

FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Expresión y caracterización de KcsA Δ 125

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2017

Autor: Cristian Manuel Alarcón Pérez

Modalidad: Experimental

Tutor: José Antonio Poveda Larrosa

Co-tutora: Ana Marcela Giudici Besseghini

ÍNDICE:

- 1. RESUMEN**
- 2. ANTECEDENTES**
 - 2.1. Canales iónicos**
 - 2.2. Canales de potasio**
 - 2.3. Canal de potasio KcsA**
 - 2.3.1. Características generales y estructurales**
 - 2.3.2. Características funcionales**
- 3. OBJETIVOS**
- 4. MATERIALES Y MÉTODOS**
 - 4.1. Transformación, expresión y purificación de la proteína KcsA silvestre**
 - 4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS**
 - 4.3. Corte de KcsA silvestre con quimotripsina**
 - 4.4. Medición de los espectros de emisión de fluorescencia**
 - 4.5. Monitorización por fluorescencia de la desnaturalización térmica**
- 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
 - 5.1. Purificación de KcsA silvestre**
 - 5.2. Estudio de integridad de KcsA Δ 125**
 - 5.3. Estudio de la estructura terciaria a través de la medición de los espectros de emisión de fluorescencia**
 - 5.4. Monitorización de la unión iónica a KcsA mediante un ensayo de la desnaturalización térmica**
- 6. CONCLUSIONES**
- 7. BIBLIOGRAFÍA**

1. RESUMEN

Los canales de potasio (K^+) son proteínas de membrana que conducen selectivamente iones a través de la membrana. Estos canales están presentes en multitud de seres vivos, desde bacterias hasta eucariotas, donde participan en importantes procesos biológicos. El primer canal de K^+ del que se obtuvo su estructura cristalográfica a alta resolución es KcsA, proveniente de un organismo procariota. La resolución de la estructura de este canal a nivel atómico ha permitido conocer que el canal KcsA presenta dos compuertas, una puerta intracelular constituida por el cruce de hélices transmembrana y otra puerta extracelular correspondiente al filtro de selectividad. Por medio del paso de pH 7 a pH 4, el canal KcsA experimenta un proceso de activación seguido de otro de inactivación que determina la duración de la corriente que pasa por el canal. Este mecanismo es funcionalmente semejante a la inactivación tipo C encontrada en muchos canales voltaje-dependientes, por lo que KcsA se ha convertido en un modelo para su estudio. En el estado inactivado la puerta intracelular permanece abierta, pero la conformación estructural del filtro de selectividad todavía se desconoce, motivo por el cual actualmente sigue siendo objeto de estudio. Sin embargo, debido a que esta conformación se obtiene a pH ácido, dicho estudio se ha visto dificultado debido a que pueden existir errores de interpretación por efectos inespecíficos derivados del cambio de pH. En este sentido, un estudio reciente demuestra que el mutante KcsA $\Delta 125$, al que le falta el extremo C-terminal, solubilizado en detergente estaría en el estado inactivado a pH 7, al contrario que el canal silvestre que quedaría en el estado de reposo. Es por ello que en este trabajo se aborda caracterizar la estructura del filtro de selectividad de KcsA $\Delta 125$ a pH 7 a través de su interacción con cationes conductores y no conductores para extrapolarlo al estado de inactivación del canal KcsA silvestre. Del mismo se infiere que en el estado inactivado el filtro de selectividad del canal podría presentar para el ion conductor K^+ una conformación de dos sets o conjuntos de sitios de unión (uno de alta afinidad y otro de baja afinidad), similar a la del estado de reposo, pero con ciertas diferencias que imposibilitan la conducción iónica; y para el ion no conductor Na^+ , una conformación de un único set de sitios de unión.

2. ANTECEDENTES

2.1. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembrana que facilitan el transporte de iones a través de las membranas celulares a favor de gradiente sin gasto de energía, denominado transporte pasivo. Estas proteínas cambian de conformación permitiendo el cierre o la apertura de los canales (proceso de *gating*, en español proceso de apertura) como respuesta a los estímulos externos. Los canales iónicos contienen en su interior un poro acuoso central a través del cual fluyen iones de forma extremadamente rápida (cerca de 10^7 - 10^8 iones/segundo) y de manera selectiva ¹.

Los canales iónicos pueden existir en dos estados diferentes (el estado abierto y el estado cerrado) que están en continuo equilibrio para determinar el tráfico de iones en el canal. Esta transición entre ambos estados está regulada por ciertos estímulos, que pueden ser la unión de un ligando, el campo eléctrico de la membrana o ambos dependiendo del tipo de canal. Una particularidad de estos canales, es que los estados abiertos normalmente se convierten espontáneamente en estados inactivados que no conducen iones, de forma que definen el tiempo de duración del flujo iónico ¹.

Cuando un canal iónico está cerrado no hay posibilidad de conducción, es decir, los iones no permean a través de él. Sin embargo, cuando un canal iónico está abierto, sí permiten el paso de los iones conductores a través de él. Este flujo de iones sigue una dirección que viene determinada por el gradiente electroquímico, que es la suma del gradiente químico a través de la membrana plasmática y el campo eléctrico que experimenta el ion ¹.

Según los estímulos que condicionan la apertura o cierre del canal, se pueden clasificar los canales iónicos en:

- Canales activados por voltaje: responden a cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática. A este grupo pertenecen los canales de sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y cloro (Cl^-).
- Canales activados por ligando: se abren en respuesta a la unión de un ligando al receptor asociado al canal (receptores ionotrópicos) o al receptor acoplado a proteína G (receptores metabotrópicos).
- Canales mecanosensibles o activados por estímulos mecánicos: responden a impulsos mecánicos, como sería el aumento de presión o tensión en la membrana celular.

Los canales iónicos tienen una gran relevancia en la transmisión del impulso eléctrico en el sistema nervioso y la generación del potencial de acción cardíaco. Participan además en numerosos procesos biológicos, tales como la liberación de insulina, la activación celular o el control del volumen celular. Es por ello que los canales iónicos han despertado un gran interés en la búsqueda de nuevos fármacos.

2.2. Canales de potasio

Los canales de K^+ son proteínas integrales de membrana que poseen un poro acuoso central por el que fluyen cationes de potasio a través de la membrana celular a favor del gradiente electroquímico. Están involucrados en diversos procesos celulares como la secreción de hormonas y neurotransmisores, la regulación del volumen celular o la formación del impulso nervioso en células excitables^{2,3}.

Se conoce que son muchas las subfamilias moleculares de canales de K^+ , cuya apertura es controlada por ciertas señales fisiológicas, como pueden ser el voltaje predominantemente, la concentración de Ca^{2+} y la unión de proteínas G o poliaminas. Los genomas de humanos, *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* contienen de 30 a 100 genes de canales de K^+ cada uno, y sumado a que

algunos de sus ARNm son objeto de *splicing* alternativo, se incrementa aún más la variedad de estas proteínas. Las mutaciones en estos genes que codifican canales de K⁺ han sido vinculadas con varias enfermedades genéticas en humanos, como por ejemplo diabetes, alteraciones en la presión arterial, sordera, epilepsia, arritmias cardíacas y diabetes ⁴.

2.3. Canales de potasio KcsA

2.3.1. Características generales y estructurales

El canal KcsA (abreviado como canal de potasio de *Streptomyces lividans*, A) es un canal de K⁺ procariota de *Streptomyces lividans*, que es una bacteria de suelo, gram-positiva, filamentosa. La identificación, expresión funcional, purificación y caracterización de KcsA, que, hasta entonces, era el único canal iónico de K⁺ procariota conocido, no se remonta hasta mediados de la década de los años noventa ⁶.

En 1998 MacKinnon y colaboradores determinaron a nivel atómico la primera estructura resuelta de un canal de K⁺, el canal KcsA, desde la posición 23 hasta la posición 119 (sin incluir los extremos N- y C- terminales citoplasmáticos) por cristalografía de rayos-X de alta resolución ⁷. En el cristal se observó que KcsA es un tetrámero formado por un poro central acuoso rodeado de cuatro subunidades idénticas de 160 aminoácidos cada una, las cuales poseen un extremo N- y C- terminal citoplasmáticos y dos hélices α transmembrana conectadas por los aproximadamente 30 aminoácidos de la región del poro, que contiene la hélice del poro y la región *p-loop*, poseedora del filtro de selectividad (Figura 1A y B). Además, al igual que otras proteínas de membrana, presenta dos regiones de aminoácidos aromáticos situados en ambas interfases membrana-agua, que son responsables de aportar al canal sus propiedades fluorescentes y de fijar la posición del canal en la membrana plasmática (Figura 1C).

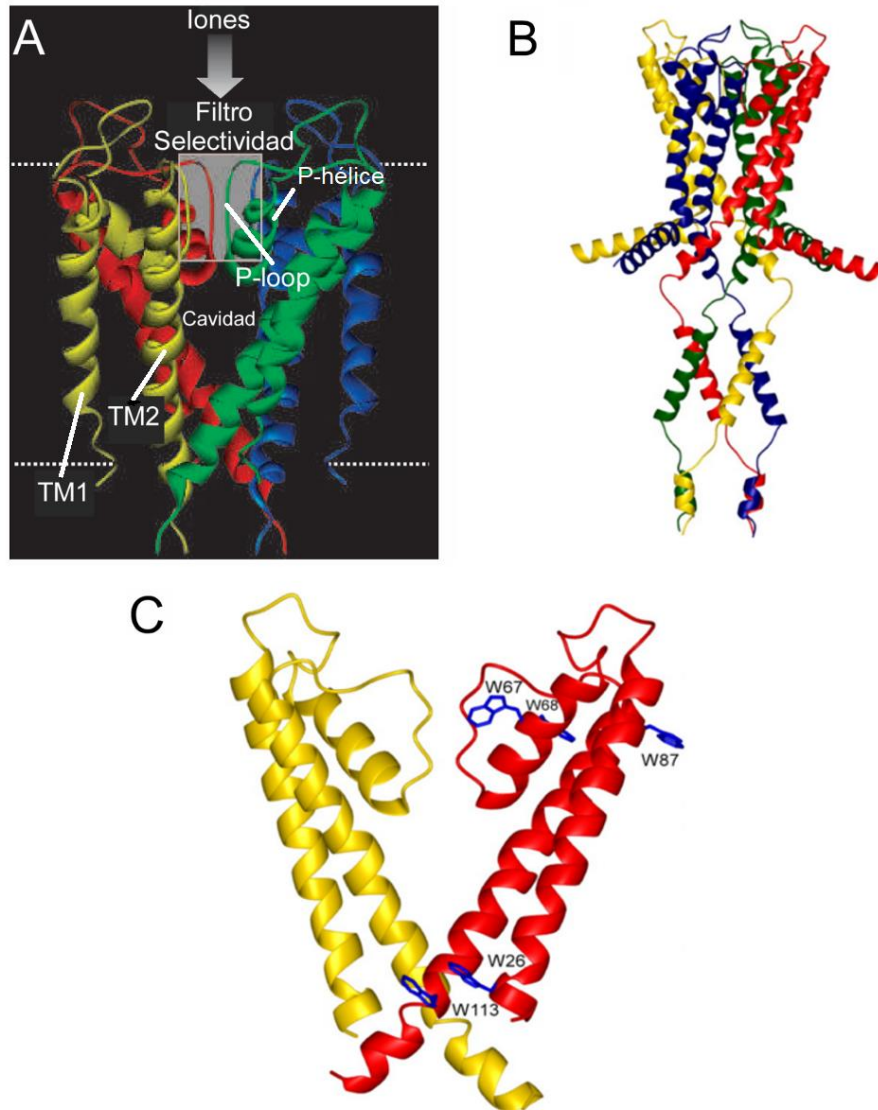


Figura 1. Representaciones de la estructura tridimensional del canal KcsA. En el panel A se representa la zona transmembrana del canal, en la que se muestran los cuatro monómeros de KcsA en distintos colores. En el panel B se observa un modelo estructural para el tetrámero KcsA de estructura completa. En el panel C se presentan dos monómeros idénticos, aunque solo se muestra la posición de los cinco triptófanos en único monómero.

El canal contiene cinco residuos de triptófano por subunidad localizados en ambos extremos de los segmentos helicoidales de la porción transmembrana de la proteína (Figura 1C). Dos de esos residuos (W26,113) están presentes en la región aromática más próxima a la interfase intracelular de la membrana y los otros tres (W67, 68, 87), en el lado opuesto del canal, concretamente en la región aromática más externa cercana al filtro de selectividad. Estos residuos de

triptófano son los responsables de emitir fluorescencia en el canal, siendo favorecida esta emisión por el microambiente hidrófobo que provoca el plegamiento de la proteína.

El grupo de investigación de MacKinnon además confirmó que el canal KcsA a pesar de ser un canal de dos segmentos transmembrana por subunidad, su secuencia de aminoácidos está muy cercana a la de seis segmentos transmembrana característica de los canales de K⁺ eucariotas. En concreto, en la zona del poro la secuencia T₇₅VGYG₇₉ que corresponde a la *signature sequence* (secuencia de la firma en castellano), es casi idéntica a la encontrada en las secuencias de *Drosophila* (canal tipo *Shaker* de seis segmentos transmembrana sensible a voltaje) y de algunos canales de K⁺ dependientes de voltaje de eucariotas.

En 2001 Eduardo Perozo y su equipo determinaron mediante otras técnicas espectroscópicas la estructura de los extremos N- y C- terminales citoplasmáticos⁸, que no pudieron resolverse previamente por cristalografía. En base a estos datos, junto con la estructura del cristal de KcsA, propusieron un modelo tridimensional de KcsA de longitud completa (Figura 1B). Más tarde, ya en el año 2009, este mismo grupo de investigadores confirmó lo hallado previamente gracias a que obtuvo por primera vez el cristal de la estructura completa de KcsA mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que se une al canal⁹.

La estructura del canal KcsA se compone por tanto de varias regiones que se distinguen entre ellas por sus características físicas y funcionales:

- **Extremo N- terminal.** Corresponde a los 26 primeros aminoácidos de la secuencia proteica. En los primeros experimentos este segmento no pudo ser resuelto vía difracción de rayos X debido a su alta movilidad dada la ubicación de esta región en la interfase membrana-agua⁷. Al cabo de un tiempo, gracias a los experimentos de E. Perozo y cols. se descubrió que el dominio N- terminal forma una hélice α anclada a la interfase

membrana-agua⁸ (Figura 1B). No obstante, existe cierto debate sobre la orientación y la interacción del dominio N- terminal con el resto del canal. Unos autores sugieren que el segmento N- terminal se orienta alejándose del poro, por lo que no existiría tal interacción⁸, mientras que otros en estudios más recientes se inclinan por una disposición alrededor del poro cuando se compara con canales muy similares a KcsA^{10,11} o incluso sugieren que existe una interacción con la región transmembrana de KcsA¹².

- **Extremo C- terminal.** Se trata de la región final de la cadena de aminoácidos y abarca los últimos 49 aminoácidos. Como ocurrió con el extremo N- terminal, en un primer momento la elevada movilidad del dominio C- terminal no permitió que su estructura pudiera resolverse mediante cristalización de rayos X⁷. No fue hasta el año 2009 cuando E. Perozo y su equipo demostraron que los segmentos C- terminales forman un manojo de hélice α de 70 Å de longitud prolongadas hacia el citoplasma⁹ y que estos mantienen su estabilidad gracias a enlaces de hidrógeno entre los aminoácidos de secuencias N- y C- terminales de subunidades adyacentes (Figura 1B). Se ha demostrado que el dominio citoplasmático C- terminal está altamente implicado en la estabilidad térmica y en el ensamblaje tetramérico de la proteína¹³.
- **Hélices transmembrana.** Cada subunidad del canal KcsA está formada por dos hélices transmembrana: la hélice externa (M1) y la hélice interna (M2). La hélice M1 interacciona con los lípidos de la membrana, mientras que la hélice M2 está orientada hacia el poro, siendo el entrecruzamiento entre estas hélices M2 el responsable de la conformación cerrada del canal KcsA⁹. Al parecer los movimientos que definen el proceso de apertura o *gating* del canal estarían relacionados con ciertos aminoácidos de esta región¹³.
- **Poro.** Es el espacio central por el que permea el K⁺, que se crea por el plegamiento de la proteína y que está delimitado por unos 35 aminoácidos.

Presenta una longitud total de 45 Å, y un diámetro que varía a lo largo de la extensión del poro. Desde el interior de la célula (parte intracelular) el poro comienza como un túnel de 18 Å de longitud, conocido como poro interno, y luego se abre en una amplia cavidad de 10 Å de diámetro situada cerca del centro de la membrana celular. Un catión K^+ puede moverse a través del poro interno y la cavidad permaneciendo hidratado debido a la composición química de los mismos, por lo que estos estarían involucrados en la estabilización de los cationes dentro del poro ^{7,14}.

- **Hélice del poro.** Es una pequeña hélice α próxima a la parte extracelular de la membrana. Las cuatro hélices internas del canal se unen entre sí por su parte más intracelular como un ramillete, dando la apariencia de un cono invertido (Figura 1A), y están dirigidas, con un sentido de amino a carboxilo, hacia dentro del canal. Esta disposición de las hélices del poro proporciona muchos de los contactos entre subunidades que mantienen unido al tetrámero y que también es crítico en el proceso de conducción iónica del poro ⁷.
- **Filtro de selectividad.** Como su nombre indica es la estructura responsable de discriminar qué iones pueden permear por el canal. Es una secuencia corta de aminoácidos de unos 12Å de longitud y de un diámetro de 3 Å que se encuentra en el extremo extracelular del poro y está formado por la secuencia de la firma (TVGYG), característica de todos los canales de K^+ . Los grupos carbonilos de los aminoácidos de la secuencia de la firma quedan dirigidos hacia el interior del poro creando una serie de anillos de oxígeno secuenciales que establecen numerosos sitios estrechamente separados para coordinar cationes K^+ deshidratados ⁷, concretamente cuatro sitios de unión a K^+ (Figura 2).

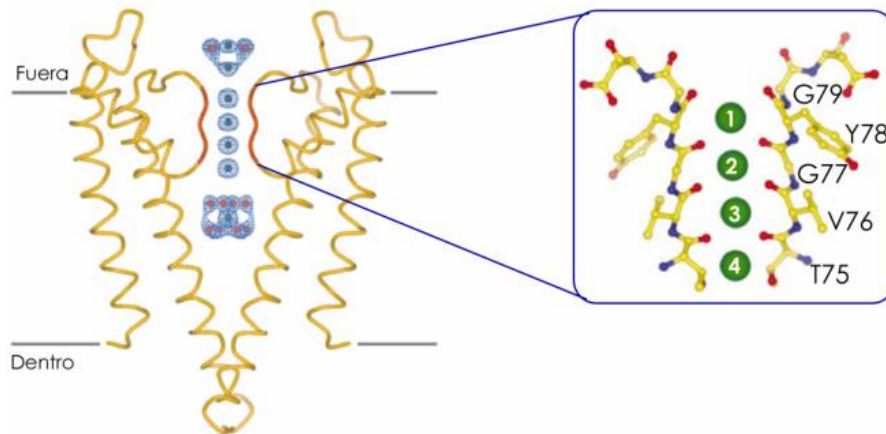


Figura 2. Esquema de cintas del canal con el detalle del filtro de selectividad. Las esferas en verde representan los cuatro sitios de unión a K^+ .

2.3.2. Características funcionales.

A finales del siglo XX, momento en que se resolvió la estructura del canal KcsA, la información funcional sobre dicho canal era escasa o nula. Más adelante, varios grupos investigadores emprendieron la tarea de caracterizar las propiedades funcionales del canal, tema que ha suscitado una gran polémica. Uno de los primeros fue el grupo de Schrempf, que descubrió una gran dependencia del proceso de apertura del canal con el pH del medio, múltiples estados de conductancia con probabilidades de aperturas próximas a 0,5 y permeabilidades altas a Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+} ^{15,16}. En oposición a estos resultados, en estudios posteriores se demostró que el canal KcsA se comporta como un canal voltaje-dependiente selectivo a K^+ frente a Na^+ con una probabilidad de apertura característicamente baja (más o menos de un valor de 0,1) ¹⁷ y con la peculiar propiedad de que su apertura solo responde a condiciones de pH ácido en el espacio intracelular de la membrana ¹⁸.

Posteriormente, se observó que el flujo de iones K^+ disminuía exponencialmente en cuestión de milisegundos después de que el canal esté abierto a pH ácido ¹⁹ pasando a un estado inactivado del canal por el que los iones K^+ no permean y del cual el canal se recupera lentamente ¹⁷, que explicaría esta baja probabilidad

de apertura. También estimaron que este proceso de inactivación comparte muchas particularidades con la inactivación tipo C encontrada en muchos canales voltaje-dependientes ¹⁹.

A un pH neutro en el medio intracelular, se vio que la mitad del extremo C-terminal del segundo segmento transmembrana (TM2) de cada una de las cuatro subunidades del canal se unen como un haz de hélices impidiendo el flujo de iones K^+ a través del canal ^{20,21} y que a pH ácido este manojito de hélices se desestabiliza para permitir el flujo de iones ²². Esto invitó a pensar que se trata de una barrera para la permeación de iones, actuando de este modo como una puerta del canal (conocida como puerta intracelular o de activación o primera puerta) dependiente del pH. Además, bajo condiciones de pH ácido lograron demostrar que la puerta intracelular estaba permanentemente abierta²⁰, por lo que la baja probabilidad de apertura a este pH sugiere la presencia de una segunda puerta (puerta extracelular o puerta de inactivación) que controla la cinética de apertura una vez la puerta intracelular está abierta.

Se constató que durante el proceso de inactivación el filtro de selectividad (compuerta extracelular) sufre cambios estructurales ²³ dependientes del voltaje aplicado o el tipo de ion ²⁴. Más recientemente se ha demostrado que la rotación de la hélice TM2 durante el proceso de apertura del canal favorece una red de puentes de hidrógeno entre los residuos Trp67, Glu71 y Asp80 que ocasiona la desestabilización del filtro de selectividad, y como consecuencia, el cambio a su conformación no conductora ²⁵. Aunque a posteriori se ha visto que las interacciones entre las cuatro subunidades del canal afectan a la conducción iónica y la inactivación del canal, lo que sugiere que el proceso de inactivación del canal es cooperativo ²⁶.

Registros de la corriente transcurrida por el canal evidencian que el canal KcsA presenta tres estados cinéticos distintos dependiendo del pH del medio intracelular y del tiempo transcurrido: estado cerrado (o *resting*), estado abierto

o estado inactivado (Figura 3). A pH 7 el canal permanecería en estado cerrado o *resting* por el que no circulan iones K^+ . En este estado la puerta intracelular estaría cerrada y el filtro de selectividad, en su conformación conductora o de reposo con cuatro sitios de unión (o dos sets de sitios de unión) a K^+ . No obstante, a pH 4 el canal se abre (estado abierto) permitiendo el tránsito de iones K^+ a través de él durante un corto periodo de tiempo, del orden de un segundo. El estado abierto del canal se correspondería con una puerta intracelular abierta y un filtro de selectividad en su conformación conductora de cuatro sitios de unión a K^+ . Transcurrido este instante de tiempo, el canal pasa de un estado abierto a un estado inactivado sin conducción de iones K^+ debido a un proceso de inactivación de tipo C que está envuelto en cambios estructurales en el filtro de selectividad. En este estado inactivado la puerta intracelular permanece abierta, pero la conformación estructural del filtro de selectividad todavía se desconoce, motivo por el cual en la actualidad sigue siendo objeto de estudio (Figura 3).

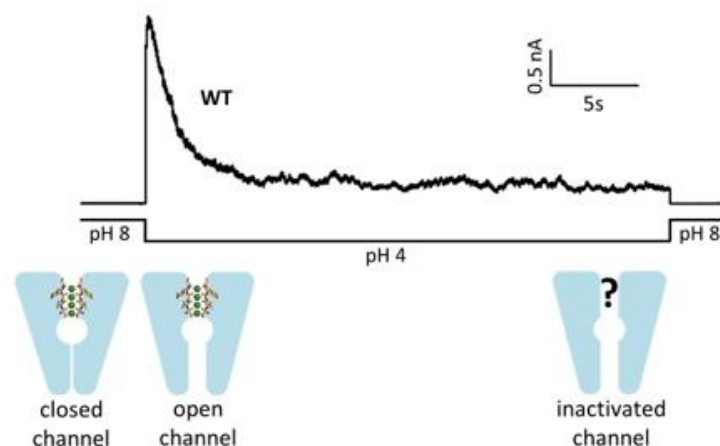


Figura 3. Registros de actividad y estados cinéticos del canal KcsA. Se muestra un registro de la actividad eléctrica a nivel macroscópico de KcsA silvestre obtenido por el paso de pH 8 a pH 4. A pH 8, el canal tendría la compuerta intracelular cerrada, y por tanto no se observa corriente. Al pasar a pH 4, se produce un rápido incremento de corriente por la apertura de dicha compuerta intracelular. Sin embargo, a continuación, se observa una disminución exponencial de la corriente debido a que el canal entra en el estado inactivado, cuya conformación a nivel del filtro de selectividad es desconocida.

Las estructuras cristalográficas de KcsA bajo diferentes condiciones iónicas obtenidas por el grupo de MacKinnon han mostrado que en el estado de reposo (pH 7) el filtro de selectividad podría adoptar dos conformaciones dependiendo del tipo de ión y su concentración ^{14,17,27} (Figura 4). El filtro de selectividad en presencia de una concentración de K⁺ superior a 5 mM adquiere una conformación conductora de cuatro sitios de unión (S1, S2, S3 y S4) con una ocupación de dos iones K⁺ distribuidos entre los cuatro sitios de unión (o dos sets de sitios de unión). Sin embargo, en presencia de una baja concentración de K⁺ (inferior a 5 mM) o en presencia de Na⁺ presenta una conformación no conductora o colapsada con la ocupación de un ion distribuido en dos sitios de unión, S1 y S4 (o un set de sitios de unión).

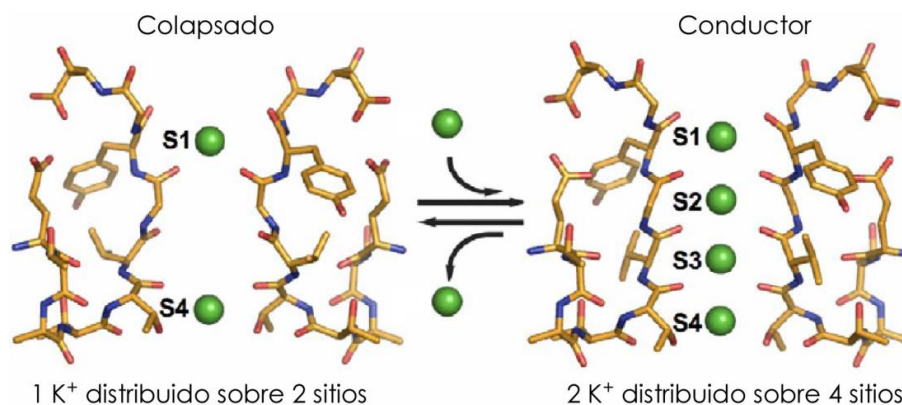
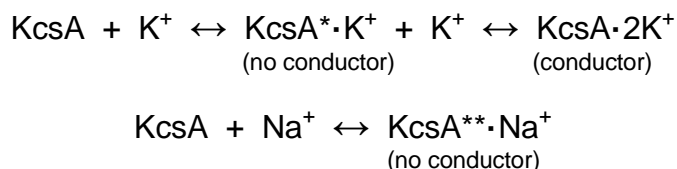


Figura 4. Equilibrio entre las dos conformaciones que puede adquirir el filtro de selectividad. Las esferas verdes indican los sitios de unión (S1 a S4) para el K⁺.

Estudios de unión de iones al filtro de selectividad de KcsA silvestre mediante técnicas espectroscópicas argumentan a favor de la existencia de dos sets de sitios de unión para el K⁺ (uno de alta afinidad y otro de baja afinidad) ^{28,29}. La unión de un K⁺ al set de sitios de unión de alta afinidad está relacionado con la formación del complejo no conductor KcsA^{*}·K⁺. Cuando la concentración de K⁺ aumenta, se lleva a cabo la unión de un ion K⁺ adicional, dando lugar a un segundo set de sitios de unión de más baja afinidad y a la forma conductora del complejo KcsA·2K⁺. Para el Na⁺, el equivalente al catión bloqueador, solo se detecta un set de sitios de unión de baja afinidad en KcsA silvestre, cuya

ocupación se atribuye al complejo no conductor $KcsA^{**}\cdot Na^+$, diferente del complejo $KcsA^*\cdot K^+$. De esta manera, las formas no conductoras del canal tendrían una alta afinidad (y por tanto una alta selectividad) para el K^+ , y una baja afinidad para el Na^+ (baja selectividad), en tanto que la forma conductora del canal disminuiría la afinidad por K^+ facilitando la conducción de este ion.



Hasta el momento, han sido muchos los modelos postulados para los cambios estructurales del filtro de selectividad durante la inactivación de tipo C. Dos son los modelos más destacados que describen el estado conformacional del filtro de selectividad durante el estado inactivado del canal: los modelos que proponen que el filtro de selectividad adquiere una conformación semejante a la que posee en su estado no conductor en presencia de iones Na^+ o baja concentración de iones K^+ (como el modelo propuesto por E. Perozo y cols. 2010³⁰), y los modelos que rechazan esta idea (como sería el modelo propuesto más recientemente por Valiyaveetil y cols. 2016³¹). El modelo de E. Perozo plantea la existencia de una reorientación gradual del eje del filtro debido a la inactivación de tipo C, que conduce primero a una pérdida del sitio de unión S2 y seguidamente la pérdida del sitio de unión S3, interrumpiendo probablemente la conducción iónica (Figura 5). El filtro de selectividad consigue, por tanto, durante el estado inactivado del canal (pH 4) y a una concentración alta de K^+ , una conformación semejante a la que posee en su estado no conductor en presencia de iones Na^+ o baja concentración de iones K^+ (pH 7), constituida por dos sitios de unión a iones K^+ (S1 y S4).

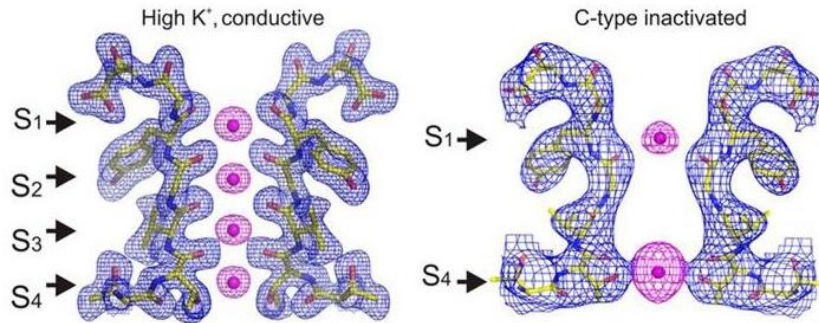


Figura 5. Mapa de densidad electrónica del filtro de selectividad en estado conductor y no conductor. La imagen de la izquierda muestra el filtro de selectividad en su conformación conductora, constituida por 4 sitios de unión a iones K^+ (S1 a S4). La imagen de la derecha muestra el filtro de selectividad en estado no conductor, formado por 2 sitios de unión a K^+ (S1 y S4) como consecuencia de la pérdida de los sitios de unión S2 y S3 debido al proceso de inactivación de tipo C.

Por otro lado, el modelo de Valiyaveetil et al. 2016 sostiene que los sitios de unión S1 y S2 se mantienen intactos durante la inactivación, a diferencia de los sitios de unión S3 y S4, que se ven distorsionados debido posiblemente a un cambio estructural que ocasiona la rotación de uno de los oxígenos de los carbonilos de la secuencia firma. Tal rotación provoca que los sitios de unión S3 y S4 no puedan coordinar un ion K^+ creando, por tanto, una barrera que impide el movimiento de iones a través del filtro. Estas observaciones estarían en total desacuerdo con la conformación no conductora del filtro selectividad en el estado inactivado, planteada en el modelo de E. Perozo, ya que, como defiende el equipo de Valiyaveetil, la pérdida del sitio de unión S2 impediría la inactivación del canal.

Ante tales controversias y alentados por el hallazgo de que el canal KcsA $\Delta 125$ solubilizado en detergente DDM a pH 8 se encuentra en estado inactivado con la puerta intracelular abierta, como ocurre con KcsA silvestre a pH 4 reconstituido en lípidos ³², decidimos trabajar con KcsA $\Delta 125$ (derivado estructural de KcsA silvestre carente del dominio C- terminal) con el fin de definir el estado conformacional del filtro de selectividad en condiciones de inactivación. De este modo podremos estudiar los cambios producidos en el filtro de selectividad durante el estado inactivado del canal sin el inconveniente de trabajar con un medio a pH 4, que puede dar lugar a efectos inespecíficos

debidos a la protonación de algunos aminoácidos y, por consiguiente, a resultados no concluyentes.

3. OBJETIVOS

Se expone el objetivo general que expresa la inspiración o el propósito que se quiere alcanzar con el presente proyecto:

- Caracterizar la estructura del filtro de selectividad del canal KcsA Δ 125 a pH 7 en el estado inactivado a través de su interacción con cationes conductores y no conductores para extrapolar tales resultados al canal KcsA silvestre.

A continuación, se enumeran los objetivos específicos que concretan de una forma medible el objetivo general del trabajo:

- Expresar y purificar el canal KcsA silvestre para su posterior tratamiento proteolítico y obtención del canal KcsA Δ 125.
- Determinar la influencia de los iones en la estructura de KcsA Δ 125 a través de la medida de los espectros de emisión de fluorescencia.
- Analizar la unión de los iones al filtro de selectividad de KcsA Δ 125 mediante el seguimiento de la desnaturalización térmica del canal monitorizada por fluorescencia.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Transformación, expresión y purificación de la proteína KcsA silvestre

El primer paso en el proceso de purificación de la proteína KcsA silvestre fue la transformación, método a través del cual nos permite inducir la introducción de información genética (un plásmido) en células competentes. En nuestro caso, se

realizó la transformación de células competentes *Escherichia Coli* M15 (portadoras del plásmido pRep4) con el plásmido de construcción KcsA-pQE30. Tanto la cepa bacteriana como el vector de expresión elegidos, presentan resistencia a antibióticos (kanamicina y ampicilina, respectivamente), lo que servirá de especial utilidad para el proceso de selección. Para llevar a cabo el proceso de transformación se incubaron las células competentes en un medio LB con el plásmido KcsA-pQE30 y a través de un choque térmico se indujo la introducción del mismo en la bacteria.

A continuación, se sembraron dichas células en una placa LB-agar suplementada con ampicilina (100 µg/ml de concentración final) y kanamicina (25 µg/ml de concentración final). Para la formación del preinóculo, de las colonias transformadas que lograron crecer con éxito ante la presencia de los antibióticos, solamente una fue seleccionada para inocularse en medio líquido LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml concentración final), kanamicina (25 µg/ml concentración final) y glucosa (0,04% p/v) durante toda la noche en agitación a 200 rpm y 37 °C. Después se preparó el inóculo en medio líquido 2xYT estéril para lo que fue necesario añadir el preinóculo, los antibióticos (ampicilina y kanamicina) y la glucosa, dejándose la mezcla crecer en agitación a 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8 (aproximadamente 2 horas de incubación). Cuando se alcanzó tal densidad óptica, significativo de que el crecimiento bacteriano está en el estado estacionario, se indujo la expresión de KcsA con isopropil-β-D-1-tiogalactósido, IPTG, (0,5 mM de concentración final) añadido al medio de cultivo y se dejó incubar en agitación constante a 200 rpm durante dos horas. Una vez acabada la expresión de la proteína, se centrifugaron los cultivos en una centrifuga refrigerada a 4 °C y 6500 x g durante 15 minutos para sedimentar las bacterias, y se congelaron a -20 °C antes de proseguir con la purificación.

Posteriormente, se resuspendió el sedimento obtenido con un tampón a pH 8 de HEPES 20 mM y sacarosa 0,45 M que contiene lisozima de huevo (0,4 mg/ml) y un cocktail de inhibidores de proteasas. Luego, a la muestra se le aplicó

ultrasonido en series de 45 segundos a potencia creciente mediante un sonicador para facilitar la ruptura de las membranas de las bacterias y se centrifugó durante 45 minutos a 100.000 x g para separar de la mezcla y recoger en el sedimento la fracción correspondiente a las membranas celulares.

El sedimento obtenido del líquido sonicado se solubilizó con un tampón de solubilización a pH 7,5 compuesto por HEPES 20 mM, KCl 200 mM, n-Dodecil- β -D-maltósido (DDM) 10 mM e imidazol 50 mM, y se terminó de resuspender mediante politrón para acabar de lisar las membranas celulares. Tras solubilizarse en leve agitación durante al menos dos horas a temperatura ambiente se centrifugó el líquido solubilizado en ultracentrífuga a 100.000 x g y 4 °C durante 45 minutos para eliminar la fracción de membrana no solubilizada

Terminada la centrifugación, se procedió a la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad con resina de Ni²⁺-seferosa. Para ello, el sobrenadante obtenido de la última centrifugación se incubó en un volumen adecuado de resina de Ni²⁺-seferosa (matriz o fase estacionaria) durante toda una noche a 4 °C en agitación suave, a fin de que las colas de histidina (aportadas por el vector de expresión pQE30) de la proteína se unan a los grupos quelantes de Ni²⁺ disponibles en la matriz. Más tarde, se trasvasó la mezcla de la resina y la fracción solubilizada a una columna cromatográfica de afinidad, y se lavó con un tampón a pH 7,5 compuesto por HEPES 20 mM, DDM 5 mM, KCl 200 mM e imidazol 50 mM para eliminar de la resina todo aquello que no esté adherido firmemente a ella. Finalizado el lavado de la resina y anterior a la elución de la mezcla, se procedió a realizar una medida puntual de la absorbancia a 280 nm, para comprobar que el lavado de la resina resultó suficiente. Generalmente se considera que la resina ha sido lavada cuando la absorbancia es menor a 0,01 (tomando como blanco el tampón de lavado).

Para el proceso de elución se utilizó un tampón a pH 7,5 de composición HEPES 20 mM, DDM 5 mM, KCl 100 mM e imidazol 500 mM. En este punto el imidazol compite con las proteínas etiquetadas con polihistidinas, lo que

provoca que la proteína se desplace de la matriz y, como consecuencia, se pueda recoger la proteína eluida en diferentes alícuotas de 1,5 mL. Dichas alícuotas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 13,5% en presencia de SDS al 1% (SDS-PAGE), de forma que permitió agrupar el eluido en dos fracciones: la fracción concentrada y la fracción diluida. Ambas fracciones obtenidas fueron dializadas frente a un tampón a pH 7 de HEPES 20 mM, NaCl 100 mM y DDM 5 mM con el objetivo eliminar de la proteína el imidazol que se haya podido llevar consigo y que puede interferir en la medida de la concentración.

Por último, tras un proceso de centrifugación a 21.000 x g durante 15 minutos a 4 °C se determinó la concentración de la proteína purificada (KcsA silvestre) mediante espectrofotometría a partir de la medida de absorbancia a 280 nm, usando como blanco una muestra del último tampón de diálisis. Para el cálculo de la concentración de la proteína se recurrió a la aplicación de la ecuación de Lambert-Beer (Ecuación 1),

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot l \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde A es el valor de la absorbancia medida, C es la concentración molar de la proteína, ε es el coeficiente de extinción molar de la proteína ($34950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), y l es el paso óptico de la cubeta en centímetros.

Se obtuvo para la fracción concentrada una concentración de proteína de 1,18 mg/mL (equivalente a 66,6 μM), y para la fracción diluida una concentración de 0,25 mg/mL (equivalente a 14,3 μM).

4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Las fracciones obtenidas de la purificación, en las que se encuentra la proteína, se verificaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 13,5% en presencia de SDS al 1% con el propósito de detectar la presencia y comprobar

el estado de la proteína, siendo la conformación de tetrámero la de interés. Posterior a la electroforesis, el gel fue teñido con azul brillante Coomassie para poder observar con claridad las bandas correspondientes a las proteínas.

4.3. Corte de KcsA silvestre con quimotripsina

A través del tratamiento proteolítico de KcsA tetramérica purificada con la enzima quimotripsina, que elimina los 35 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína, se obtuvo la proteína KcsA Δ 125. Para ello se incubaron 3 mL de la fracción concentrada de KcsA (equivalentes a 3,5 mg de proteína) en 45 mg de enzima quimotripsina (relación aproximada peso:peso de 13:1), previamente hidratada con agua y sometida a varios lavados con un tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM y NaCl 100 mM a pH 7, durante una hora y media a 37°C. Se comprobó en un gel de poliacrilamida que el proceso de digestión con quimotripsina resultó satisfactorio puesto que en las bandas era evidente la diferencia de pesos moleculares entre KcsA entero y cortado, consecuencia de la pérdida de alrededor de 15 kDa. Para acabar, durante todo un día se dejó dializar contra el mismo tampón utilizado para eliminar los restos de cadenas de aminoácidos originados en el corte.

4.4. Medición de los espectros de emisión de fluorescencia

Las medidas de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de KcsA Δ 125 se registraron en un espectrofluorímetro SLM 8000 usando cubetas de cuarzo de 0,5 cm de paso óptico. Las muestras se excitaron a 280 nm, y la emisión se recogió entre 300 y 400 nm en incrementos de 1 nm, obteniéndose espectros representados por la intensidad de fluorescencia emitida frente al rango de longitudes de onda en nm.

Los datos obtenidos de la espectroscopia de fluorescencia fueron normalizados para acotar entre 0 y 1 los valores de intensidad de fluorescencia a través de la ecuación 2,

$$\frac{I_i - \min(I_i)}{\max(I_i) - \min(I_i)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde I_i es el valor de la intensidad de fluorescencia emitida medida a una longitud de onda, $\min(I_i)$ es el valor mínimo de intensidad de fluorescencia emitida en un rango de longitudes de onda de 300 a 400 nm, y $\max(I_i)$ es el valor máximo de intensidad de fluorescencia emitida en ese mismo rango de longitudes de onda.

Finalmente, los datos de la espectroscopia fueron expresados en términos de centro de masas o longitud de onda promedio ponderada por la intensidad, $\langle \lambda \rangle$, puesto que es un parámetro muy útil por su sensibilidad a cualquier cambio en la forma o posición del espectro. Asimismo, el $\langle \lambda \rangle$ fue definido por medio de la Ecuación 3,

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_i \lambda_i I_i}{\sum_i I_i} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde I_i es el valor de intensidad de fluorescencia emitida medida a una longitud de onda, y λ_i es la longitud de onda empleada en nm.

4.5. Monitorización por fluorescencia de la desnaturalización térmica

La desnaturalización térmica de KcsA $\Delta 125$ fue llevada a cabo en un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse a una velocidad constante de 0,6 °C/min, excitándose a una longitud de onda de 280 nm y registrándose la intensidad de fluorescencia emitida a 340 nm. Los experimentos se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico con diferentes muestras que presentaban una concentración fija de proteína de 1 μ M solubilizada en un tampón HEPES 20 mM y DDM 5 mM a pH 7 junto con concentraciones

crecientes de iones K^+ (hasta un máximo de 40 mM) o iones Na^+ (hasta 60 mM) estudiados por separado. Las muestras con KcsA $\Delta 125$ fueron preparadas con la mínima concentración de Na^+ que fue posible (concretamente 2 mM) para garantizar la más baja ocupación de los sitios de unión.

Los datos extraídos de la monitorización de la desnaturalización térmica mediante fluorescencia se representaron en una gráfica de intensidad de fluorescencia emitida en 340 nm frente a la temperatura en $^{\circ}C$, dando lugar a la llamada curva de desnaturalización térmica. La curva de desnaturalización térmica sigue una función sigmoidea, a cuyo punto de inflexión se le conoce como temperatura media de desnaturalización, T_m . Mediante el programa informático Kaleida Graph (Synergy Software) se estimó la T_m para cada una de las muestras gracias a que se efectuó un ajuste no lineal de dicha curva con la Ecuación 4,

$$F_{340} = \frac{\alpha_N + \beta_N (T - 298) + (\alpha_D + \beta_D (T - 298)) \times e^{\frac{-\Delta H_{D-N}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right)}}{1 + e^{\frac{-\Delta H_{D-N}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right)}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde F_{340} es la medida de fluorescencia de emisión en 340 nm observada a una temperatura dada, α_N y α_D son la fluorescencia intrínseca del estado nativo y desnaturalizado de la proteína, respectivamente, a 298 grados Kelvin, β_N y β_D son las pendientes del estado nativo y desnaturalizado de la proteína, respectivamente, T es la temperatura en grados Kelvin, T_m es la temperatura media de desnaturalización en grados Kelvin, ΔH_{D-N} es el cambio de entalpía de desnaturalización, que está relacionado con la pendiente de la curva de desnaturalización, y R es la constante de los gases ideales, con un valor de $1,987207 \left[\frac{\text{cal}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \right]$.

Una vez estimadas las T_m para cada una de las muestras, se representó gráficamente el cociente de la diferencia entre T_m y $(T_m)_0$ multiplicado por 100, $\Delta T_m / T_m \times 10^2$, frente a la concentración del ligando o catión en concentración

molar $[L]$, de forma que se obtuvo la curva de unión del ion a la proteína. Mediante el programa Origin 7, a fin de obtener los valores de la constante de disociación, K_D , se realizó un ajuste matemático no lineal a dicha curva con la Ecuación 5,

$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{T_m - (T_m)_0}{T_m} = \frac{R (T_m)_0}{\Delta H_0} \ln \left(1 + \frac{[L]}{K_D} \right) \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde ΔT_m es la diferencia entre T_m y $(T_m)_0$ en grados Kelvin para la proteína en presencia y en ausencia de ligando o catión, respectivamente, R es la constante de los gases, ΔH_0 es el cambio de entalpía en la desnaturalización de proteínas en ausencia de ligando, $[L]$ es la concentración del ligando o catión en molar, y K_D es la constante de disociación del complejo proteína-ligando en molar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Purificación del canal KcsA silvestre

El primer paso en este trabajo fue expresar y purificar el canal de potasio KcsA silvestre. Tras la correspondiente cromatografía de afinidad, y con el propósito de verificar las alícuotas que contienen proteína y conocer la pureza de cada una de ellas, se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE al 13,5%. En la Figura 6 se pone de manifiesto la existencia de una banda mayoritaria de aproximadamente 68 kDa que corresponde al tetrámero y otra minoritaria de aproximadamente 17 kDa que corresponde al monómero. Gracias a estos resultados se pudieron agrupar las muestras en dos fracciones: la fracción concentrada (formada por las alícuotas 2 y 3) y la fracción diluida (alícuotas 1, 4 y 5).

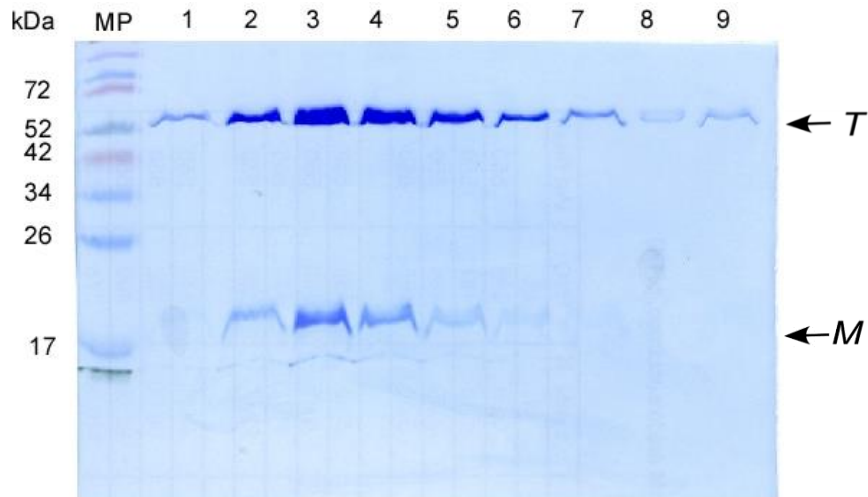


Figura 6. Caracterización de KcsA silvestre en gel SDS-PAGE al 13,5%. La primera calle corresponde al marcador de peso molecular (MP). El resto de calles equivalen a cada una de las alícuotas de KcsA silvestre obtenidas en la cromatografía de afinidad. Las bandas de peso molecular 68 kDa corresponden al tetrámero (T), mientras que las de peso molecular 17 kDa, al monómero (M).

5.2. Estudio de integridad de KcsA Δ 125

Una vez comprobado el estado del tetrámero de KcsA silvestre (Figura 6), a partir de la fracción concentrada, se realizó su digestión proteolítica (como se explica en el apartado de Materiales y Métodos) para obtener la proteína cortada KcsA Δ 125, a la que también se contrastó su estado mediante un gel SDS-PAGE al 13,5% (Figura 7).

Como se puede observar en la Figura 7, se confirma la presencia de las especies tetraméricas de las proteínas KcsA silvestre y KcsA Δ 125 situadas en dos bandas a diferentes alturas. Esta figura evidencia con claridad que el corte proteolítico se ha efectuado correctamente y que la proteína KcsA Δ 125 presenta suficiente estabilidad en forma de tetrámero. La diferencia de pesos moleculares existente entre la proteína KcsA silvestre de estructura completa y la proteína KcsA Δ 125, carente de un fragmento proteico, coincide con la pérdida de peso esperada entre KcsA silvestre (160 aminoácidos) y KcsA Δ 125 (125 aa.), de aproximadamente 15 kDa.



Figura 7. Caracterización en gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 13,5% del corte de KcsA silvestre con quimotripsina. La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular (MP). En la calle 2 se representa el estado tetramérico de KcsA silvestre (WT) sobre los 68 kDa, y su monómero sobre los 17 kDa. En la calle 3 se muestra el tetrámero de Kcsa cortada ($\Delta 125$) en una posición sobre los 52 kDa.

5.3. Estudio de la estructura terciaria a través de la medición de los espectros de emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia aportan información sobre la estructura terciaria de las proteínas y su plegamiento. Esto es posible debido a que existen compuestos en las proteínas, llamados fluoróforos, que emiten fluorescencia cuando son excitados a una determinada longitud de onda. Como se comentaba anteriormente en el Apartado 2.3.1, en el caso de KcsA, los residuos de triptófano son los que otorgan las propiedades fluorescentes al canal. En el caso que nos ocupa, nos interesan los posibles cambios en la estructura terciaria del canal KcsA $\Delta 125$ a pH 7 en presencia de cationes monovalentes con diferente permeabilidad al canal (como es el caso del K^+ y del Na^+). Asimismo, para poder comparar nuestros datos con los previos de KcsA silvestre, en las Figuras 8A y 8B se aportan los espectros de emisión de fluorescencia normalizados del canal KcsA silvestre a pH 7 (estado cerrado o *resting*) y a pH 4 (estado inactivado), obtenidos del artículo científico de M. L.

Renart y cols., 2006²⁸, y de trabajos previos del laboratorio todavía sin publicar, respectivamente.

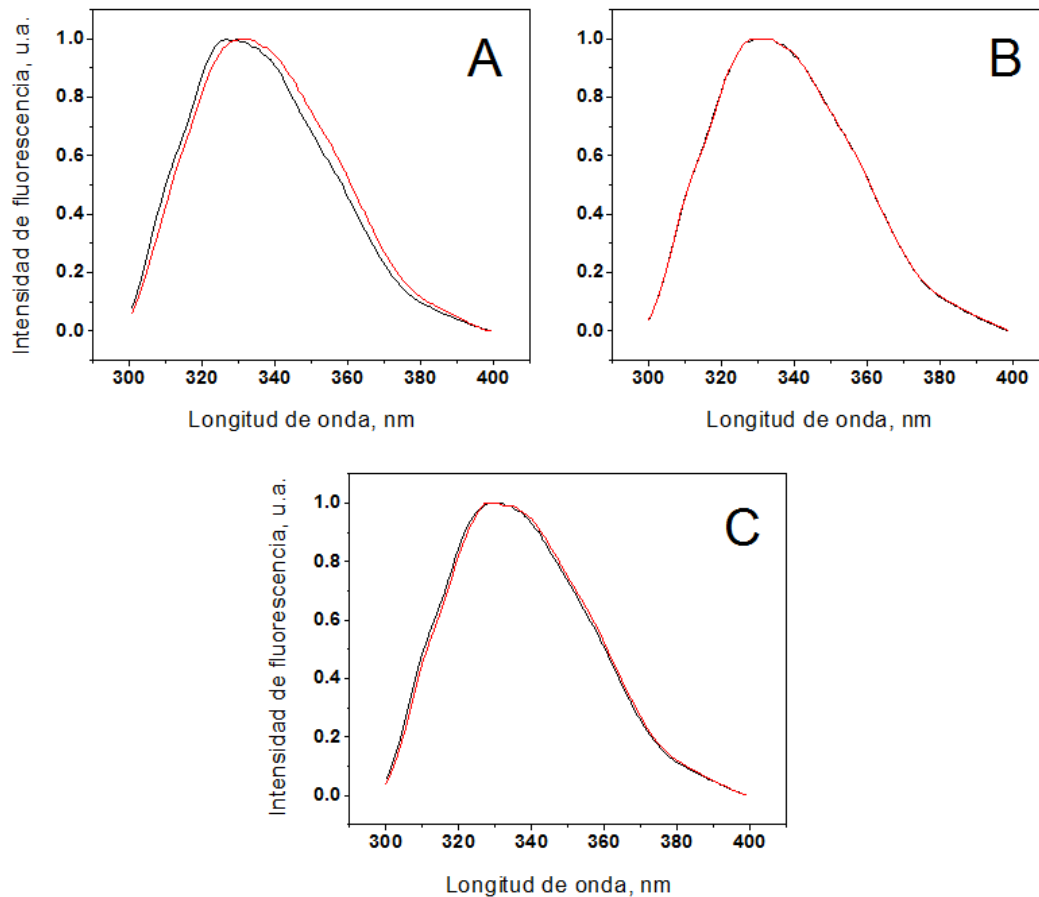


Figura 8. Espectros de emisión de fluorescencia normalizados para KcsA silvestre a pH 7 (panel A) y a pH 4 (panel B), y para KcsA Δ 125 a pH 7 (panel C). Los paneles A y C representan las muestras solubilizadas en detergente DDM 5 mM, HEPES20 mM y KCl 100 mM ó NaCl 100 mM; mientras que el panel B, las muestras solubilizadas en detergente DDM 5 mM, ácido succínico 20 mM y KCl 100 mM ó NaCl 100 mM. La línea negra pertenece a las muestras con KCl 100 mM, y la línea roja, a las muestras con NaCl 100 mM.

En la Figura 8A se puede observar como los espectros de emisión de fluorescencia correspondientes a KcsA silvestre a pH 7 (estado cerrado o *resting*) se ven alterados según el tipo de catión. En presencia del ion conductor K^+ , el espectro de emisión de fluorescencia sufre un desplazamiento hacia el azul con respecto al espectro de emisión del ion no conductor Na^+ , cuyo desplazamiento ocurre hacia el rojo. Este cambio se puede cuantificar a partir

del cálculo de los centros de masas de los espectros (ver sección 4.4 de Materiales y Métodos), $\langle \lambda \rangle$, que en este caso es de 1,67 nm (Tabla 1). Tal desemejanza en los espectros da a entender que existe un cierto cambio en la estructura terciaria de la proteína que afecta, sobre todo, al filtro de selectividad y a la disposición de los residuos de triptófanos de KcsA silvestre en función de cuales sean los cationes monovalentes presentes en disolución a pH 7, de forma que con el ion Na^+ los triptófanos están expuestos a un ambiente más polar. La adquisición de dos conformaciones por parte del filtro de selectividad según el tipo de ion presente a pH 7 suscribe la existencia de dos estados conformacionales para el filtro de selectividad: el estado conductor con dos sets de sitios de unión al ion K^+ (uno de alta afinidad y otro de baja afinidad), y el estado no conductor o colapsado con un solo set de sitios de unión al Na^+ ^{28,29}.

Sin embargo, cuando KcsA silvestre se encuentra en un medio de carácter más ácido, en torno a pH 4 (estado inactivado), los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca se solapan con independencia de los cationes K^+ o Na^+ presentes en el medio (Figura 8B), obteniéndose concretamente una diferencia de centro de masas, $\langle \lambda \rangle$, de un valor de 0,03 nm (Tabla 1). Dicha similitud en los espectros de emisión de fluorescencia sugiere que los iones K^+ y Na^+ influyen de igual manera sobre la estructura terciaria de KcsA silvestre en solución a pH 4, puesto que los triptófanos estarían expuesto al solvente en equivalente magnitud. Estos resultados plantean la presencia de una única conformación tanto para el ion K^+ como para Na^+ en el estado inactivado del canal, como proponen los modelos que dicen que en estas condiciones el filtro de selectividad adquiere una conformación no conductora (un único set de sitios de unión), similar a la conformación observada en estructuras de canales KcsA determinadas en presencia de Na^+ o bajas concentraciones de K^+ ²⁸. Aunque también es posible que con esta técnica empleada no seamos capaces de detectar cambios en el filtro de selectividad para esas condiciones dadas. Cabe añadir que los resultados pueden no ser concluyentes debido a posibles errores inespecíficos causados por la protonación del medio, debido al pH usado.

En cuanto a los datos experimentales extraídos del presente trabajo a cerca de los espectros de KcsA Δ 125 a pH 7 (Figura 8C), dichos espectros presentan una ligera diferencia entre sus centros de masa, $\langle \lambda \rangle$, del orden de 0,62 nm (Tabla 1). De manera parecida a como ocurría con KcsA silvestre a pH 7, a través de la Figura 8C se puede contemplar que el espectro para el catión K^+ padece un corrimiento hacia el azul, a diferencia de la presencia del catión Na^+ , cuyo corrimiento tiene lugar hacia el rojo. Así pues, aparentemente los resultados obtenidos de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca correspondientes a KcsA Δ 125 en pH 7 se posicionan a medio camino entre los obtenidos para KcsA silvestre a pH 4 y a pH 7, si bien más próximos al primero.

Condición de la muestra	$\langle \lambda \rangle$, nm	Diferencia de $\langle \lambda \rangle$, nm
KcsA silvestre en K^+ a pH 7	336,16	1,67
KcsA silvestre en Na^+ a pH 7	337,83	
KcsA silvestre en K^+ a pH 4	340,43	0,03
KcsA silvestre en Na^+ a pH 4	340,46	
KcsA Δ 125 en K^+ a pH 7	339,53	0,62
KcsA Δ 125 en Na^+ a pH 7	340,15	

Tabla 1. Resumen de los valores de centro de masas, $\langle \lambda \rangle$, obtenidos de los espectros de la Figura 8 mediante el uso de la Ecuación 3.

5.4. Monitorización de la unión iónica a KcsA mediante un ensayo de la desnaturalización térmica

La desnaturalización térmica de proteínas es un proceso que consiste en la pérdida de la estructura de la proteína por medio de la aplicación de calor, de forma que proteínas poliméricas, como es el caso del tetrámero KcsA, quedan reducidas a monómeros de manera irreversible. Por lo tanto, monitorizar la desnaturalización térmica mediante fluorescencia permite estudiar la estabilidad

conformacional del canal KcsA cuando es sometido a temperaturas crecientes y, por tanto, indirectamente su estructura. A diferencia de los espectros de fluorescencia, que nos dan una visión general de la estructura terciaria de la proteína, a partir de las curvas de desnaturalización térmica de KcsA, es posible estudiar la unión de iones al filtro de selectividad de KcsA²⁹, para así poder caracterizar la estructura de dicho filtro.

La Figura 9 ilustra algunos ejemplos del proceso de desnaturalización térmica bajo diferentes concentraciones de K⁺ o Na⁺ presentes en la solución que contiene a KcsA Δ 125. Analizando los datos se puede comprobar como a bajas temperaturas la intensidad de fluorescencia decae de forma lineal hasta alcanzar un rango de temperaturas intermedias en las que la pendiente negativa es más pronunciada, y finalmente, a altas temperaturas se vuelve a tomar una tendencia negativa y lineal pero diferente a la observada a bajas temperaturas. Esto último es debido a que con el aumento de la temperatura se produce la desnaturalización de la proteína y, por ende, la disociación de la proteína tetramérica en sus monómeros, acción que repercute directamente en la intensidad de fluorescencia emitida por los triptófanos, que al encontrarse en un microambiente mucho menos hidrófobo emiten menos fluorescencia.

La Figura 9 también muestra que el valor de la temperatura media de desnaturalización, T_m , es dependiente del tipo y concentración de los cationes presentes en el tampón. En el caso del K⁺, cuando se encuentra en concentraciones suficientemente altas, superiores a los 40 mM, el incremento de la T_m es tal que llega incluso a alcanzar valores próximos al punto de ebullición del agua. Al disminuir la concentración de K⁺ a 2 mM la T_m disminuye alrededor de 30-35 °C. Para el Na⁺, los incrementos de la T_m no se acentúan tanto con el aumento de la concentración del catión, de tal forma que el paso de una concentración de 2 mM a 60 mM solo implica un aumento de T_m de aproximadamente 15 °C. Esto se explica por el efecto positivo de la unión de los cationes sobre la estabilidad de la proteína KcsA Δ 125 en condiciones de no competitividad, resultando ser mayor la estabilidad aportada por el K⁺ en

comparación con el Na^+ . La diferente estabilidad térmica aportada por cada catión nos hace pensar sobre la posible existencia de una conformación del filtro de selectividad diferente para el K^+ en comparación con el Na^+ , como sugieren los espectros de emisión de KcsA silvestre a pH 7²⁸.

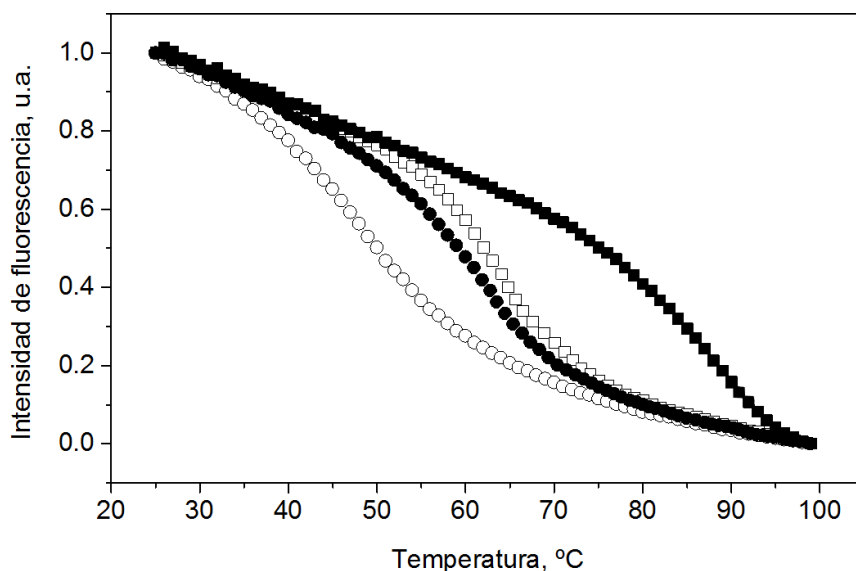


Figura 9. Monitorización por fluorescencia de la desnaturalización térmica de KcsA Δ 125 a diferentes concentraciones de KCl o NaCl. Se muestran los datos normalizados de los cambios en la emisión de fluorescencia intrínseca de KcsA Δ 125 a 340 nm por excitación a 280 nm, en función del aumento de la temperatura. Las muestras de KcsA Δ 125 1 μM fueron diluidas en tampón HEPES 20 mM y DDM 5 mM a pH 7 junto con diferentes concentraciones de KCl o NaCl: KCl 40 mM (■), 2 mM KCl (●), NaCl 60 mM (□) ó NaCl 2 mM (○).

Debido a los grandes rangos de variación en la T_m de la proteína KcsA Δ 125 (véase en la Figura 9) se decidió realizar más experimentos con un mayor número de concentraciones para estudiar más detalladamente la unión de los iones al canal, como se representa en la Figura 10. En la misma, se puede observar como ambos cationes monovalentes estabilizan la proteína KcsA Δ 125 retrasando su desnaturalización a medida que aumenta la concentración del catión. Cabe destacar que el incremento de las T_m con la concentración de K^+ sucede en dos fases, a diferencia del Na^+ , cuyo efecto sobre el aumento de T_m parece llevarse a cabo en una única fase.

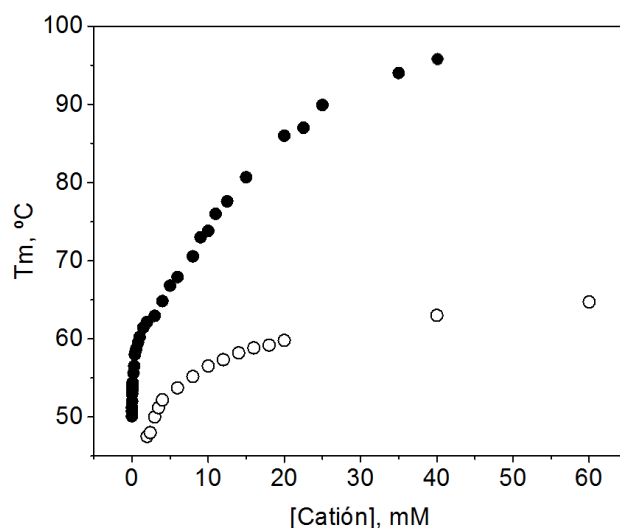


Figura 10. Representación de la estabilidad térmica de KcsA Δ125 dependiendo de la concentración de catión en el medio. Los círculos con relleno (●) corresponden a las muestras con K⁺, y los círculos sin relleno (○), a las muestras con Na⁺.

Al hilo de esta última idea, en la Figura 11A se refuerza el supuesto acerca de que la estabilización del Na⁺ sobre la desnaturalización térmica de KcsA Δ125 ocurre a causa de que este catión interactúa con el canal ocupando un único set de sitios de unión de baja afinidad de acuerdo a una constante de disociación, K_D , de $(3,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ M, obtenida tras ajustar los datos experimentales a la ecuación 5 (Tabla 2). En contraste con lo sucedido para el Na⁺, cuando se analizan los datos experimentales del K⁺, el ajuste matemático a la Ecuación 5 resultó no ser válido a simple vista (Figura 11B y su recuadro). No obstante, cuando el análisis de los datos experimentales se realiza de forma separada, distinguiendo entre rango de baja concentración y rango de alta concentración de K⁺, se obtienen dos ajustes válidos (Figura 11C y 11D). Esta observación concuerda con la hipótesis de que el efecto del K⁺ sobre la estabilización de la proteína sigue un comportamiento bifásico dependiente de la concentración del catión, que invita a considerar la existencia de dos sets de sitios de unión en el canal para el K⁺, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad^{28,29}. La ocupación del primer set de sitios de unión de alta afinidad por parte del K⁺ a bajas concentraciones (de 0 a 2 mM) manifiesta un incremento en la T_m de aproximadamente 12 °C, seguido de un incremento adicional de la T_m de 33 °C cuando la concentración de K⁺ aumenta de 2 a 40 mM (Tabla 2). La Figura 11C ilustra el ajuste matemático a la Ecuación 5 de la estabilización del

K^+ a baja concentración (entre 0 y 2 mM) en contra de la desnaturalización térmica de la proteína producida en el primer evento de unión al canal, donde el K^+ ocupa un primer set de sitios de unión de alta afinidad con una K_D de $(22,9 \pm 2,4) \times 10^{-6}$ M. La Figura 11D muestra el ajuste de la estabilización de la proteína en un rango de concentraciones de K^+ de 2 a 40 mM. Un segundo evento de unión es acontecido cuando el K^+ es presente en tales concentraciones conforme a una K_D de $(8,3 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ M para este segundo set de sitios de unión de baja afinidad.

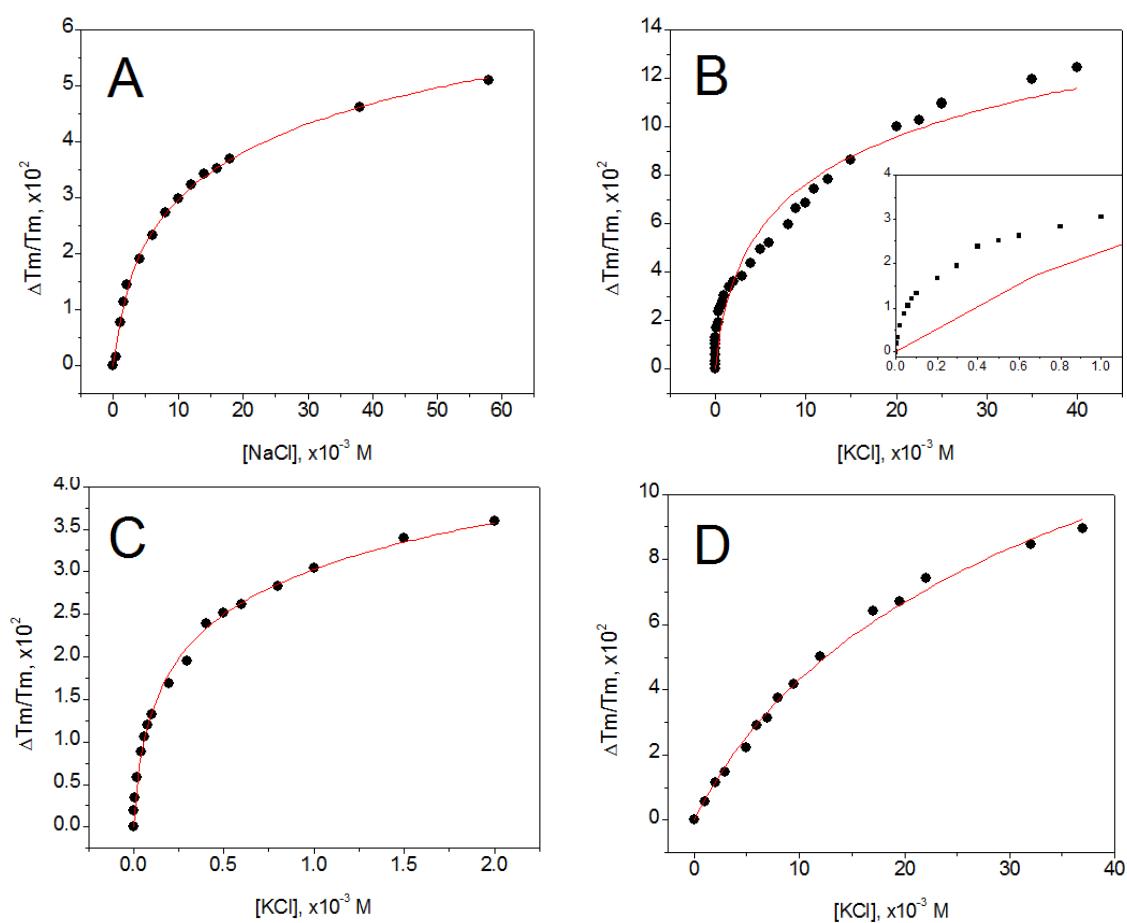


Figura 11. Ajuste matemático de los datos experimentales de la Figura 10 a la Ecuación 5. La línea continua representa el mejor ajuste matemático no lineal de los puntos experimentales a la ecuación 5. El panel A muestra el ajuste de la unión de Na^+ a un único sitio de unión en el canal, a partir del cual se obtuvo una K_D de $3,2 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ M. En el caso del K^+ , el ajuste no se ciñe a los datos experimentales (panel B y su recuadro). Sin embargo, esto no ocurre cuando se analizan por separado los rangos de baja concentración de K^+ (panel C) y alta concentración de K^+ (panel D), lo que sugiere que al menos haya dos sitios de unión presentes en la proteína para el K^+ . Se obtuvo, por tanto, una constante de disociación para concentraciones bajas, por debajo de 2 mM, de K^+ ($K_D = 22,9 \pm 2,4 \times 10^{-6}$ M), y otra constante para concentraciones elevadas, por encima de 2 mM, de K^+ ($K_D = 8,3 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ M).

A modo de resumen, se muestran en la Tabla 2 los valores de la constante de disociación, K_D , y la diferencia de temperatura media de desnaturalización, ΔT_m , para cada uno de los eventos de unión a K^+ y a Na^+ detectados en KcsA $\Delta 125$ a pH 7.

Condición de la muestra	Sitios de unión	K_D , M	ΔT_m , °C
KcsA $\Delta 125$ en baja $[K^+]$ a pH 7	2 (1 ^{er} evento)	$(22,9 \pm 2,4) \times 10^{-6}$	12
KcsA $\Delta 125$ en alta $[K^+]$ a pH 7	2 (2 ^o evento)	$(8,3 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	33
KcsA $\Delta 125$ en Na^+ a pH 7	2 (evento único)	$(3,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	17

Tabla 2. Resumen de los valores obtenidos para KcsA $\Delta 125$ a pH 7 bajo diferentes concentraciones de iones. Los valores han sido calculados a partir de los datos experimentales de las Figura 10 y 11.

Para poder comparar los datos de la Tabla 2 correspondientes a KcsA $\Delta 125$ a pH 7 con los de anteriores estudios de KcsA silvestre, en la Tabla 3 se ofrecen los resultados del artículo científico de M.L. Renart y cols., 2010²⁹, y de un experimento previo del laboratorio no publicado correspondientes a KcsA silvestre a pH 7 y a pH 4, respectivamente. Como se puede observar en la Tabla 3, tanto el experimento con KcsA a pH 7 como el experimento a pH 4 coinciden en que hay dos sets de sitios de unión ocupados para el ion K^+ (uno de alta afinidad y otro de baja afinidad), y un set de sitios de unión de baja afinidad para el Na^+ . No obstante, al comparar las K_D de los sets de unión de ambos estudios se puede contemplar que existen diferencias entre ellas, lo que repercute directamente en las afinidades de los cationes por el canal. Para el K^+ , la K_D del set de sitios unión de alta afinidad (primer evento de unión) es de $(89,0 \pm 12,0) \times 10^{-6}$ M a pH 4 frente a $(1,9 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ M a pH 7, y la K_D del set de sitios unión de baja afinidad (segundo evento de unión) es de $(8,1 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ M a pH 4 frente a $(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ a pH 7. Para el Na^+ , la K_D del único set de sitios de unión de baja afinidad detectado es de $(11,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ M a pH 4, mientras que la K_D a pH 7 es de $(3,3 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ M. En cuanto a las diferencias de T_m , ΔT_m , para KcsA de ambos experimentos podemos decir que estas oscilan en

valores parejos a los de los experimentos de KcsA silvestre a pH 7 y a pH 4. Es decir, en ambos experimentos se observa que las ΔT_m en el primer evento de unión a K^+ toman un valor que ronda los 5-8 °C, aumentando considerablemente en el segundo evento de unión, que pasa estar entre 24 y 35 °C. Y también ocurre lo mismo con las ΔT_m en el único evento de unión a Na^+ , en el que los valores se mueven en torno a 17-18 °C.

Condición de la muestra	Sitios de unión	K_D, M	$\Delta T_m, ^\circ C$
KcsA silvestre en baja $[K^+]$ a pH 7	2 (1 ^{er} evento)	$(1,9 \pm 0,5) \times 10^{-6}$	8
KcsA silvestre en alta $[K^+]$ a pH 7	2 (2 ^o evento)	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	35
KcsA silvestre en Na^+ a pH 7	2 (evento único)	$(3,3 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	18
KcsA silvestre en baja $[K^+]$ a pH 4	2 (1 ^{er} evento)	$(89,0 \pm 12,0) \times 10^{-6}$	5
KcsA silvestre en alta $[K^+]$ a pH 4	2 (2 ^o evento)	$(8,1 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	24
KcsA silvestre en Na^+ a pH 4	2 (evento único)	$(11,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	17

Tabla 3. Resumen de los valores obtenidos para KcsA silvestre a pH 7 y a pH 4. Los datos han sido extraídos de otras investigaciones ajenas a este trabajo experimental. Los datos de KcsA silvestre a pH 7 provienen del artículo científico de M. L. Renart y cols., 2010²⁹, y los datos de KcsA silvestre a pH4, de un trabajo previo del laboratorio todavía sin publicar.

Como se enunciaba anteriormente, en general las K_D pertenecientes al estudio de KcsA silvestre a pH 4 se muestran algo superiores a las del estudio de KcsA silvestre a pH 7, por lo que se podría decir que las afinidades de los cationes por los sets de sitios de unión son menores en KcsA silvestre a pH 4 que a pH 7. Una pérdida de afinidad semejante con respecto a KcsA silvestre a pH 7 también se observa en nuestros resultados de KcsA $\Delta 125$ a pH 7. Para el K^+ , el set de sitios de unión de alta afinidad (primer evento de unión) para KcsA $\Delta 125$ a pH 7 presenta una K_D de $(22,9 \pm 2,4) \times 10^{-6}$ M frente al valor de $(1,9 \pm 0,5) \times 10^{-6}$ M para KcsA silvestre a pH 7, y el de baja afinidad (segundo evento de unión) para KcsA $\Delta 125$ a pH 7 es de $(8,3 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ M a pH 4 frente a $(2,5 \pm$

$0,2) \times 10^{-3}$ para KcsA silvestre a pH7. Para el Na^+ , la K_D del único set de sitios de unión de baja afinidad detectado en KcsA $\Delta 125$ a pH 7 es de $(3,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ M, similar a la K_D en KcsA silvestre a pH 7 que es de $(3,3 \pm 0,5) \times 10^{-3}$ M. Esta contemplación de nuevo nos aboca a considerar que la estructura del filtro de selectividad del canal KcsA $\Delta 125$ a pH 7 se aproxima más a la que adquiriría el canal KcsA silvestre a pH 4 durante el estado inactivado. Por otro lado, los valores de las diferencias de T_m , ΔT_m , para KcsA $\Delta 125$ a pH 7 se mueven en los mismos rangos que en los experimentos de KcsA silvestre a pH 7 y a pH 4, un fenómeno que evoca la posibilidad de que las estructuras del filtro de selectividad no sean tan dispares.

En definitiva, tras analizar nuestros resultados de KcsA $\Delta 125$ a pH 7 y ponerlos en consideración con los de los estudios de KcsA silvestre a pH 7 y a pH 4, podemos establecer las siguientes observaciones para KcsA $\Delta 125$ a pH 7:

- La conformación de su filtro de selectividad es más parecida a la obtenida para KcsA silvestre a pH 4 (estado inactivado), que a la de pH 7 (estado de reposo), como sugieren los espectros de emisión de fluorescencia y la similar pérdida de afinidad de los iones por el canal.
- Su filtro de selectividad posee dos conformaciones distintas según el ion implicado sea conductor (K^+) o no conductor (Na^+), como así lo demuestran los espectros de emisión y la diferente estabilidad térmica aportada por los iones observada en el estudio de desnaturalización térmica.
- Presenta un filtro de selectividad con dos sets de sitios de unión para el K^+ (uno de alta afinidad y otro de baja afinidad), pero diferente a la conformación conductora del estado de reposo; o con un único set de sitios de unión de baja afinidad para el Na^+ , como indican los datos de la desnaturalización térmica.

Por último, si entendiésemos el canal KcsA $\Delta 125$ a pH 7 como una réplica del canal KcsA silvestre a pH 4 sin los posibles efectos inespecíficos por el cambio de pH, podemos inferir atendiendo a nuestros resultados que el filtro de selectividad del canal en el estado inactivado del mismo (bajo condiciones de pH ácido y concentraciones relativamente altas de K^+) podría tomar una conformación de dos sets de sitios de unión para el K^+ (uno de alta afinidad y otro de baja afinidad), diferente a la conformación conductora puesto que no existe conducción iónica. Con lo cual tal suposición sería afín a los modelos como el postulado por Valiyaveetil y cols. 2016³¹, y por el contrario, se rechazarían aquellos modelos que proponen que el filtro de selectividad adquiere durante el estado inactivado del canal una conformación con un solo set de sitios de unión semejante a la que posee en su estado no conductor en presencia de iones Na^+ o baja concentración de iones K^+ , como por ejemplo el modelo propuesto por E. Perozo y cols. 2010³⁰.

6. CONCLUSIONES

Por todo lo mencionado anteriormente, se pueden extraer las siguientes conclusiones del presente trabajo:

- El canal KcsA $\Delta 125$ es un buen modelo para estudiar el estado inactivado de KcsA a pH neutro.
- En el estado inactivado del canal, el filtro de selectividad podría adquirir en función del tipo de ion presente (conductor o no conductor) dos conformaciones que no son tan distintas una de la otra, como sugieren los resultados de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca.
- Durante el estado inactivado del canal, los iones K^+ aportan una mayor estabilidad térmica al canal en comparación con la aportada por los iones Na^+ , como muestran las curvas de desnaturalización térmica. La desigual

estabilidad térmica contribuida por cada catión sugiere la existencia de una conformación del filtro de selectividad para el K^+ diferente que para el Na^+ .

- El filtro de selectividad en el estado inactivado del canal presenta para el ion conductor K^+ una conformación de dos sets de sitios de unión (uno de alta afinidad y otro de baja afinidad), y para el ion no conductor Na^+ , una conformación de un único set de sitios de unión de baja afinidad.
- La conformación del filtro de selectividad del canal en el estado inactivado no se correspondería con la conformación colapsada, sino que tendría más similitud con la conformación conductora del estado de reposo, aunque con ciertas peculiaridades que imposibilitan la conducción iónica.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Flórez J, Sallés J. Acciones de los fármacos II. Dianas y mecanismos moleculares. En: Flórez J, director. Farmacología Humana. 5ª edición. Barcelona, España: Elsevier Masson; 2008. p.19-56.
2. Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:493-531.
3. Jan LY, Jan YN. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Anny Rev Neurosci.* 1997;20: 91-123.
4. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 2000;1(4): reviews0004.1.
5. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res.* 2004;62(1):9-33.
6. Schrempf H, Schmidt O, Kümmerlen R, Hinnah S, Müller D, Betzler M, et al. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 1995;14(21):5170-8.
7. Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science.* 1998;280(5360):69-77.

8. Cortes DM, Cuello LG, Perozo E. Molecular architecture of full-length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating. *J Gen Physiol.* 2001;117(2):165-80.
9. Uysal S, Vásquez V, Tereshko V, Esaki K, Fellouse FA, Sidhu SS, et al. Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(16):6644-9.
10. Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, et al. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science.* 2003;300(5627):1922-6.
11. Shi N, Ye S, Alam A, Chen L, Jiang Y. Atomic structure of a Na⁺- and K⁺-conducting channel. *Nature.* 2006;440(7083):570-4.
12. Iwamoto M, Shimizu H, Inoue F, Konno T, Sasaki YC, Oiki S. Surface structure and its dynamic rearrangements of the KcsA potassium channel upon gating and tetrabutylammonium blocking. *J Biol Chem.* 2006;281(38):28379-86.
13. Molina ML, Encinar JA, Barrera FN, Fernández-Ballester G, Riquelme G, González-Ros JM. Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry.* 2004;43(47):14924-31.
14. Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature.* 2001;414(6859):43-8.
15. Schrempf H, Schmidt O, Kümmerlen R, Hinnah S, Müller D, Betzler M, et al. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 1995;14(21):5170-8.
16. Meuser D, Splitt H, Wagner R, Schrempf H. Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* 1999;462(3):447-52.
17. Chakrapani S, Cordero-Morales JF, Perozo E. A Quantitative Description of KcsA Gating II: Single-Channel Currents. *J Gen Physiol.* 2007;130(5): 479–496.
18. Heginbotham L, LeMasurier M, Kolmakova-Partensky L, Miller C. Single *Streptomyces lividans* K⁺ Channels. *JGP.* 1999;114(4):551-60.
19. Gao L, Mi X, Paajanen V, Wang K, Fan Z. Activation-coupled inactivation in the bacterial potassium channel KcsA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(49):17630-5.
20. Perozo E, Cortes DM, Cuello LG. Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating. *Science.* 1999 ;285(5424):73-8.
21. Liu YS, Sompornpisut P, Perozo E. Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nat Struct Biol.* 2001;8(10):883-7.
22. Cuello LG, Cortes DM, Jogini V, Sompornpisut A, Perozo E. A Molecular Mechanism for Proton-Dependent Gating in KcsA. *FEBS Lett.* 2010; 584(6): 1126–1132.
23. Cordero-Morales JF, Cuello LG, Zhao Y, Jogini V, Cortes DM, Roux B, et al. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(4):311-8.

24. Cordero-Morales JF, Cuello LG, Perozo E. Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(4):319-22.
25. Cuello LG1, Jogini V, Cortes DM, Pan AC, Gagnon DG, Dalmas O, et al. Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels. *Nature.* 2010 Jul 8;466(7303):272-5.
26. Rotem D, Mason A, Bayley H. Inactivation of the KcsA potassium channel explored with heterotetramers. *J Gen Physiol.* 2010;135(1):29-42.
27. Zhou Y, MacKinnon R. 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.* 2003;333(5):965-75.
28. Renart ML, Barrera FN, Molina ML, Encinar JA, Poveda JA, Fernández AM, et al. Effects of conducting and blocking ions on the structure and stability of the potassium channel KcsA. *J Biol Chem.* 2006;281(40):29905-15.
29. Renart ML, Triano I, Poveda JA, Encinar JA, Fernández AM, Ferrer-Montiel AV, et al. Ion binding to KcsA: implications in ion selectivity and channel gating. *Biochemistry.* 2010 Nov 9;49(44):9480-7.
30. Cuello LG, Jogini V, Cortes DM, Perozo E. Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. *Nature.* 2010;466(7303):203-8.
31. Matulef K, Annen AW, Nix JC, Valiyaveetil FI. Individual Ion Binding Sites in the K(+) Channel Play Distinct Roles in C-type Inactivation and in Recovery from Inactivation. *Structure.* 2016;24(5):750-61.
32. Liu S, Focke PJ, Matulef K, Matulef K, Bian X, Moënne-Loccoz P, et al. Ion-binding properties of a K+ channel selectivity filter in different conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(49): 15096–15100.