a otro resulta en la inactivación del filtro de selectividad (15). Este proceso de inactivación, nombrado de tipo C, se ha relacionado con cambios estructurales en el filtro originados por la interacción de iones conductores (16). Como se mencionó anteriormente, la permeabilidad de los iones conductores  $K^+$ ,  $Rb^+$  y  $Cs^+$  es mayor que la del ion no conductor  $Na^+$ . Los iones conductores presentan, primeramente, alta afinidad por el filtro de selectividad. Para dar lugar a la conducción, tiene lugar una notable disminución en la afinidad que permite la disociación de estos iones. Más detalladamente, en un primer momentos los iones conductores presentan alta afinidad (constante de disociación  $-K_D-$  en escala micromolar) por los sitios de unión S1 y S4, los sitios más externos dentro del filtro de selectividad. La  $K_D$  es un parámetro que nos da una idea de la afinidad que presenta un determinado ion por el canal, cuanto menor es su valor más afín es la unión ya que es necesaria una menor concentración del ion para que se produzca dicha unión. Al tener unas  $K_D$  muy parecidas ambos sitios de unión se incluyen dentro de un único set de sitios de unión. Esta alta afinidad permite que los iones conductores desplacen a los no conductores. Posteriormente se produce el paso de los iones conductores a los siguientes sitios de unión, S2 y S3, que como en el caso anterior, al tener  $K_D$  muy parecidas forman un set de sitios de unión. Este paso de los iones a los

siguientes sitios de unión da lugar a un cambio en el filtro de selectividad que pasa a estar en un estado con una menor afinidad ( $K_D$  en escala milimolar) que permite la disociación y la permeabilidad de los iones conductores. Sin embargo, el ion no conductor  $\text{Na}^+$  presenta una afinidad muy baja por el primer set de sitios de unión ( $K_D$  en escala milimolar) razón por la cual es desplazado por los iones conductores. El  $\text{Na}^+$  no se asocia con los sitios de unión S2 y S3, por lo que no da lugar al cambio conformacional y por tanto al paso de corriente (10).

Además de esta modulación de la permeabilidad por parte de los iones conductores, se ha demostrado que el proceso de apertura también influye en el estado del filtro de selectividad. De manera que existe un acoplamiento alostérico entre ambos mecanismos de apertura que da lugar a lo que se conoce como ciclo de apertura. Este ciclo conlleva la transición entre los distintos estados del KcsA: cerrado, abierto o activado e inactivado. La activación del canal, debida a una bajada de pH, se debe al proceso de apertura que deja el canal en un estado abierto (ambas compuertas abiertas) resultando en un rápido aumento de la corriente. Sin embargo, se trata de un estado transitorio de muy corta duración debido a que el proceso de apertura dispara la inactivación del filtro de selectividad, por lo que tras un primer aumento de la corriente ésta decae espontáneamente. Por tanto, la apertura del canal tiene como consecuencia la entrada del canal en un estado inactivado (primera compuerta abierta pero filtro inactivado) incapaz de conducir iones (Figura 2). Este es un mecanismo fundamental para el control temporal de la actividad de los canales de potasio, y que, por ejemplo, determina la duración del potencial de acción en la transmisión nerviosa.



**Figura 2. A:** Corriente macroscópica de KcsA WT obtenida durante un cambio de pH de 8 a 4 para disparar la inactivación del canal al provocar la apertura de la puerta interna, y su posterior inactivación. Debajo, tres modelos que representan la conformación del canal en los diferentes momentos del ciclo de apertura. En el modelo de canal inactivado se desconoce la conformación del filtro. **B:** Posibles conformaciones del filtro de selectividad: conformación conductora (izquierda, *Protein Data Bank* (PDB), código ID: 1K4C) y colapsada (derecha PDB, código ID: 1K4D). Los sitios de unión se representan con esferas verdes. Se desconoce la conformación adoptada por el filtro inactivado (17).

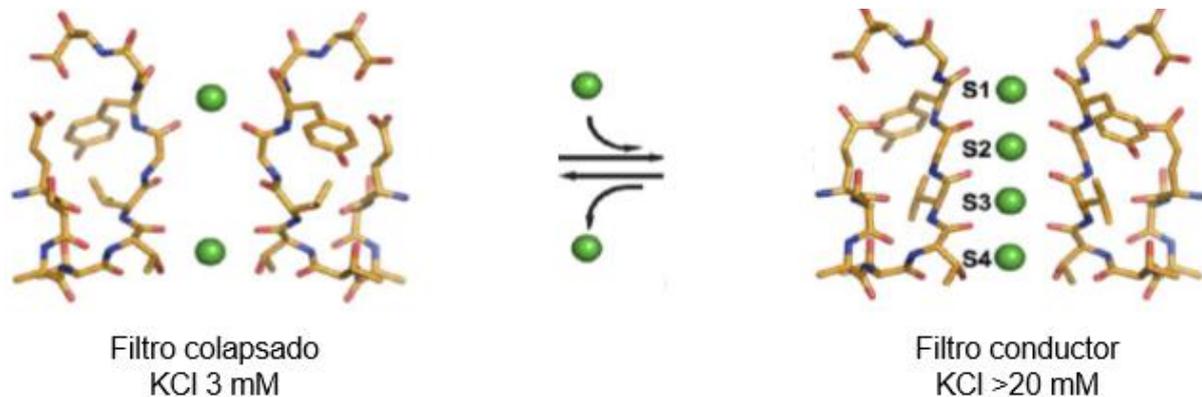
Es necesario que se cierre la primera compuerta para que el filtro vuelva a un estado conductor. Cuando esto último ocurre debido a una subida de pH, el canal queda en un estado cerrado (primera compuerta cerrada y filtro conductor) de nuevo listo para ser activado (Figura 2A) (18).

El filtro de selectividad se encuentra en un estado conductor cuando la primera compuerta está cerrada y en los primeros momentos en los que se abre, permitiendo el paso de corriente. En el estado conductor, el filtro se encuentra en una conformación en la que es capaz de unir iones en los cuatro sitios de unión. Sin embargo, el estado conformacional en el que se encuentra el filtro cuando el canal se inactiva se desconoce (Figura 2B). Existen dos hipótesis acerca de la conformación adoptada por el filtro de selectividad en la inactivación del canal: que el filtro se encuentra en una conformación colapsada en la que es incapaz de unir iones en los sitios S2 y S3 del filtro, o que se encuentra en una conformación en la que sí es capaz de unir iones pero no es capaz de conducirlos. Por un lado, Perozo y col. defienden la primera hipótesis (Figura 2B). Se basan en la estructura cristalográfica obtenida a partir de un mutante en el que el canal KcsA tiene la primera compuerta permanente abierta a pH neutro y por tanto inactivado (mutante OPEN). En esta conformación colapsada, el filtro de selectividad presiona a la Gly77 desplazando los grupos carbonilos que forman los sitios S2 y S3 hacia afuera e impidiendo por tanto la unión de iones en estos sitios (Figura 3). La conformación colapsada del filtro es consecuencia de los cambios conformacionales desencadenados por el proceso de apertura, pero se ha demostrado que una baja concentración de potasio también puede provocar la entrada del filtro en la conformación colapsada (Figura 4) (19).



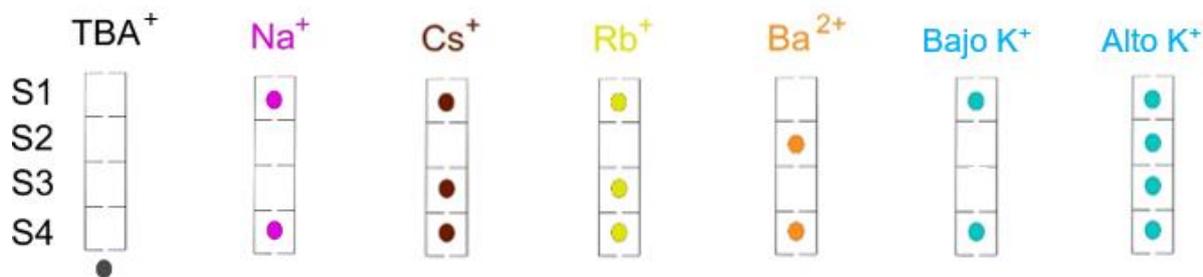
**Figura 3.** Sitios de unión ocupados por  $K^+$  en los distintos estados descritos para el filtro de selectividad: filtro conductor (izquierda); filtro inactivado según Valiyaveetil y col. (medio); filtro inactivado colapsado según Perozo y col. (derecha).

Sin embargo, Valiyaveetil y col., defienden que el filtro de selectividad es capaz de unir iones en los cuatro sitios del filtro cuando el canal está inactivado con lo que descartan que entre en una conformación colapsada. Concluyen que para entrar en el estado de inactivación es necesario que el sitio S2 esté ocupado por un ion, mientras que para una posterior transición al estado de activación (recuperación) es necesario que se ocupen los sitios S3 y S4. Estos resultados sugieren que en el estado inactivado ocurre una ligera distorsión conformacional en los sitios S3 y S4 que impide el paso de iones pero no impide su unión (Figura 3) (18).



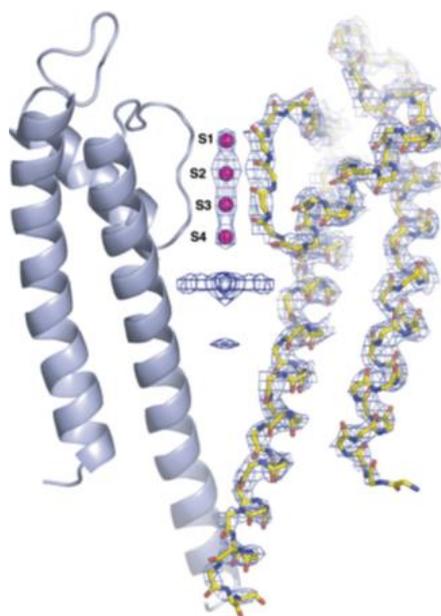
**Figura 4.** Transición entre la conformación colapsada del filtro de selectividad con la conductora como consecuencia de la concentración de KCl: filtro colapsado a baja concentración (KCl a 3 mM) o conductor a alta concentración (KCl por encima de 20 mM).

El grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo utiliza como estrategia para definir la estructura del filtro de selectividad de KcsA en sus distintas conformaciones, experimentos de unión de iones conductores y no conductores al canal. Estos datos, junto a las estructuras cristalográficas de KcsA en presencia de esos mismos iones, han permitido definir las características del filtro de selectividad en estado de reposo (primera compuerta cerrada a pH 7) (8). Así, se asoció la unión a los sitios S1 y S4, formando ambos un único set de sitios de unión de alta afinidad, con las constantes de disociación ( $K_D$ ) obtenidas a baja concentración mientras que las obtenidas a alta concentración se asociaron a la unión de los sitios S2 y S3, que forman el otro set de sitios de unión, en este caso de baja afinidad (Figura 5). Con esa misma estrategia se ha planteado el estudio de la conformación del filtro en el estado inactivado. Inicialmente se hizo trabajando con el canal silvestre a pH 4. Sin embargo, debido a que el bajo pH puede provocar la protonación de residuos del canal y alterar los resultados se han obtenido otros modelos de canal inactivado independientes del pH. Uno de ellos es la proteína  $\Delta 125$ , una versión de KcsA que carece del extremo C terminal, parte necesaria para llevar a cabo el cierre del canal. Como consecuencia,  $\Delta 125$  está en un estado inactivado (primera compuerta abierta y filtro inactivado) incluso a pH 7. Se observó que los iones eran capaces de unirse a los sitios S2 y S3 del filtro de selectividad en los dos modelos de canal.



**Figura 5.** Esquema que representa los sitios del filtro de selectividad ocupados por los iones Na<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> a baja y alta concentración en el KcsA. También se representa la interacción del TBA<sup>+</sup> con el KcsA fuera del filtro de selectividad, en la parte intracelular del canal.

Destacar también que no solo los iones interactúan con los canales de potasio sino muchos compuestos que pueden modular su actividad, activadores o bloqueadores según si mantienen el canal cerrado o abierto. Uno de estos moduladores es el tetrabutilamonio (TBA<sup>+</sup>). Este bloqueador es un ion de amonio cuaternario (QA). Los QA son cationes hidrofóbicos que bloquean los canales de K<sup>+</sup> en general. El TBA<sup>+</sup> accede al poro del canal por la parte intracelular de la membrana y acaba uniéndose en la amplia cavidad hidrofóbica del centro del canal bloqueando el paso de iones (Figura 5 y 6) (20, 21). La interacción del TBA<sup>+</sup> con el KcsA también ha sido estudiada en este grupo de investigación. Se han obtenido las K<sub>D</sub> de distintos modelos de canal cerrado WT a pH 7 (K<sub>D</sub> = (5 ± 2) × 10<sup>-3</sup> μM) o inactivado, WT a pH 4 (K<sub>D</sub> = (3,5 ± 0,4) × 10<sup>2</sup> μM) y Δ125 (K<sub>D</sub> = (1,7 ± 0,3) × 10<sup>1</sup> μM). Las K<sub>D</sub> indican que la afinidad del TBA<sup>+</sup> es mayor cuando el canal está cerrado, ya que en ese estado la cavidad no es demasiado grande y se adapta mejor a la forma del TBA<sup>+</sup>.



**Figura 6.** Estructura cristalográfica del complejo formado por la unión de KcsA silvestre con K<sup>+</sup> y TBA<sup>+</sup>. Se representa dos de las cuatro subunidades de KcsA como si atravesaran una membrana. En magenta se representan los sitios de unión para el K<sup>+</sup> y debajo, en la cavidad hidrofóbica del centro del canal, la densidad electrónica correspondiente al TBA<sup>+</sup> (20).

No obstante hay que aclarar que, al igual que ocurre con las condiciones en las que se descubrió la conformación colapsada del filtro (condiciones en las que KcsA estaba cristalizado), las condiciones en las que se obtienen estos resultados no son las fisiológicas, por lo que no se puede asegurar que simulen correctamente el comportamiento del KcsA inactivado. Para reducir lo máximo posible este margen de error, se busca obtener el mayor número de modelos del estado inactivado posibles. De esta manera, si todos los modelos convergen en resultados parecidos se compensan las posibles alteraciones que pueden tener lugar en los modelos de canal inactivado utilizados. Estas posibles alteraciones se deberían al pH bajo en el modelo WT pH4 o a la gran modificación que supone eliminar el extremo C terminal en el modelo  $\Delta 125$ .

Por esta razón, en este trabajo se presentan los resultados de un nuevo modelo de canal inactivado. Este nuevo modelo es la proteína mutante OPEN, cuya expresión y caracterización es el eje central del trabajo. La proteína OPEN es una versión mutante del KcsA que contiene las mutaciones H25R, R117Q, E120Q, R121Q, R122Q y H124Q. Estas mutaciones estabilizan la conformación abierta de la primera compuerta. Es por ello que la proteína OPEN es también un modelo del canal en estado inactivado que nos sirve para estudiar la conformación del filtro de selectividad en estado no conductor a pH 7.

Los residuos mutados en la proteína OPEN son residuos cargados que se localizan en la parte intracelular terminal, formando un *cluster* (agrupación) de residuos cargados en TM1 y TM2. Estos residuos son considerados el sensor de pH necesario para regular el proceso de apertura. Dan lugar a las fuerzas de atracción/repulsión que estabilizan la conformación cerrada o abierta, según el pH, de la primera compuerta. La mayoría de mutaciones en estos residuos consisten en sustituciones por glutamina (Q), ya que tienen el objetivo de neutralizar la carga generada por los residuos originales. La cadena lateral de la Q no está cargada con lo que las mutaciones R117Q, E120Q, R121Q, R122Q y H124Q, resultan en una neutralización de las cargas positivas de las argininas (R) o de la histidina (H) y de la carga negativa del glutamato (E). Por último, la mutación H25R no neutraliza la carga sino que añade una carga positiva permanente que estabiliza el estado abierto de la primera compuerta del canal. Gracias a estas mutaciones la proteína OPEN se mantiene abierta hasta un pH de 9 (22, 23).

## 4. Antecedentes y objetivos.

---

Este trabajo se centra en aportar resultados y conclusiones de un nuevo modelo de KcsA inactivado, la proteína OPEN, que ayuden a resolver cuál es la conformación más probable del filtro de selectividad cuando el canal está inactivado. Se debate entre dos posibles conformaciones, una colapsada (Perozo y col.) y una capaz de unir iones pero no de conducirlos (Valiyaveetil y col.). Los resultados del nuevo modelo se discuten junto con los obtenidos anteriormente en el grupo de investigación con el que se realizó este trabajo. Estos resultados anteriores se obtuvieron utilizando otros modelos distintos que se resumen a continuación junto con el nuevo modelo:

**WT pH 7:** proteína silvestre de KcsA a pH 7, pH neutro, modelo de canal cerrado.

**WT pH 4:** proteína silvestre de KcsA a pH 4, pH ácido, modelo de canal inactivado.

**$\Delta$ 125:** proteína silvestre KcsA sin el dominio C-terminal, modelo de canal inactivado independiente de pH.

**OPEN:** versión mutante de KcsA, modelo de canal inactivado independiente de pH.

Los objetivos de este trabajo son por tanto:

- Expresar y purificar la proteína mutante OPEN
- Estudiar la afinidad de distintos iones conductores y no conductores por el filtro de selectividad.
- A partir de éstas, caracterizar la conformación adoptada por el filtro de selectividad en su estado inactivado para este mutante.

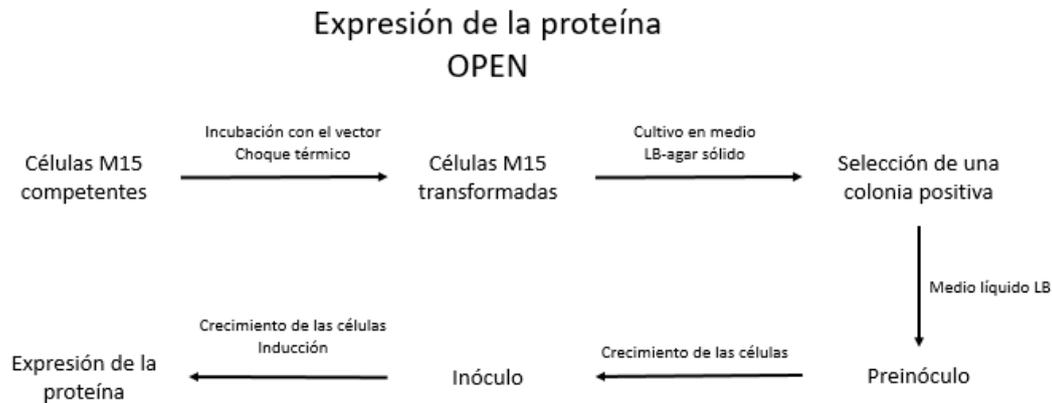
## 5. Materiales y métodos

### A. Expresión y purificación de la proteína KcsA y su versión mutante, OPEN.

Se obtuvo la versión mutante del KcsA, la proteína OPEN, mediante su expresión heteróloga en la cepa *E. coli* M15 (pRep4) y su posterior purificación. Para ello se transformaron células M15 competentes mediante su incubación con el vector de expresión y la realización de un *shock* térmico o choque térmico. Las células transformadas fueron diferenciadas de las no transformadas gracias a la resistencia que presentaron en medio LB-agar sólido frente al antibiótico ampicilina (resistencia otorgada por el plásmido) y frente al antibiótico kanamicina (resistencia intrínseca de la cepa utilizada). El siguiente paso fue la obtención del preinóculo con el objetivo de facilitar la primera etapa del crecimiento de las células. Se seleccionó una de las colonias positivas obtenidas y se introdujo en 100 mL de medio líquido LB estéril suplementado con kanamicina (25 µg/mL, concentración final), ampicilina (100 µg/mL, concentración final) y glucosa (0,04% p/v), los tres suplementos esterilizados por filtración. Se propiciaron las condiciones adecuadas, 37°C y agitación a 200 rpm, durante toda la noche para un óptimo crecimiento de las células y así poder obtener posteriormente el inóculo. Para ello, se mezcló 50 ml del preinóculo con 1 L de medio 2xYT estéril suplementado con, kanamicina (25 mg/L, concentración final) ampicilina (50 mg/L, concentración final) y glucosa (0,04% p/v). Se proporcionaron las condiciones adecuadas, 30°C y 200 rpm, para el crecimiento de las células, esta vez hasta obtener una densidad óptica (OD) de 0,8 a 600 nm. Alcanzada dicha OD se indujo la expresión de la proteína determinada mediante la adición de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, (IPTG), (550 µM), ya que éste análogo de la lactosa controla la expresión inducible del operón *lac*, operón en el cual está basado el sistema de expresión del plásmido utilizado. El tiempo de incubación fue de 2 horas, a 30°C y 200 rpm. El proceso entero se ha representado esquemáticamente (Figura 7).

Tras la incubación se comenzó con el proceso de purificación. Se realizó una centrifugación a 6370 x g y 4°C durante 15 minutos para obtener el precipitado de células. Dicho precipitado fue congelado a -20 °C hasta el momento de su resuspensión, momento en el que se descongelaron y se resuspendieron con 10 mL de tampón (HEPES 20 mM, sacarosa 0,45 M, pH 8) al que se le añadió lisozima de huevo (0,4 mg/mL) y un *cocktail* de inhibidores de proteasas (la cantidad añadida se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante) usando una pipeta estéril. Se sonicó el *pellet* resuspendido y se ultracentrifugó 45 minutos a

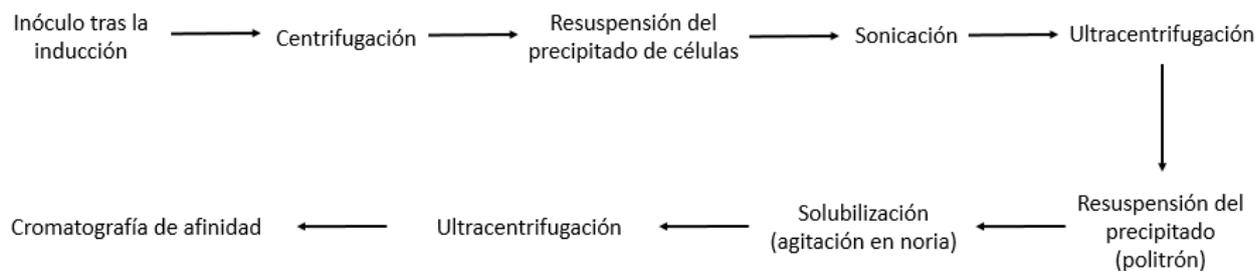
100000 x g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con el tampón de solubilización (HEPES 20 mM, KCl 200 mM,  $\beta$ -D-dodecilmaltósido (DDM) 10 mM, imidazol 50 mM y pH 7,5) y con el uso de un politrón. Se solubilizó mediante agitación en una noria durante la noche a 4°C y, posteriormente se ultracentrifugó durante 45 minutos a 100000 x g.



**Figura 7.** Representación esquemática de los pasos para la expresión de la proteína OPEN.

El último paso de la purificación consistió en una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados utilizando una matriz de sefarosa con  $\text{Ni}^{2+}$  afín a la cola de histidinas, que se encontraba en el extremo N-terminal de las proteínas gracias a la expresión del plásmido. Para preparar la resina se lavaron 350  $\mu\text{L}$  de ésta última con 20 mL de agua destilada en un tubo Falcon y tras dejar decantar y descartar el agua, repitiendo este proceso dos veces, se añadieron 10 mL de tampón de solubilización. Se mezcló el sobrenadante obtenido en la centrifugación con la resina preparada en el tubo Falcon y se incubó la mezcla en agitación suave en una noria 1-2 horas. En una columna de vidrio de BioRad lavada se vertió la mezcla de la resina con la fracción solubilizada y se dejó decantar por gravedad. Se comenzó el proceso de lavado haciendo pasar por la columna el tampón de lavado (Hepes 20 mM, NaCl 200 mM, DDM 5 mM, imidazol 50 mM y pH 7,5), aproximadamente 100 ml, y se midió el espectro absorbancia del líquido eluido entre 230 y 340 nm, en un espectrofotómetro, para asegurar que era igual al espectro de absorbancia del tampón de lavado, nuestro blanco, lo que indicó que el proceso de lavado había finalizado correctamente. Por último tuvo lugar el proceso de elución en el que se hizo pasar 20 mL del tampón de elución (Hepes 20 mM, KCl 100 mM, DDM 5 mM, imidazol 500 mM y pH 7,0) recogiendo la fracción eluida en un total de 9 eppendorfs (1,5 mL cada colecta). El proceso de purificación de la proteína se ha representado esquemáticamente (Figura 8).

## Purificación de la proteína OPEN



**Figura 8.** Representación esquemática de los pasos para la expresión de la proteína OPEN.

Tras la cromatografía, se determinó qué alícuotas de las nueve recogidas contenían la proteína eluida. Para ello se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5%. En el gel se cargaron 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las nueve primeras alícuotas junto con 2,5  $\mu\text{L}$  de tampón de carga 5x, dejando la primera de las diez calles del gel para el marcador de peso molecular. De esta manera se pudieron seleccionar y obtener por un lado, la fracción más concentrada y, por otro, se mezclaron las fracciones más diluidas. Se llevó a cabo una diálisis utilizando un tampón de diálisis Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, DDM 5 mM, pH 7,0 para eliminar el imidazol. Finalmente se cuantificó la concentración de a partir de los espectros de absorción de cada fracción entre las longitudes de onda de 230 y 340 nm utilizando como blanco el tampón de diálisis. Se obtuvo la concentración utilizando como coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ )  $34950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . El rendimiento del proceso entero está en torno a 1 mg/L.

## B. Monitorización mediante espectrofluorimetría de la desnaturalización térmica.

La monitorización de la desnaturalización térmica se llevó a cabo en un espectrofluorímetro *Varian Cary Eclipse*. Se dispusieron las muestras en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se midió la emisión a 340 nm tras una excitación de la muestra a 280 nm cada vez que la temperatura aumentaba 1 °C aproximadamente en un intervalo de 25 a 100 °C con un incremento de 0,6 °C/min, fijo para todos los experimentos. En este intervalo de temperatura la proteína sufre un proceso de desnaturalización que se puede monitorizar gracias a los cambios en la emisión de la fluorescencia de la proteína. La proteína tetramérica KcsA contiene cinco triptófanos por monómero, tres en su parte extracelular (W67, W68, y W87) y dos en su parte intracelular (W26 y W113) que son los responsables de su fluorescencia intrínseca. En su versión mutante OPEN estos triptófanos no han sido modificados con lo que sigue teniendo fluorescencia intrínseca. El aumento de temperatura provoca la desnaturalización térmica irreversible de la proteína que consiste en la disociación de sus cuatro subunidades y a su vez, en el desplegamiento de cada subunidad. Este cambio drástico en la conformación se ve reflejado en un cambio en la fluorescencia intrínseca de la proteína, ya que al cambiar el entorno de los triptófanos la fluorescencia de estos decae notablemente. Este cambio en la fluorescencia sigue una curva sigmoide como consecuencia del proceso de desnaturalización proteica al que corresponde. A partir del ajuste de dicha curva en el programa KaleidaGraph (Synergy Software) se puede obtener la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) mediante la siguiente ecuación:

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

Donde  $F_{340}$  es la fluorescencia observada a 340 nm;  $\alpha_N$  y  $\alpha_D$  son la fluorescencia intrínseca del estado nativo y desnaturalizado respectivamente a 298 K;  $\beta_N$  y  $\beta_D$  son la pendiente de las líneas base del estado nativo y desnaturalizado respectivamente;  $T$  es la temperatura;  $T_m$  es la temperatura de desnaturalización, temperatura a la cual el 50% de la proteína se encuentra desnaturalizada;  $\Delta H_{D-N}$  es el cambio de entalpía de la desnaturalización y  $R$  es la constante de los gases (24).

Se realizaron experimentos en los que se prepararon disoluciones con 1  $\mu\text{M}$  de proteína OPEN en HEPES 20 mM pH 7, DDM 5 mM y con una determinada concentración de

Na<sup>+</sup> residual según la concentración de proteína del *stock* a las que se le fueron añadiendo concentraciones crecientes de los iones Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. La adición de cualquiera de estos iones implica la estabilización térmica de la proteína y por tanto un desplazamiento hacia la derecha de la sigmoide que describe su proceso de desnaturalización debido a que su T<sub>m</sub> se ve aumentada. Este efecto estabilizador se explica porque al unirse los iones al filtro de selectividad estos estabilizan la forma tetramérica nativa del canal frente a la monomérica desnaturalizada, ya que los iones interactúan con las cuatro subunidades a la vez, manteniéndolas unidas.

Para una misma concentración, la estabilización térmica será mayor para aquellos iones cuya constante de disociación (K<sub>D</sub>) sea menor, es decir, para aquellos iones que se unan con más afinidad al canal de potasio, como se refleja en la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{des} = \Delta G_0 + RT \ln \left( 1 + \frac{[L]}{K_d} \right) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde  $\Delta G_{des}$  y  $\Delta G_0$  son los cambios en la energía libre de desnaturalización en presencia y ausencia de ion respectivamente; K<sub>D</sub> es la constante de disociación; y [L] la concentración de ion (8).

De esta manera, mediante el uso del programa Origin (OriginLab), conociendo la T<sub>m</sub> se puede obtener una K<sub>D</sub> aparente ajustando la curva obtenida al representar el cociente  $\Delta T_m/T_m$  vs la concentración de un ion en concreto con la siguiente ecuación:

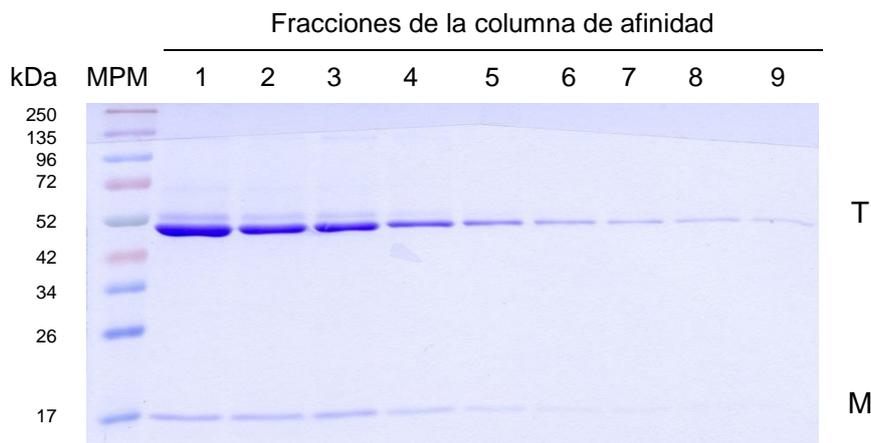
$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{T_m - (T_m)_0}{T_m} = \frac{R(T_m)_0}{\Delta H_0} \ln \left( 1 + \frac{[L]}{K_D} \right) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde T<sub>m</sub> y (T<sub>m</sub>)<sub>0</sub> representan las temperaturas de desnaturalización en presencia y ausencia de ion respectivamente; y  $\Delta H_0$  es la variación de entalpía de la desnaturalización en ausencia de ion (8). La Ecuación 2 y la Ecuación 3 derivan de la simplificación que contempla un único sitio de unión cuyo desplegamiento se puede representar con un mecanismo de dos estados reversibles. Esta simplificación hace que la K<sub>D</sub> obtenida sea una constante aparente y no la real, pero esto no impide extraer conclusiones basadas en las diferencias en la estabilidad térmica provocadas por los diferentes iones.

## 6. Resultados

### A. Expresión y purificación de la proteína OPEN.

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de la proteína mutante OPEN en presencia de distintos tipo de iones (conductores y no conductores) se llevó a cabo varias veces un proceso de expresión y purificación de la proteína en cuestión cuyos resultados se comentan a continuación. Como se explica en el apartado de materiales y métodos, tras la expresión de la proteína OPEN y su purificación mediante una cromatografía de afinidad, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12,5% para determinar qué alícuotas obtenidas en la cromatografía de afinidad eran las que contenían la proteína (Figura 9).

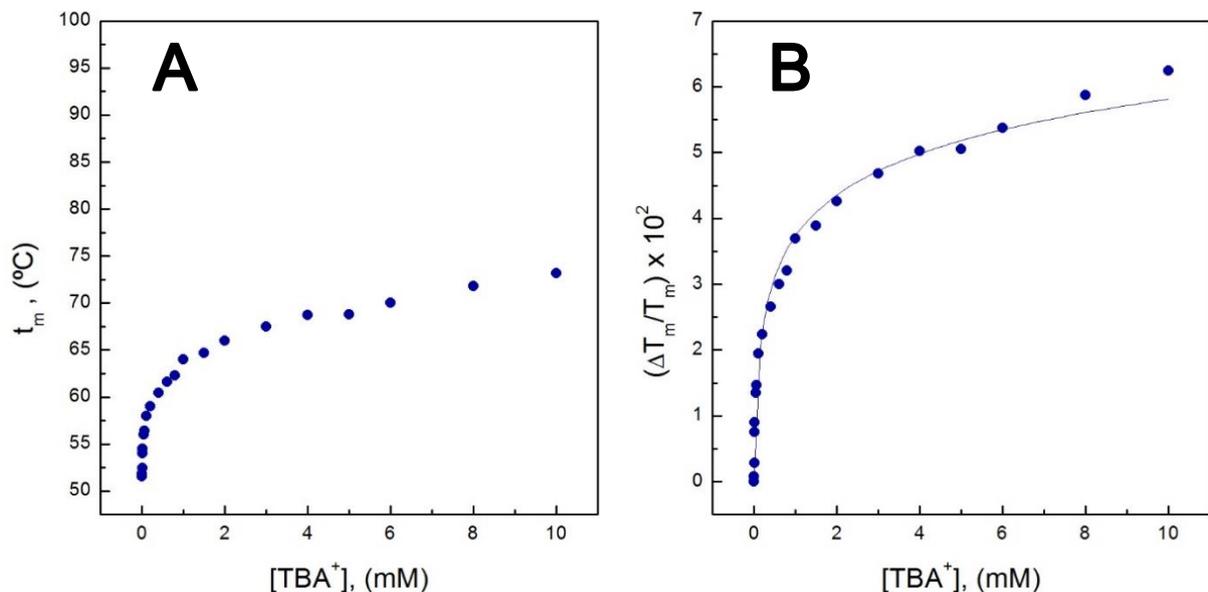


**Figura 9. Caracterización del mutante OPEN de KcsA mediante SDS-PAGE (12,5%).** La primera calle corresponde al marcador de peso molecular (MPM). El resto de las calles numeradas del 1 al 9 corresponden con las nueve primeras fracciones recogidas en la cromatografía.

En la Figura 9, se observa que en todas las calles aparece una banda en torno a 50 kDa que corresponden a la proteína OPEN nativa, por lo que se encuentra en forma tetramérica (T). En la mayoría de las calles se puede apreciar también la presencia de una banda a 17 kDa, muy minoritaria respecto a la de 50 kDa y que corresponde a la proteína OPEN en su forma monomérica (M). Las tres primeras calles son las que muestran las bandas más intensas por lo que son las fracciones con mayor concentración de proteína. La primera fracción se cuantificó directamente mediante técnicas espectroscópicas mientras que la segunda y la tercera fracción se mezclaron para obtener una única fracción antes de su cuantificación y lo mismo se hizo con el resto de fracciones. En promedio, teniendo en cuenta las diferentes purificaciones que se llevaron a cabo, se obtuvo un rendimiento de 1,065 mg/L de cultivo.

## B. Monitorización mediante espectrofluorimetría de la desnaturalización térmica.

Con el objetivo de verificar la proteína OPEN como modelo de canal inactivado, se realizaron experimentos de interacción entre dicha proteína y el TBA<sup>+</sup>. Como se explicó en la introducción, el TBA<sup>+</sup> es un bloqueador del KcsA que se une de manera prácticamente irreversible a la cavidad entrando por la zona intracelular (Figura 6). La monitorización de la desnaturalización térmica mediante espectrofluorimetría permitió estudiar la estabilidad térmica de la proteína OPEN en presencia de concentraciones crecientes de TBA<sup>+</sup> y a partir de estos experimentos, mediante el ajuste matemático de los datos se obtuvo la constante de disociación ( $K_D$ ) del complejo TBA<sup>+</sup>- proteína OPEN a pH 7 (ver materiales y métodos) que resultó ser  $(1,6 \pm 0,4) \times 10^2$  mM (Figura 10). Este parámetro es mucho mayor que el que presenta el canal en conformación cerrada conductora (WT pH 7,  $K_D = (5 \pm 2) \times 10^{-6}$  mM), lo que apoya la idea de que el mutante open tiene la primera compuerta abierta pese a estar a pH neutro, disminuyendo su afinidad por el bloqueador (Figura 10).

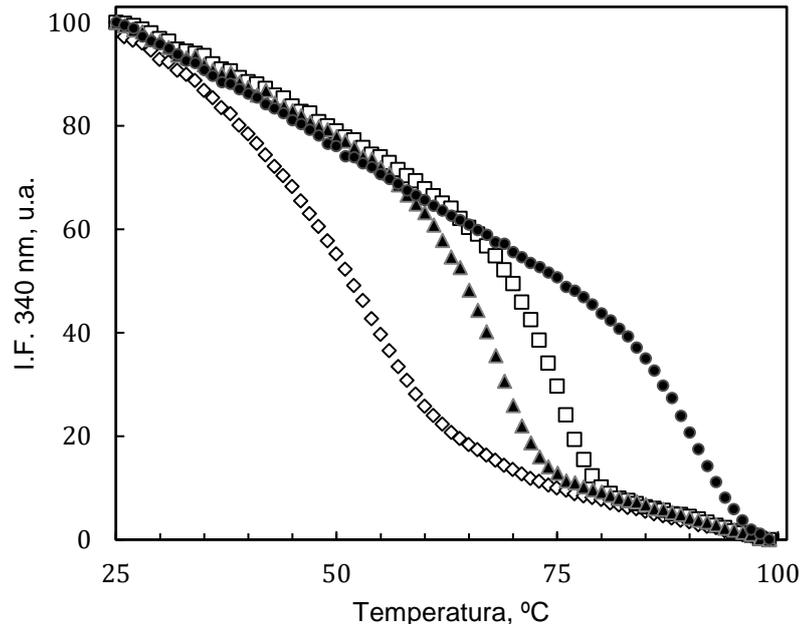


**Figura 10. Resultados gráficos de los experimentos de interacción de la proteína OPEN con el bloqueador TBA<sup>+</sup>.** Las muestras de proteína OPEN 1  $\mu$ M (stock con una mínima cantidad de Na<sup>+</sup> para mantener estable la proteína) fueron preparadas en un tampón de HEPES 20 mM pH 7, DDM 5 mM y concentraciones crecientes del bloqueador TBA<sup>+</sup>. Panel A: representación de los valores de  $T_m$  en función de la concentración de TBA<sup>+</sup>. Panel B: ajuste matemático (Ecuación 3) de los datos experimentales del Panel A.

Una vez comprobada la veracidad del modelo, los siguientes experimentos se dirigieron a recabar datos sobre la afinidad de diferentes iones por la proteína OPEN y por consiguiente, por el filtro de selectividad en estado inactivado. Estos datos ayudarán a discernir cuál de las dos conformaciones del filtro explicadas en la introducción, una

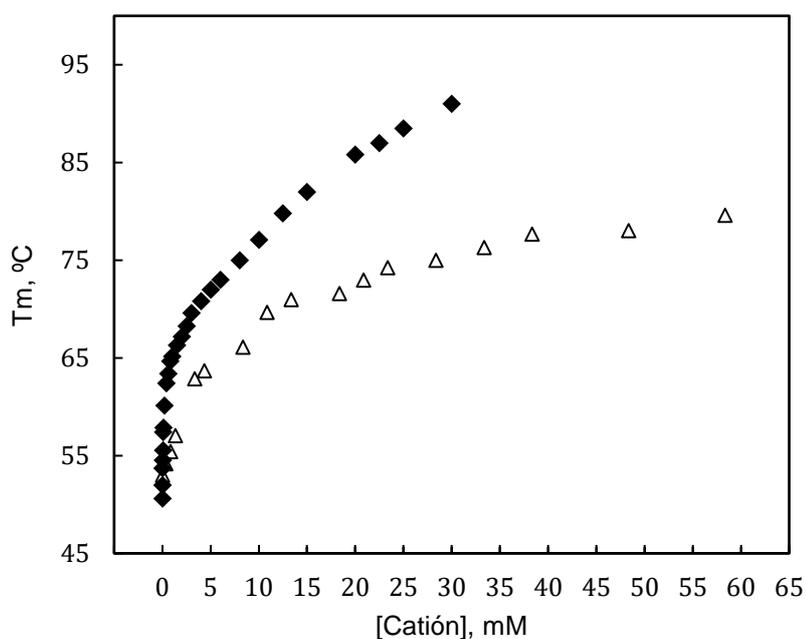
conformación colapsada incapaz de unir iones o una capaz de unirlos pero no conducirlos, es la adoptada por este mutante. Los experimentos consistieron en la monitorización de la desnaturalización térmica mediante espectrofluorimetría para estudiar la estabilidad térmica de la proteína OPEN en presencia de diferentes iones: conductores ( $K^+$ ,  $Rb^+$  y  $Cs^+$ ) y no conductores ( $Na^+$ ) a pH neutro. Se obtuvieron las  $K_D$  para cada interacción proteína-ion para estudiar la afinidad de los iones con la proteína OPEN y los sitios ocupados en el filtro de selectividad.

En la Figura 11 se ilustra cómo varía la estabilidad térmica en función del tipo de ion ( $Na^+$  o  $K^+$ ) y en función a su vez de la concentración. Se observa como la fluorescencia decae desde un primer momento al aumentar la temperatura como consecuencia general del aumento del *quenching* en la fluorescencia al aumentar la temperatura. Llegado a un punto la fluorescencia decae notablemente, con una pendiente bastante pronunciada, dando lugar a una región tipo sigmoide, como consecuencia del proceso de desnaturalización. El proceso de desnaturalización consiste en una primera disociación de las cuatro subunidades que forman el canal que posteriormente pierden parte de su estructura secundaria. Finalmente, a altas temperaturas la proteína está desnaturalizada y la curva vuelve a decrecer linealmente aunque con una pendiente diferente a la primera región de la curva a bajas temperaturas.



**Figura 11. Monitorización por fluorescencia de la desnaturalización térmica de la proteína OPEN a dos concentraciones diferentes de  $K^+$  o  $Na^+$ .** Se muestran los datos normalizados que representan el decaimiento de la intensidad de fluorescencia intrínseca de la proteína OPEN, a 340 nm en unidades arbitrarias cuando es excitada a 280 nm, como consecuencia de su desnaturalización al incrementar la temperatura ( $^{\circ}C$ ). Se representan cuatro condiciones según el tipo de ion y su concentración en la muestra: KCl 2 mM ( $\blacktriangle$ ), KCl 30 mM ( $\bullet$ ), NaCl 2 mM ( $\diamond$ ) ó NaCl 30 mM ( $\square$ ). Las muestras, cuya concentración de proteína fue de  $1\mu M$ , fueron preparadas en un tampón de HEPES 20 mM pH 7, DDM 5 mM y su correspondiente ion.

Si comparamos las cuatro condiciones en las que fue llevado a cabo el experimento observamos que para una misma concentración de iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) existe una mayor estabilidad térmica cuando la proteína está en presencia de  $\text{K}^+$  en lugar de  $\text{Na}^+$  ya que, como se aprecia, la curva sigmoide del  $\text{K}^+$  se encuentra más desplazada hacia la derecha y por tanto se obtendrá de ella un mayor valor de  $T_m$ . Por otro lado, para un mismo ion se observa que a mayor concentración existe una mayor estabilidad térmica, como ya se explicó con la Ecuación 2 en el apartado de materiales y métodos. A partir del ajuste matemático de estas curvas sigmoides mediante la Ecuación 1 se pueden obtener los valores de  $T_m$ . En la Figura 12 se representan las  $T_m$  frente a las concentraciones de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ . De esta figura se pueden extraer las mismas ideas que en la figura anterior: para ambos iones, la proteína OPEN aumenta su estabilidad térmica a medida que aumenta la concentración del ion y por otro lado, en general el  $\text{K}^+$  aumenta más la estabilidad térmica.

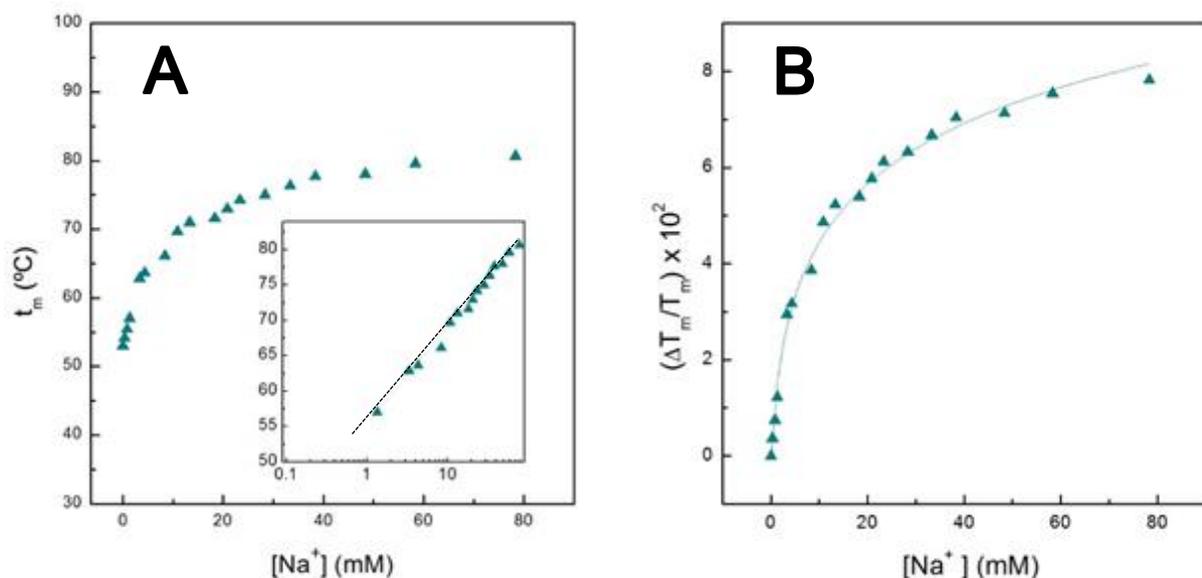


**Figura 12. Representación de los valores de  $T_m$  en función de la concentración de catión.** Se muestran los valores obtenidos de las  $T_m$  dependiendo de la concentración de  $\text{K}^+$  ( $\blacklozenge$ ) o  $\text{Na}^+$  ( $\triangle$ ). Las muestras de proteína OPEN  $1 \mu\text{M}$  fueron preparadas en un tampón de HEPES 20 mM pH 7, DDM 5 mM y su correspondiente ion.

Los datos experimentales obtenidos se pueden ajustar con la Ecuación 3 para obtener los valores de  $K_D$  (Tabla 1). La Ecuación 3 es una función logarítmica y por tanto su representación semilogarítmica da como resultado una recta. Sin embargo, cuando existe más de un set de sitios de unión, se obtiene una gráfica compuesta por varias rectas con diferentes pendientes, tantas como sets de unión. Se realizaron experimentos en los que se monitorizó la desnaturalización térmica en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$ . A partir de los datos se obtuvieron las  $K_D$  y el número de eventos de unión.

## Ion Na<sup>+</sup>

El ion Na<sup>+</sup> es un ion no conductor que ocupa los sitios S1 y S4 del filtro de selectividad en la estructura cristalográfica del canal en estado de reposo (Figura 1). La representación de los datos obtenidos para las T<sub>m</sub> en escala semilogarítmica da una única recta que equivale a un único evento de unión (Figura 13, Panel A). Este único evento de unión se ha asociado a los sitios S1 y S4 (8). El ajuste matemático de estos datos mediante la Ecuación 3 (Figura 13, Panel B) permite la obtención de la K<sub>D</sub> (1,1 ± 0,2 mM) correspondiente al evento de unión que engloba los sitios S1 y S4.

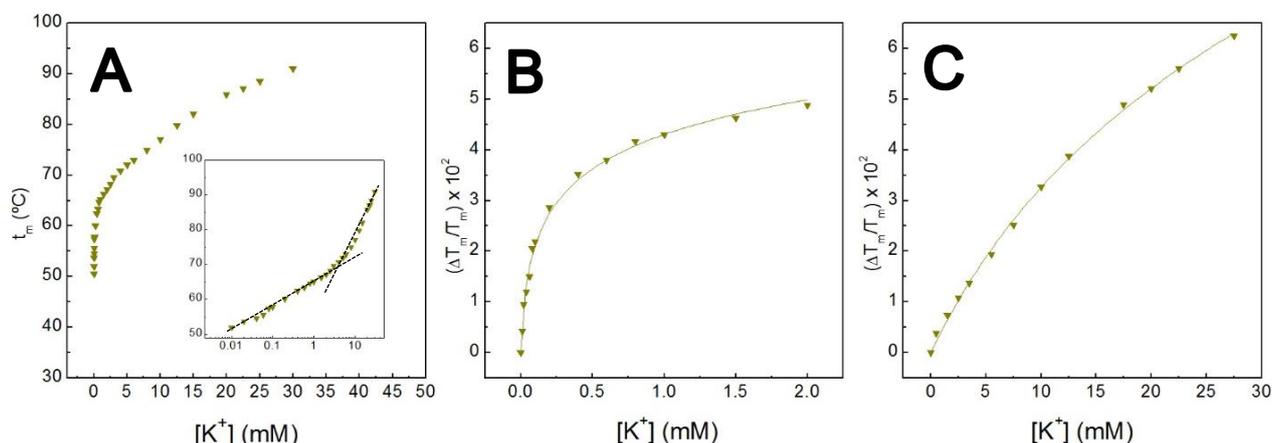


**Figura 13. Resultados gráficos de los experimentos de interacción de la proteína OPEN con Na<sup>+</sup>.** Las muestras de proteína OPEN 1 μM fueron preparadas en un tampón de HEPES 20 mM pH 7, DDM 5 mM y concentraciones crecientes del Na<sup>+</sup>. Panel A: representación de los valores de T<sub>m</sub> en función de la concentración de Na<sup>+</sup> tanto en escala normal como semilogarítmica (inserto). Panel B: ajuste matemático (Ecuación 3) de los datos experimentales del Panel A.

## Ion K<sup>+</sup>

El ion K<sup>+</sup> es un ion conductor que ocupa los sitios S1, S2, S3 y S4 del filtro de selectividad en la estructura cristalográfica del canal en estado de reposo. En el gráfico en el que se representan las T<sub>m</sub> en escala semilogarítmica (Figura 14, Panel A) se observan dos rectas, dos tramos con diferente pendiente, que indican que el K<sup>+</sup> presenta dos eventos de unión. Estos eventos de unión se han asociado previamente con dos sets de sitios de unión diferentes, S1 y S4 por un lado y, S2 y S3 por otro lado. A baja concentración el K<sup>+</sup> ocupa los sitios S1 y S4, mientras que a alta concentración pasa a ocupar también los sitios S2 y S3 (8).

Se realizó el ajuste matemático, mediante la Ecuación 3, de las  $T_m$  obtenidas a baja concentración (Figura 14, Panel B) y las obtenidas a alta concentración (Figura 14, Panel C). De cada ajuste matemático se obtuvo una  $K_D$ . La primera  $K_D$  ( $(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-2}$  mM) corresponde con el primer evento de unión (sitios S1 y S4). Esta  $K_D$  tiene un valor bajo porque representa un evento de unión con alta afinidad, como se explicó en la introducción, el  $K^+$  tiene alta afinidad por el canal, característica propia de un ion conductor. La segunda  $K_D$  ( $(1,3 \pm 0,1) \times 10^1$  mM) corresponde con el segundo evento de unión (sitios S2 y S3). La segunda  $K_D$  tiene un valor mayor porque representa un evento de unión de menor afinidad permitiendo así la disociación del ion y por tanto su conducción.

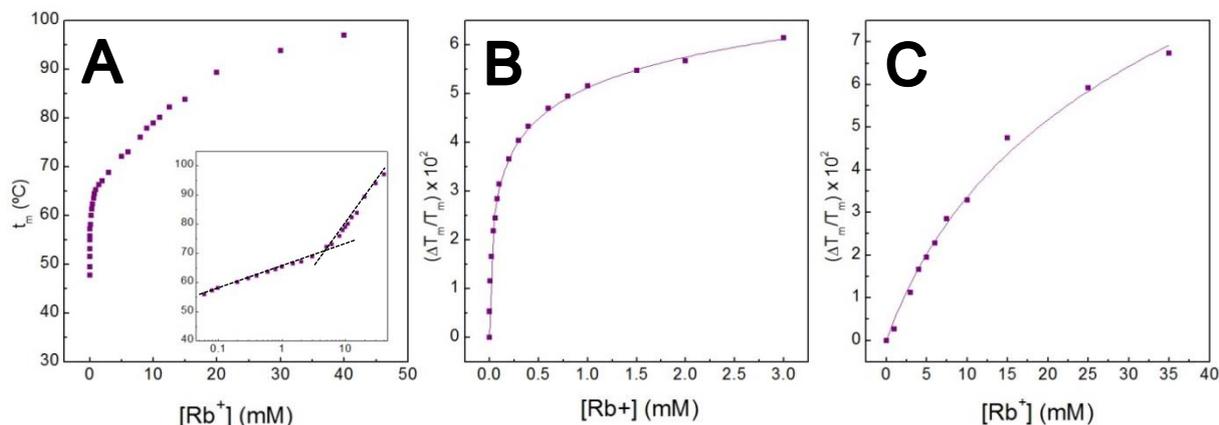


**Figura 14. Resultados gráficos de los experimentos de interacción de la proteína OPEN con  $K^+$ .** Las muestras de proteína OPEN 1  $\mu$ M fueron preparadas en un tampón de HEPES 20 mM, pH 7, DDM 5 mM y concentraciones crecientes de  $K^+$ . Panel A: representación de los valores de  $T_m$  en función de la concentración de  $K^+$  tanto en escala normal como semilogarítmica (inserto). Panel B: ajuste matemático (Ecuación 3) de los datos experimentales del Panel A en el rango de concentraciones de 0 a 2 mM. Panel C: ajuste matemático (Ecuación 3) de los datos experimentales del Panel A en el rango de concentraciones 2,5 a 30 mM.

### Ion $Rb^+$

El ion  $Rb^+$  es un ion conductor que ocupa los sitios S1, S3 y S4 del filtro de selectividad en la estructura cristalográfica del canal en estado de reposo. Al igual que el  $K^+$ , presenta dos rectas en el gráfico en escala semilogarítmica (Figura 15, Panel A) que indican que el  $Rb^+$  presenta dos eventos de unión propios de un ion conductor. A baja concentración ocupa los sitios S1 y S4, mientras que a alta pasa a ocupar también el sitio S3. La representación del ajuste matemático (Ecuación 3) de las  $T_m$  obtenidas a baja y alta concentración (Figura 15, Panel B y Panel C respectivamente) permitió obtener dos  $K_D$ . La primera ( $(3,7 \pm 0,4) \times 10^{-3}$  mM) corresponde con el primer evento de unión de alta afinidad (S1 y S4), es decir, con el evento de unión que ocurre a baja concentración de  $Rb^+$ . La segunda ( $1,3 \pm 0,1) \times 10^1$  mM) con el segundo evento de unión de baja afinidad (S3), el que tiene lugar a alta concentración de  $Rb^+$ .

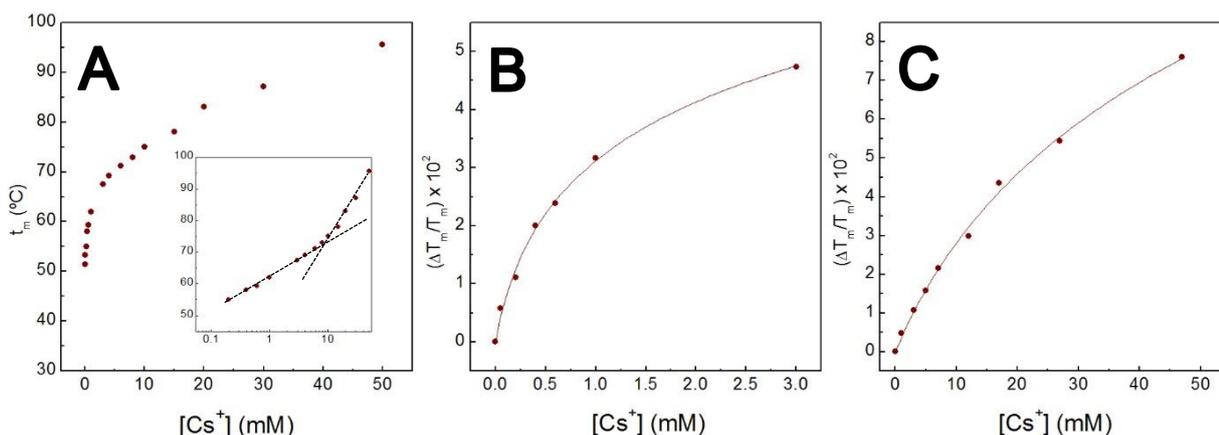
El comportamiento del  $\text{Rb}^+$  es parecido al del  $\text{K}^+$  con la diferencia de que, como se sabe por el estudio de estructuras cristalinas, el  $\text{Rb}^+$  no ocupa el sitio S2. Además los valores de las  $K_D$  obtenidas para el  $\text{Rb}^+$  son menores que para el  $\text{K}^+$ .



**Figura 15. Resultados gráficos de los experimentos de interacción de la proteína OPEN con  $\text{Rb}^+$ .** Las muestras de proteína OPEN  $1 \mu\text{M}$  fueron preparadas en un tampón de HEPES 20 mM, pH 7, DDM 5 mM y concentraciones crecientes de  $\text{Rb}^+$ . Panel A: representación de los valores de  $T_m$  en función de la concentración de  $\text{Rb}^+$  tanto en escala normal como semilogarítmica (inserto). Panel B: ajuste matemático (Ecuación 3) de los datos experimentales del Panel A en el rango de concentraciones de 0 a 3 mM. Panel C: ajuste matemático (Ecuación 3) de los datos experimentales del Panel A en el rango de concentraciones 5 a 40 mM.

### Ion $\text{Cs}^+$

El ion  $\text{Cs}^+$  es un ion conductor que ocupa los sitios S1, S3 y S4 del filtro de selectividad en la estructura cristalográfica del canal en estado de reposo. En el gráfico en escala semilogarítmica (Figura 16, Panel A) se observan dos rectas que indican que el  $\text{Cs}^+$  presenta dos eventos de unión, como en el caso del  $\text{K}^+$  y del  $\text{Rb}^+$ . A baja concentración ocupa los sitios S1 y S4, mientras que a alta pasa a ocupar también el sitio S3, al igual que el  $\text{Rb}^+$ . Se representan las  $T_m$  obtenidas a baja y alta concentración transformadas con la Ecuación 3 (Figura 16, Panel B y Panel C respectivamente). A partir de los ajustes matemáticos se obtiene la primera  $K_D$  ( $(1,8 \pm 0,3) \times 10^{-1}$  mM) que corresponde con el primer evento de unión de alta afinidad (S1 y S4) y la segunda ( $(1,6 \pm 0,2) \times 10^1$  mM) que corresponde con el segundo evento de unión de baja afinidad (S3). El comportamiento del  $\text{Cs}^+$  es parecido al del  $\text{Rb}^+$  con la diferencia de que los valores de las  $K_D$  obtenidas para el  $\text{Cs}^+$  son mayores que los valores de las  $K_D$  obtenidas para el  $\text{Rb}^+$ , es decir, que el  $\text{Cs}^+$  presenta en general, menos afinidad por el canal que el  $\text{Rb}^+$ .



**Figura 16. Resultados gráficos de los experimentos de interacción de la proteína OPEN con Cs<sup>+</sup>.** Las muestras de proteína OPEN 1 μM fueron preparadas en un tampón de HEPES 20 mM, pH 7, DDM 5 mM y concentraciones crecientes de Cs<sup>+</sup>. Panel A: representación de los valores de T<sub>m</sub> en función de la concentración de Cs<sup>+</sup> tanto en escala normal como semilogarítmica (inserto). Panel B: ajuste matemático (Ecuación 3) de los datos experimentales del Panel A en el rango de concentraciones de 0 a 3 mM. Panel C: ajuste matemático (Ecuación 3) de los datos experimentales del Panel A en el rango de concentraciones 3 a 50 mM.

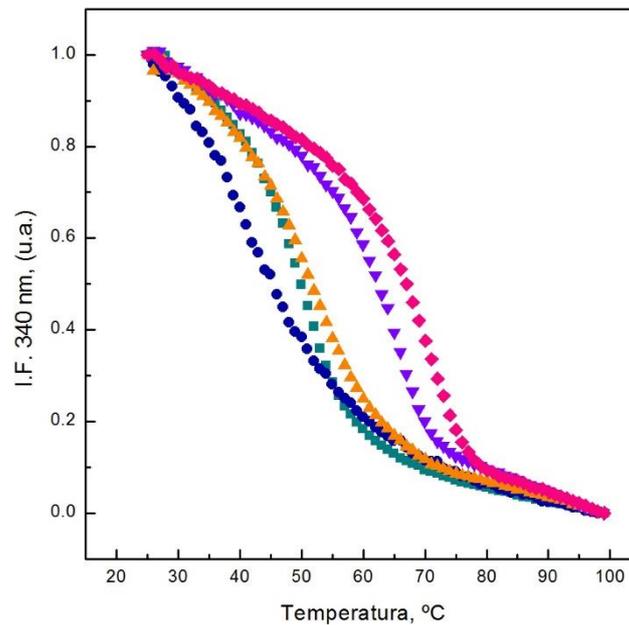
La bondad de los ajustes matemáticos de la Ecuación 3 es alta en todos los casos, siempre con un valor de R<sup>2</sup> por encima de 0,99. Las K<sub>D</sub> obtenidas para cada interacción de la proteína OPEN con los distintos iones se recopilan en la Tabla 1.

|                 | Primera K <sub>D</sub> (mM)    | Segunda K <sub>D</sub> (mM)   |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Na <sup>+</sup> | 1,1 ± 0,2                      | -                             |
| K <sup>+</sup>  | (1,4 ± 0,2) × 10 <sup>-2</sup> | (1,3 ± 0,1) × 10 <sup>1</sup> |
| Rb <sup>+</sup> | (3,7 ± 0,4) × 10 <sup>-3</sup> | (1,3 ± 0,1) × 10 <sup>1</sup> |
| Cs <sup>+</sup> | (1,8 ± 0,3) × 10 <sup>-1</sup> | (1,6 ± 0,2) × 10 <sup>1</sup> |

**Tabla 1. Resumen de los valores obtenidos de las K<sub>D</sub> de los complejos formados entre la proteína OPEN y los distintos iones (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>).** Se muestran los valores obtenidos de las primeras y segundas (en los casos en los que corresponda) constantes de disociación junto con su error.

Además de estos experimentos de desnaturalización térmica en presencia de distintos iones también se realizaron experimentos en presencia del bloqueador TBA<sup>+</sup> junto con Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> (Figura 17). En la mutante OPEN, parecen existir diferencias en función de si la proteína se encuentra solamente en presencia del bloqueador TBA<sup>+</sup> o si además se añaden estos iones. Cuando la proteína OPEN se encuentra solamente en presencia de TBA<sup>+</sup> no parece tener lugar el efecto de estabilización térmica propio del TBA<sup>+</sup>. Es por ello que la curva de

desnaturalización correspondiente a únicamente TBA<sup>+</sup> en el medio se parece bastante a la curva de desnaturalización cuando la proteína se encuentra en presencia solamente de Na<sup>+</sup>. Sin embargo, cuando el experimento se realiza en condiciones en las que además de TBA<sup>+</sup> la proteína está en presencia de iones (Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>) sí tiene lugar una notable estabilización térmica, sobretodo en el caso del K<sup>+</sup>.



**Figura 17. Resultados gráficos de los experimentos de interacción de la proteína OPEN con el bloqueador TBA<sup>+</sup> en diferentes condiciones.** Las muestras de proteína OPEN 1  $\mu$ M fueron preparadas en un tampón de HEPES 20 mM, pH 7, DDM 5 mM con concentraciones de partida de 0,5 mM de TBA<sup>+</sup> (●); 1,5 mM de Na<sup>+</sup> (■); 1 mM de K<sup>+</sup> (▼); 1,5 mM de Na<sup>+</sup> y 0,5 mM de TBA<sup>+</sup> (▲); 1 mM de K<sup>+</sup> y 0,5 mM de TBA<sup>+</sup> (◆).

## 7. Discusión.

Los resultados obtenidos en los experimentos de desnaturalización térmica de la proteína OPEN en presencia del bloqueador TBA<sup>+</sup> demuestran que la proteína OPEN es un modelo de canal inactivado adecuado. Si comparamos la  $K_D$  obtenida para el modelo de canal inactivado OPEN ( $K_D = (1,6 \pm 0,4) \times 10^1 \mu\text{M}$ ) con la obtenida para el modelo de canal cerrado WT a pH 7 ( $K_D = (5 \pm 2) \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ) vemos que el valor de la  $K_D$  para la proteína OPEN es tres órdenes de magnitud mayor, lo que indica una afinidad mucho menor del TBA<sup>+</sup>. Esta menor afinidad concuerda con la idea de que el TBA<sup>+</sup> encaja peor en la cavidad del canal cuando la primera compuerta se encuentra abierta (como ocurre en el estado inactivado), ya que en esta conformación la geometría del sitio de unión del TBA<sup>+</sup> no es la adecuada. Este resultado es parecido al obtenido para los otros dos modelos de canal inactivado con los que se ha trabajado anteriormente  $\Delta 125$  ( $K_D = (1,7 \pm 0,3) \times 10^1 \mu\text{M}$ ) y WT a pH 4 ( $K_D = (3,5 \pm 0,4) \times 10^2 \mu\text{M}$ ). La baja afinidad del TBA<sup>+</sup> por estos dos últimos modelos respecto al modelo de canal cerrado se explica de la misma manera que la baja afinidad que presenta por la proteína OPEN. Sin embargo, en el caso del modelo de WT a pH4, la afinidad es aún menor y esta diferencia probablemente se deba a las condiciones de pH ácido que pueden resultar en la protonación de residuos del canal que pueden dificultar todavía más la unión del TBA<sup>+</sup>.

Los resultados obtenidos en los experimentos de desnaturalización térmica de la proteína OPEN en presencia de iones conductores K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> y en presencia del ion no conductor Na<sup>+</sup>, concuerdan cualitativamente con los obtenidos anteriormente en el grupo de investigación para  $\Delta 125$  y WT pH 4, otros dos modelos del estado inactivado de KcsA, así como para el modelo cerrado WT. Las  $K_D$  obtenidas para estos modelos y para el modelo inactivado OPEN se recogen en la Tabla 2.

En los resultados del modelo de canal cerrado WT pH 7 vemos las afinidades de los distintos iones por el filtro cuando éste se encuentra en un estado conductor. Tenemos por un lado, el ion no conductor Na<sup>+</sup> que presenta únicamente una  $K_D$  ya que solamente se une a los sitios S1 y S4 en un único evento de unión. Además el valor de esta  $K_D$  es mucho mayor que el obtenido para los iones conductores, representando así la baja afinidad propia de un ion no conductor y que es la razón por la cual es desplazado por los iones conductores, más afines al canal.

| Ion             | WT pH 7                   |                           | WT pH 4                   |                           | Δ125                      |                           | OPEN                      |                           |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                 | 1ª K <sub>D</sub><br>(mM) | 2ª K <sub>D</sub><br>(mM) |
| K <sup>+</sup>  | 0,0019                    | 2,5                       | 0,089                     | 8,1                       | 0,023                     | 8,3                       | 0,014                     | 13                        |
| Na <sup>+</sup> | 3,3                       | -                         | 11,5                      | -                         | 3,1                       | -                         | 1,05                      | -                         |
| Cs <sup>+</sup> | 0,031                     | 13                        | 0,92                      | 17                        | 0,47                      | 10,7                      | 0,18                      | 16,4                      |
| Rb <sup>+</sup> | 0,004                     | 3,7                       | 0,07                      | 6,9                       | 0,006                     | 7,5                       | 0,0037                    | 12,7                      |

**Tabla 2.** Tabla que resume las K<sub>D</sub> obtenidas para cada asociación de los iones K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Ba<sup>2+</sup> con el modelo de canal cerrado WT pH 7 y con los modelos de canal abierto e inactivado WT pH 4, con la proteína Δ125 o con la proteína OPEN.

La primera K<sub>D</sub> correspondiente al K<sup>+</sup>, al ion que interacciona con el KcsA en condiciones fisiológicas, es la de menor valor, indicando que el K<sup>+</sup> es el que se une con mayor afinidad al canal. Esta alta afinidad es propia de un ion conductor y le permite desplazar a otros iones del filtro, generando así la selectividad. Esta primera K<sub>D</sub> representa el evento de unión correspondiente a los sitios S1 y S4, mientras que la segunda K<sub>D</sub>, representa el segundo set de sitios de unión que engloba la unión a S2 y S3. Su valor es mayor, tres órdenes de magnitud, lo que indica una baja afinidad que permite la disociación del K<sup>+</sup> del filtro de selectividad para así poder atravesar el canal. El Rb<sup>+</sup> presenta una afinidad casi tan alta como el K<sup>+</sup>, valores de K<sub>D</sub> parecidos, sin embargo, al igual que el Cs<sup>+</sup>, cuya afinidad es también alta pero menor que la del Rb<sup>+</sup>, no es capaz de unirse al sitio S2.

Si comparamos los resultados obtenidos para los modelos de canal inactivado (WT pH4, Δ125 y OPEN) con el modelo de canal cerrado, observamos que el ion Na<sup>+</sup> sigue comportándose como un ion no conductor, presentando tan solo una K<sub>D</sub>, mientras que los iones K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup>, siguen comportándose como iones conductores, pues presentan dos sitios de unión. En general, las K<sub>D</sub> aumentan respecto a las del modelo cerrado lo que se traduce en una bajada en la afinidad, es decir, los iones presentan más afinidad por el filtro en estado conductor que en estado inactivado. Esta podría ser la causa de la ausencia de la conducción iónica ya que, al presentar los iones una menor afinidad por el filtro en estado inactivado se favorecería la disociación de los mismos. Sin embargo, los datos más relevantes son que, existen eventos de unión que engloban los sitios S2 y S3 para todos los modelos de canal inactivado. Esto implica que los iones son capaces de unirse a los sitios S2 y S3 cuando el filtro se encuentra inactivado, con lo que se descarta la hipótesis de que pueda adoptar una conformación colapsada en la que estos dos sitios no estén disponibles. Los resultados

apoyan por tanto la hipótesis de Valiyaveetil y col. en la que el filtro en estado inactivado adopta una conformación capaz de unir iones en todos sus sitios de unión (S4-S1) pero incapaz de conducirlos.

Otro dato interesante es que, los valores de las  $K_D$  obtenidas para las proteínas  $\Delta 125$  y OPEN son más parecidos entre ellos que los valores de WT pH4. Esto se debe a que las dos primeras representan modelos de canal inactivado independientes del pH. El modelo de WT pH 4 sí que depende del pH y las notables diferencias con los otros dos modelos pueden deberse a las condiciones ácidas en las que se realizan los experimentos. Las diferencia entre las proteínas  $\Delta 125$  y OPEN son mucho menores, pero aun así reflejan que existe una mayor afinidad de los iones (menores valores de  $K_D$ ) por la proteína OPEN. En cualquier caso, con los tres modelos de canal inactivado se llega a las mismas conclusiones con lo que se refuerza la idea de que el filtro de selectividad no se encuentra en una conformación colapsada.

Adicionalmente se realizaron experimentos de desnaturalización térmica con TBA<sup>+</sup> en presencia de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>. De estos experimentos se concluye que es necesario a presencia de un contenido mínimo de iones (Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>) para que el TBA<sup>+</sup> pueda unirse, ya que el efecto de estabilización térmica propio del TBA<sup>+</sup> no se observa cuando la proteína se encuentra en presencia únicamente de dicho bloqueador. Solo se observa este efecto cuando hay, además del TBA<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>, siendo el efecto estabilizador en presencia de K<sup>+</sup> mayor que en presencia de Na<sup>+</sup>. Esto implica que la unión de los iones desencadena un cambio en la proteína que permite la unión de TBA<sup>+</sup>.

## 8. Conclusiones y proyección futura.

En base a todo lo explicado a lo largo del trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se concluye que la proteína mutante OPEN en un modelo de canal abierto e inactivado válido que nos sirve para apoyar resultados anteriores obtenidos con otros modelos distintos de canal abierto e inactivado.
- Se apoya la hipótesis de Valiyaveetil y col. de que la conformación que adopta el filtro de selectividad en su estado inactivado permite la ocupación de los sitios S4-S1 por iones conductores pero no permite la conducción de los mismos.
- Se rechaza por tanto, la hipótesis de Perozo y col. que defienden que la conformación que adopta el filtro inactivado impide la ocupación de los sitios S2 y S3.
- El efecto del bloqueador TBA<sup>+</sup> sobre la proteína mutante OPEN depende de la interacción previa de otros iones (Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>) con el canal, lo que indica que posiblemente producen un cambio de conformación necesario para la unión del TBA<sup>+</sup>.

De cara al futuro sería interesante estudiar, mediante la misma estrategia, la conformación del filtro con las dos compuertas abiertas. Para ello se obtendrían nuevos modelos como el mutante E71A a pH 4, el mutante E71A cortado, o el mutante OPEN junto con la mutación E71A. También podría estudiarse el efecto de determinados moduladores de la actividad de KcsA, como el lípido aniónico, sobre la conformación del filtro de selectividad.

## 9. Bibliografía.

---

1. Hucho F., Angew C. W. Ligand-Gated Ion Channels. *Chemie*. 2001; 3100:3116-40.
2. Gupta, S. P. (Ed.). (2011). Structural and Functional Discrimination of Membrane Proteins. En M. Michael Gromiha, Yu-Yen Ou, Shu-An Chen. (Ed.) *Ion Channels and Their Inhibitors* (pp 1-32) Meerut, India: Springer.
3. Ashcroft, F. M. (2000). Introduction. En F. M. Ashcroft. (Ed.), *Ion Channels and Disease* (pp. 1-2). Oxford, UK: Elsevier.
4. Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*. 2002; 417:523-526.
5. Ashcroft, F. M. (2000). Voltage-gated K<sup>+</sup> channels. En F. M. Ashcroft. (Ed.), *Ion Channels and Disease* (pp. 97-123). Oxford, UK: Elsevier.
6. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998; 280(5360):69-77.
7. MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS*. 2003; 62:65-555.
8. Renart M.L., Triano I., Poveda J. A., Encinar J. A., Fernández A. M., Ferrer-Montiel A.V., Gómez J. y González Ros J.M. Ion Binding to KcsA: Implications in Ion Selectivity and Channel Gating. *Biochemistry*. 2010; 49:9480:9487.
9. Montoya E., Renart L. M., Giudici A. M., Poveda J.A., Fernández A.M., Morales A., González-Ros J.M. Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering the mechanisms of potassium channel selectivity. *Biochimica et biophysica acta*. 2017; 1859(5):779-788.
10. Perozo E., Cortes D.M., Cuello L.G. Structural rearrangements underlying K<sup>+</sup> channel activation gating. *Science*. 1999; 285(5424):73-78.
11. Kuang Q., Purhonen P., Hebert H. Structure of potassium channels. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015; 72:3677–3693.
12. Sansom S. P. M., Shrivastava H. I., Bright J.N., Tate J., Capener C.E., Biggin P.C. Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2002; 1565(2):294-307.
13. Lockless S.W., Zhou M., MacKinnon R. Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K<sup>+</sup> channel. *PLoS biology*. 2007; 5(5):1079-1088.

14. Fowler P.W., Tai K., Sansom S. P. The Selectivity of K<sup>+</sup> Ion Channels: Testing the Hypotheses. *Biophysical Journal*. 2008; 95: 5062–5072
15. Wu D., Dynamic water patterns change the stability of the collapsed filter conformation of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *PLoS ONE*. 2017; 12(10):1-15.
16. Cuello L.G., Jogini V., Cortes D.M., Pan A.C., Gagnon D.G., Dalmas O., et al. Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K<sup>+</sup> channels. *Nature*. 2010 Jul 8; 466(7303):272-275.
17. Liu S., Focke P.J., Matulef K., Bian X., Moënné-Loccoz P., Valiyaveetil F.L., Lockless S.W. Ion-binding properties of a K<sup>+</sup> channel selectivity filter in different conformations. *PNAS*. 2015; 112: 15096–15100.
18. Matulef K., Annen A.W., Nix J.C., Valiyaveetil F.I. Individual Ion Binding Sites in the K<sup>+</sup> Channel Play Distinct Roles in C-type Inactivation and in Recovery from Inactivation. *Structure*. 2016; 24(5):750-761.
19. Kratochvil H. T., Maj M., Matulef K., Annen A. W., Ostmeyer J., Perozo E., Roux B., Valiyaveetil F. I., Zanni M. T. Probing the Effects of Gating on the Ion Occupancy of the K<sup>+</sup> Channel Selectivity Filter Using Two-Dimensional Infrared Spectroscopy. *JACS*. 2017; 139: 8837–8845.
20. Faraldo-Gómez J. D., Kutluay E., Jogini V., Zhao Y., Heginbotham L., Roux B. Mechanism of Intracellular Block of the KcsA K<sup>+</sup> Channel by Tetrabutylammonium: Insights from X-ray Crystallography, Electrophysiology and Replica-exchange Molecular Dynamics Simulations. *JMB*. 2007; 365:649-662.
21. Yohannan S., Hu Y., Zhou Y. Crystallographic Study of the Tetrabutylammonium Block to the KcsA K<sup>+</sup> Channel. *JMB*. 2007; 366:806-814.
22. Cuello L.G., Jogini V., Cortes D. M., Somporpisut A., Purdy M. D., Wiener M. C., Perozo E. Design and characterization of a constitutively open KcsA. *NIH*. 2010; 584(6):1133-1138.
23. Cuello L.G., Jogini V., Cortes D. M., Perozo E. Structural mechanism of C-type inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Nature*. 2010; 466:203-209.
24. Triano I., Barrera F. N., Renart L., Molina M. L., Fernández-Ballester G., Poveda J. A., Fernández A. M., Encinar J. A., Ferrer-Montiel A. V., Otzen D., González-Ros J.M. Occupancy of Nonannular Lipid Binding Sites on KcsA Greatly Increases the Stability of the Tetrameric Protein. *Biochemistry*. 2010; 49:5397-5404.