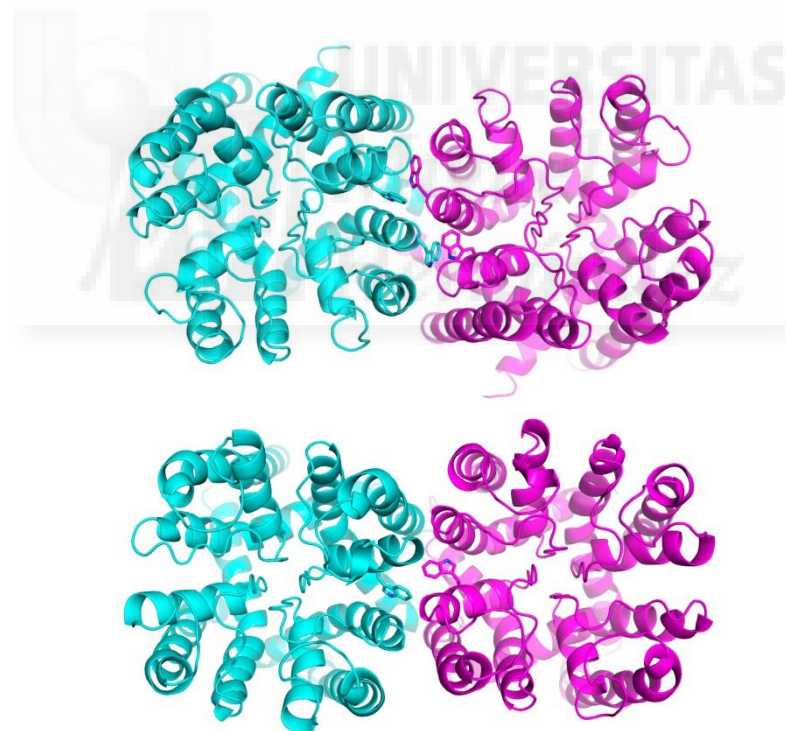


Universidad Miguel Hernández de Elche
Instituto de Biología Molecular y Celular

Modulación de las Propiedades Funcionales del Canal de Potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA



TESIS DOCTORAL

María Luisa Molina Gallego

Elche, 2015

D. Antonio V. Ferrer Montiel, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de la Tesis Doctoral titulada: “**Modulación de las propiedades funcionales del canal de potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA**”, presentada por Dña. María Luisa Molina Gallego.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presenta certificado en Elche, a 14 de julio de 2015.

Fdo.: Prof. Antonio V. Ferrer Montiel

D. José Manuel González Ros, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA: que la Tesis Doctoral que lleva por título: “**Modulación de las propiedades funcionales del canal de potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA**”, presentada por Dña. María Luisa Molina Gallego, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 14 de julio de 2015.

Fdo.: Prof. José Manuel González Ros

*A mis padres,
y en especial, a mi hermana y a mi amor José Manuel*



*“Principios para el desarrollo de una mente completa: Estudiar la ciencia del arte.
Estudiar el arte de la ciencia. Desarrollar tus sentidos, especialmente aprender a ver.
Darse cuenta de que todo está conectado con todo lo demás.”*

Leonardo da Vinci (1452-1519)

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

Isaac Newton (1643-1727)

AGRADECIMIENTOS

Es para mí un orgullo haber realizado esta Tesis Doctoral bajo la dirección del Dr. José Manuel González Ros al que deseo expresar mi más sincero agradecimiento. Para mí ha sido un ejemplo a seguir lleno de sabiduría tanto científica, como de gestión y a nivel personal. Una gran persona que impulsó la creación del Centro y después Instituto de Biología Molecular y Celular reuniendo a un gran equipo de científicos. Agradezco enormemente sus atenciones y perennes cuidados, mucho más de lo que nunca creerá, así como el iniciarme en la cultura musical coral y operística en aquel coro de la UMH, nacido también bajo su impulso, en el que pasamos tan buenos ratos y en el que conocí a mi amor.

Deseo expresar también mi más profundo agradecimiento al Dr. Pere Berbel por abrirme las puertas del mundo de la ciencia en el Instituto de Neurociencias. Recuerdo aquella etapa con muchísima nostalgia y cariño. A Eva Ausó, compañera de aquel, mi primer laboratorio, por haber sido como una hermana para mí.

A Antonio Ferrer, por sus consejos durante mis comienzos y por instruirme y transmitirme su ilusión del interés farmacológico que tenía mi descubrimiento del péptido activador y que supuso abrirme la mente emprendedora en el uso de los péptidos como base para el desarrollo de moléculas farmacológicas. A Andrés Morales, por sus consejos y su gran sabiduría y experiencia en el árduo análisis de la electrofisiología. Gracias a los dos por hacerme sentir siempre tan bien, por ser esa palmadita en la espalda que todos necesitamos.

A Gregorio Fernández, por sus maravillosos modelos y por sus valiosos consejos durante la escritura de esta Tesis y por saber mirar siempre las cosas con humor.

A mis compañeros de laboratorio, Asia, Jant, Poveda, Eva, Fran, Lourdes, Marcela y Estefanía. A todos, gracias por estos años de trabajo conjunto. Me enorgullece haber sido la persona que inició el trabajo con KcsA en el laboratorio y que todos ahora trabajéis con esa proteína que tantos frutos está dando y que seguirá ofreciendo, sin duda. Son tantas las experiencias y emociones que hemos convivido que resulta difícil agradecer por algo en concreto y, por ello, me quedo con los mejores momentos que he vivido con cada uno y con cada una. En concreto, a Asia por ser ese espejo en el que me gustaría reflejarme y que me ayuda a superarme día a día, a Jant por sus comentarios halagadores que me ayudan a reforzar mi autoestima, a Poveda por ayudarme, sobretodo, en los primeros momentos en el laboratorio y en la revisión de esta Tesis, a Eva por ser ese hombro que a veces he necesitado y por su imprescindible y muy cuidadosa labor en apoyo de nuestros experimentos, a Fran, mi principal compañero de bancada, por su saber estar y por esas interesantes discusiones científicas, a Lourdes y Marcela por acercar un poquito más su tierra, Argentina, en la que descubrí que tengo cinco familias y que pude conocer durante esta Tesis Doctoral, y a Estefanía por su siempre sonrisa y por su saber hacer. También agradecer los buenos momentos que dejaron los que pasaron por el laboratorio, como Irene, Christelle, Erika, Patricia, Cheo...(perdón por si se me olvida algún estudiante).

A mi querida Gloria, directora del Laboratorio de Electrofisiología de Membranas en la Universidad de Chile, a sus hijos y su marido Juan, siempre bromista que ya no se encuentra entre nosotros, y que me ayudaron a pasar la peor nochevieja de mi vida, lejos de mi familia al otro lado del

charco. A mis compañeros de laboratorio en Chile, Mauricio y Vero, que tras mi estancia en Chile vinieron a nuestro lab en el IBMC, y Paola y Loreta, ambas, la chispa de aquel laboratorio. Gracias a todos por abrirme las puertas de par en par de vuestro laboratorio en Chile. Recuerdo con alegría, especialmente, aquel viernes a las 7 de la tarde cuando registré la actividad de KcsA por primera vez validando meses de trabajo previo y nos fuimos a tomar unas “chelitas” para celebrarlo.

A Paco Sala, por permitirme usar su equipo de patch-clamp en su laboratorio del Instituto de Neurociencias y por hacerme sentir tan bien.

A mis compañeros del coro de la UMH, Sofía, M^a Ángeles, M^a Teresa, Úrsula, Rosa, Lola, Cruz, Vicente, Pepe, Ricardo, Luis, Paco, Gerardo, Pablo, Goretti, Alberto, Felipe, Begoña, Isabel, Victoria,..., por esos recuerdos tan entrañables, de aquellas cenas y los cánticos en el autobús de vuelta de los conciertos. En especial a Sofía, por sus consejos, su confianza y su ánimo en mis peores momentos. Al Coro Maestro Casanovas y Orfeón Municipal Ricardo Lafuente, ambos de Torrevieja, por su gran acogida y por ser ese aliento que te ayuda a coger fuerzas.

A mi querida familia de Ars Creatio, Manolo, Encarna, Eliseo, Paqui, Antonio, María, José Miguel, Belén, Amapola, Chema, Marina, Garres, Javi, M^a José, Mery, Rubén,... con los que damos rienda suelta a nuestras inquietudes culturales y artísticas, así como por ser mi plataforma para organizar la Semana de la Ciencia en Torrevieja, y ya vamos por la séptima edición!

A José Manuel, mi amor, por su comprensión y por su paciencia. Por hacerme reír cuando estoy triste, cuando tengo un mal día o me siento incomprendida. Por tener esa alegría, esa energía, y esa enorme inteligencia y creatividad que me tiene cautivada. *You raise me up.*

Y finalmente, pero no por ello menos importante, a mis padres por su apoyo incondicional y sus noches de preocupación. Por todo aquello que hacen por mí, nunca estaré suficientemente agradecida.

PREFACIO

La presente Tesis Doctoral titulada “Modulación de las propiedades funcionales del canal de potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA” carece de resultados preliminares y ha sido elaborada de acuerdo a la normativa de la Universidad Miguel Hernández de Elche para la “Presentación de tesis doctorales con un conjunto de publicaciones”, dividiéndose en las siguientes partes:

-Introducción

-Objetivos (español e inglés)

-Puesta a Punto de la Metodología. Aquí se detalla la puesta a punto de la metodología principal que fue introducida por primera vez en el laboratorio para la realización de esta Tesis Doctoral. Incluye la optimización de la expresión, purificación, reconstitución en lípidos y registro electrofisiológico de KcsA. El resumen de otros “materiales y métodos” adicionales utilizados se recoge en las diferentes publicaciones.

-Resumen Global de Resultados (español e inglés)

-Resultados: Aquí se incluyen las publicaciones seleccionadas para formar parte de la presente Tesis Doctoral:

Publicación 1: **Molina, M.L.**, Encinar, J.A., Barrera, F.N., Fernández-Ballester, G., Riquelme, G., and González-Ros, J.M. (2004) Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* Nov 30;43(47):14924-31.

Publicación 2: **Molina, M.L.**, Barrera, F.N., Fernández, A.M., Poveda, J.A., Renart, M.L., Encinar, J.A., Riquelme, G., and González-Ros, J.M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J. Biol. Chem.* Jul 7;281(27):18837-48

Publicación 3: Giudici, A.M., **Molina, M.L.**, Ayala, J.L., Montoya, E., Renart, M.L., Fernández, A.M., Encinar, J.A., Ferrer-Montiel, A.V., Poveda, J.A., and González-Ros, J.M. (2013) Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: relative abundance and interactions involved. *Biochim. Biophys. Acta.* Feb;1828(2):193-200.

Publicación 4: **Molina, M.L.**, Barrera, F.N., Encinar, J.A., Renart, M.L., Fernández, A.M., Poveda, J.A., Santoro, J., Bruix, M., Gavilanes, F., Fernández-Ballester, G., Neira, J.L., and González-Ros, J.M. (2008) N-type inactivation of the potassium channel KcsA by the Shaker B "ball" peptide: mapping the inactivating peptide-binding epitope. *J. Biol. Chem.* Jun 27;283(26):18076-85.

-Anexo: Aquí se incluye el manuscrito actualmente en estado de revisión: **Molina, M.L.**, Giudici, A.M., Poveda, J.A., Fernández-Ballester, G., Montoya, E., Renart, M.L., Fernández, A.M., Encinar, J.A., Riquelme, G., Morales, A., and González-Ros, J.M. Competing lipid-protein and protein-protein interactions determine clustering and gating patterns in KcsA. Este manuscrito forma parte del cuerpo de doctrina relativo a la modulación de la actividad de KcsA como sistema modelo en estos estudios.

-Avances Relevantes: Este apartado contiene un resumen de datos suplementarios de las publicaciones, así como de los avances más relevantes obtenidos durante y tras la publicación de cada artículo, algunos de los cuales forman parte de manuscritos en preparación o están pendiente de patente.

-Discusión

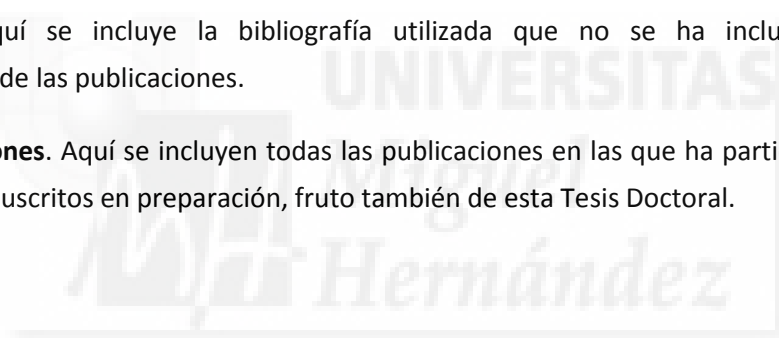
-Conclusiones (español e inglés)

-Reflexión final

-Perspectivas futuras: Aquí se incluyen las líneas futuras de investigación surgidas a partir de los datos obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral.

-Bibliografía. Aquí se incluye la bibliografía utilizada que no se ha incluido en el apartado correspondiente de las publicaciones.

-Otras publicaciones. Aquí se incluyen todas las publicaciones en las que ha participado la doctoranda, así como los manuscritos en preparación, fruto también de esta Tesis Doctoral.



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Las abreviaturas y acrónimos utilizados en esta Tesis Doctoral vienen desglosados en los apartados correspondientes de los artículos que conforman el apartado de Resultados.

GLOSARIO Y ANGLICISMOS

En esta Tesis Doctoral se ha evitado la utilización de anglicismos, sustituyéndolos por su palabra correspondiente en castellano, en los casos en los que ha sido posible. A pesar de ello, a veces ha sido más conveniente utilizarlos, dada su frecuente utilización en el área y por lo preciso, breve y descriptivo del término en inglés. Por ello, se presenta aquí una lista de anglicismos y términos poco conocidos o de difícil interpretación utilizados en la presente Tesis Doctoral:

“Anticluste”	Anti agrupación.
“Chord conductance”	“ <i>Conductancia de cuerda</i> ”, conductancia de la recta que conecta la corriente a un voltaje concreto y la corriente cero en el valor del potencial de inversión.
“Cluster” o “Clustering”	Agrupación macromolecular de dos o más canales o tetrámeros de KcsA.
“Coiled-coil”	Hélice superenrollada.
“Coupled gating”	Acoplamiento funcional entre canales de KcsA, donde dos o más canales se abren y cierran a la vez.
“Cross-linking”	Entrecruzamiento.
“Electrodo”	Término griego que introdujo Michael Faraday (1834) y significa “camino del electrón”.
“Flickering”	Aperturas y cierres de canales tan rápidas que apenas llegan a resolverse en su total amplitud.
“Gate”	Puerta o región de los canales que, mediante cambios conformacionales, modula el flujo de iones.
“Gating”	Conjunto de mecanismos que abren o cierran los canales.
“Holding”	Potencial de comando.
“Inner gate”	Puerta intracelular.
“Inside-out”	Configuración dentro-fuera.
“Ion”	Término griego que introdujo Michael Faraday (1834) y significa “lo que va”.
“Leak”	Fuga, escape.

<i>“Molecular Docking”</i>	Acoplamiento físico entre dos moléculas. Método de modelado molecular que predice la conformación preferida de una molécula, al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable.
<i>“Patch-clamp”</i>	Técnica de fijación o pinzamiento zonal de membrana que permite el estudio individual o múltiple de canales iónicos.
<i>“patchwork membrane”</i>	Membrana en multidominios auto-organizados.
<i>“scattering”</i>	Dispersión o separación de las ondas de distinta frecuencia al atravesar un material determinado.
<i>“Second gate”</i>	Segunda puerta, puerta extracelular o puerta del filtro de selectividad.
<i>“Slope conductance”</i>	<i>“Conductancia de la pendiente”</i> , conductancia de la pendiente de la tangente a la curva corriente-voltaje a un voltaje particular.



ÍNDICE



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Canales iónicos	3
1.1 Generalidades sobre excitabilidad neuronal.....	3
1.2 Clasificación de los canales iónicos.....	5
1.3 Estructura de los canales iónicos	7
1.4 Origen común de los canales catiónicos activados por voltaje	9
2. Canales de potasio.....	11
2.1 Generalidades sobre los canales de potasio.....	11
2.2 Clasificación de los canales de potasio	11
3 Canales de potasio activados por voltaje (Kv).....	15
3.1 Subunidad α	15
3.2 Inactivación de los canales Kv	16
3.3 Estructura de la subunidad α	18
3.4 Ensamblaje de las subunidades α del canal	19
3.5 Subunidades β	19
4. El canal de potasio de <i>Streptomyces lividans</i>, KcsA.....	21
4.1 Estructura del canal de potasio KcsA.....	21
4.2 Hidratación/Deshidratación del K^+ en la entrada extracelular y en la cavidad central.	22
4.3 Eficacia y selectividad en la conducción de iones	23
4.4 KcsA y MthK representan las estructuras cerrada y abierta de los canales de potasio.	24
4.5 Las dos puertas de conducción de los canales iónicos.....	26
4.6 Controversia en la caracterización previa de la actividad del canal de potasio KcsA....	27
5. Los canales iónicos como dianas farmacológicas	30
5.1 Canalopatías	31
6. Métodos de estudio de los canales iónicos	33
7. La técnica de patch-clamp.....	35
7.1 La técnica de "patch-clamp" permite medir el movimiento de iones a través de canales iónicos.....	35
7.2 Configuraciones de la técnica de "Patch-Clamp"	37
-Configuración "sobre la célula" ("cell-attached"o "on-cell").....	38
-Configuración "interior-fuera" ("inside-out").....	38
-Configuración "célula-entera" ("whole-cell").....	38
-Configuración "exterior-fuera" ("outside-out").....	39
7.3 Los registros de "patch-clamp" permiten estudiar las propiedades de los canales iónicos	39

OBJETIVOS / OBJECTIVES.....	41
PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA.....	45
<i>OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN, RECONSTITUCIÓN EN LÍPIDOS Y REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE KcsA</i>	
<i>Resumen</i>	<i>49</i>
<i>I. Clonación del gen kcsA en pQE-30 y generación de mutantes.....</i>	<i>51</i>
<i>I.1 Clonación del gen kcsA en pQE-30.....</i>	<i>51</i>
<i>I.2 Construcción de deleciones del C-terminal de KcsA: KcsA Δ154-160, Δ125-160, Δ120-160 y Δ115-160.....</i>	<i>53</i>
<i>I.3 Mutagénesis dirigida de KcsA.....</i>	<i>56</i>
<i>II. Expresión y purificación del canal de potasio KcsA.....</i>	<i>58</i>
<i>II.1 Optimización de la expresión de KcsA.....</i>	<i>58</i>
<i>II.2 Optimización de la purificación de KcsA por cromatografía de afinidad.....</i>	<i>59</i>
<i>II.3 Caracterización de la elución de KcsA con gradiente de imidazol</i>	<i>62</i>
<i>II.4 Resumen de la expresión y purificación optimizada de KcsA.....</i>	<i>64</i>
<i>III. Gradiente de sacarosa de KcsA purificado</i>	<i>66</i>
<i>IV. Eliminación del C-terminal de KcsA por digestión con quimitripsina.....</i>	<i>67</i>
<i>IV.1 Optimización de la digestión con quimotripsina.....</i>	<i>67</i>
<i>IV.2 Comprobación del sitio de corte de KcsA por quimiotripsina mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF.....</i>	<i>69</i>
<i>IV.3 Comprobación de la presencia del N-terminal en KcsA cortado con quimotripsina mediante inmunoblot anti-His₄.....</i>	<i>72</i>
<i>V. Reconstitución de KcsA en vesículas lipídicas de asolectina, LUVs.....</i>	<i>73</i>
<i>V.1 Preparación de vesículas de asolectina</i>	<i>73</i>
<i>V.2 Optimización de la extracción de detergente y reconstitución de KcsA</i>	<i>73</i>
<i>VI. Comprobación de la obtención de vesículas cerradas en la reconstitución de KcsA</i>	<i>77</i>
<i>VII. Comprobación de la orientación de KcsA reconstituido en LUVs de asolectina</i>	<i>78</i>
<i>VIII. Incorporación de KcsA y sus mutantes en liposomas gigantes de asolectina</i>	<i>79</i>
<i>IX. Registros electrofisiológicos de la actividad de KcsA mediante Patch-Clamp.....</i>	<i>80</i>
<i>IX.1 Sistema de registro de la actividad de KcsA en liposomas gigantes de asolectina mediante patch-clamp de parche escindido en configuración "inside-out"</i>	<i>80</i>
<i>IX.2 Protocolos de adquisición de datos</i>	<i>81</i>
<i>IX.3 Optimización de la concentración de KcsA en los liposomas gigantes para el registro de su actividad.....</i>	<i>82</i>
<i>IX.4 Optimización de la composición de lípidos para la formación de liposomas gigantes y el registro de la actividad de KcsA.....</i>	<i>83</i>

RESUMEN DE RESULTADOS / SUMMARY OF RESULTS	85
RESULTADOS	89
<i>PUBLICACIÓN 1: Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA.....</i>	<i>91</i>
1.1 <i>Resumen</i>	93
1.2 <i>Publicación 1</i>	95
1.3 <i>Trabajo adicional</i>	103
<i>PUBLICACIÓN 2: Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model.....</i>	<i>105</i>
2.1 <i>Resumen</i>	107
2.2 <i>Publicación 2.....</i>	109
2.3 <i>Trabajo adicional</i>	121
<i>PUBLICACIÓN 3: Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: relative abundance and interactions involved.....</i>	<i>123</i>
3.1 <i>Resumen</i>	125
3.2 <i>Publicación 3.....</i>	127
<i>PUBLICACIÓN 4: N-type inactivation of the potassium channel KcsA by the Shaker B "ball" peptide: mapping the inactivating peptide-binding epitope.....</i>	<i>135</i>
4.1 <i>Resumen</i>	137
4.2 <i>Publicación 4</i>	139
4.3 <i>Trabajo adicional</i>	149
ANEXO.....	151
<i>MANUSCRITO EN REVISIÓN: Competing lipid-protein and protein-protein interactions determine clustering and gating patterns in KcsA.....</i>	<i>153</i>
A.1 <i>Carta del editor.....</i>	155
A.2 <i>Resumen</i>	157
A.3 <i>Manuscrito en revisión</i>	159
A.4 <i>Trabajo adicional</i>	181
AVANCES RELEVANTES.....	183
DISCUSIÓN.....	189
1. <i>Implicación del C-terminal en la tetramerización de KcsA.....</i>	191
2. <i>Hallazgo de una sorprendente capacidad de modulación de la actividad de KcsA basada en el acoplamiento funcional de los canales.....</i>	192

3.	<i>El funcionamiento acoplado de los canales se correlaciona con la capacidad de agrupación de KcsA.....</i>	194
4.	<i>Importancia de la ratio lípido/proteína en la obtención de diferentes patrones de actividad...</i>	197
5.	<i>Determinantes moleculares implicados en la oligomerización y agrupación de KcsA</i>	198
6.	<i>Modulación de la actividad y agrupación de KcsA por lípidos aniónicos</i>	199
6.1	<i>El exceso de lípidos aniónicos disocia las agrupaciones y desacopla funcionalmente los canales de KcsA.....</i>	199
6.2	<i>La competencia de las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína en el sitio no anular determina la agrupación y el acoplamiento funcional de KcsA.....</i>	200
7.	<i>Los modelos de interacción permiten proponer una hipótesis que explica la actividad de tipo LOP, la actividad de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales de KcsA.....</i>	202
7.1	<i>Los modelos de interacción lípido-proteína explican la actividad de tipo LOP.....</i>	203
7.2	<i>Los modelos de interacción proteína-proteína explican la actividad de tipo HOP</i>	206
7.3	<i>Los modelos de interacción proteína-proteína explican el acoplamiento funcional entre canales de KcsA.....</i>	206
7.4	<i>La mutagénesis dirigida corrobora la hipótesis que explica la actividad de tipo LOP, de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales de KcsA.....</i>	207
7.5	<i>Similitud entre KcsA y los Kir en la modulación de la triada de inactivación</i>	210
8.	<i>Flexibilidad del filtro. El filtro tiene estructuras diferentes en el canal aislado y agrupado que podrían explicar el cambio de selectividad K^+/Na^+ observado entre LOP y HOP.....</i>	210
9.	<i>El “docking” entre canales de 6TM sugiere que la hipótesis de modulación de la actividad por interacción con el canal adyacente podría aplicarse también a canales de 6TM.....</i>	213
10.	<i>La modulación de la actividad de KcsA por agrupación y por lípidos se correlaciona con evidencias en otros canales y con el modelo emergente de “patchwork membrane” indicando que puede ser un fenómeno generalizado en las proteínas de membrana.....</i>	215
11.	<i>Inactivación de tipo N de KcsA por el péptido inactivante de Shaker, ShB.....</i>	217
11.1	<i>Interacciones y estructura del péptido inactivante en horquilla β cuando se une a su diana de inactivación en el canal.....</i>	217
11.2	<i>La inactivación de tipo N en KcsA muestra características muy similares al mecanismo de inactivación de tipo C.....</i>	219
12.	<i>Símil de los canales iónicos con un engranaje</i>	220
13.	<i>Las subconductancias observadas en la actividad de los canales iónicos podrían corresponder a aperturas basadas en el acoplamiento funcional de los canales.....</i>	221
14.	<i>Traslación de los resultados en moléculas moduladoras, dianas y estrategias farmacológicas para el diseño de moléculas moduladoras de canales iónicos.....</i>	225
	CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	227
	REFLEXIÓN FINAL	233

PERSPECTIVAS FUTURAS	239
APÉNDICES	245
1. <i>La bacteria "Streptomyces lividans"</i>	<i>247</i>
2. <i>Estructura y propiedades de los aminoácidos</i>	<i>249</i>
3. <i>Interacciones moleculares.....</i>	<i>253</i>
4. <i>Conceptos eléctricos</i>	<i>255</i>
5. <i>Tabla de bibliografía de canales o receptores que muestran cambios en su actividad debido a agrupaciones y/o a lípidos</i>	<i>263</i>
BIBLIOGRAFÍA.....	265
OTRAS PUBLICACIONES.....	279



INTRODUCCIÓN



1. Canales iónicos

“Los canales iónicos son las proteínas responsables de la generación y orquestación de las señales eléctricas que atraviesan el cerebro que piensa, el corazón que late y el músculo que se contrae”

(Ackerman y Clapham, 1997)

1.1 Generalidades sobre excitabilidad neuronal

La mayoría de nuestras actividades y funciones dependen del correcto funcionamiento del sistema nervioso. Se distingue éste por su extraordinaria complejidad; puede recibir miles de datos de información simultánea procedentes de los órganos sensoriales, que después ha de integrar para generar una respuesta adecuada. La percepción de una sensación se produce gracias a la comunicación entre neuronas. Estas células, al igual que las musculares, transmiten la información mediante cambios rápidos y transitorios en la diferencia de potencial a través de su membrana celular, un proceso que genera señales eléctricas discontinuas. La generación y propagación de estos potenciales de acción, así se denominan, vienen posibilitadas merced a la presencia, en la superficie de las neuronas, de canales iónicos (Figura 1).

El potencial de acción celular que permite al cerebro pensar, al corazón latir y al músculo contraerse, es el resultado de una serie de cambios secuenciales en la conductancia de la membrana a distintos iones producidos en respuesta a cambios en el potencial eléctrico entre la célula y el medio que la rodea. Alan Lloyd Hodgkin y Andrew Huxley propusieron un modelo en 1952 para explicar la iniciación y propagación de los potenciales de acción en el axón gigante del calamar y en 1963 recibieron el Premio Nobel en fisiología - medicina por este trabajo. Los iones son moléculas hidrofílicas inmiscibles en los lípidos de la membrana y para atravesarla requieren de mecanismos específicos de transporte a través de estructuras especializadas que atraviesan la bicapa lipídica-hidrofóbica, de las que las más importantes son los *canales iónicos* (Hille, 1992).

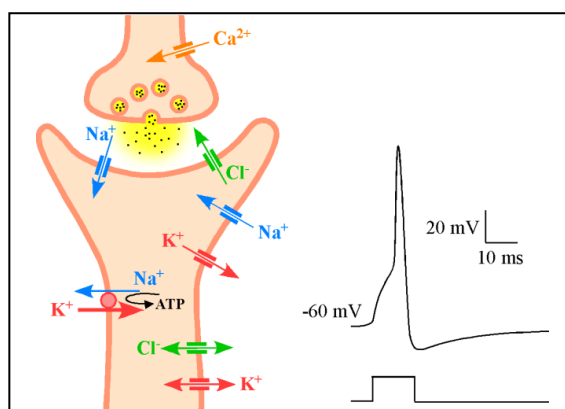


Figura 1. Los canales iónicos son mediadores de la información. Los canales iónicos median la transmisión de información en el sistema nervioso y muscular. La actividad biológica de estas estructuras moleculares provoca flujos iónicos en las células nerviosas y musculares, que se traducen en cambios rápidos y transitorios en la diferencia de potencial de membrana. Esos cambios generan señales eléctricas conocidas como potenciales de acción. (Modificada de Planell-Cases et al, 2005).

Desde 1952 con Hodgkin y Huxley, hablamos de excitabilidad como la propiedad funcional que tienen ciertas células para generar respuestas eléctricas ante los estímulos que reciben. Dichas respuestas eléctricas son los denominados potenciales de acción y es una propiedad fundamental para el procesamiento de la información en los organismos multicelulares. La variabilidad de estas respuestas está dada por las propiedades de los diferentes tipos celulares, por la morfología y la distribución de los canales iónicos en la membrana celular; así, como por las propiedades de la red neuronal.

En las neuronas, las descargas eléctricas conforman el lenguaje principal del sistema nervioso (SN), y se generan porque las células presentan cambios en su estado o potencial de reposo que en realidad es un estado de equilibrio dinámico. Como sabemos, el mecanismo de transmisión de la información en el SN se basa en cambios más o menos bruscos del potencial de la membrana, cambios que llamamos potenciales de acción o potenciales sinápticos, donde el potencial de reposo es el potencial del que emerge el potencial de acción y al cual este último regresa cuando la neurona ha disparado.

La membrana celular es una barrera que separa dos medios acuosos de distinta composición, el extracelular y el intracelular, regulando su composición. Los iones son moléculas hidrofílicas inmiscibles en los lípidos de la membrana y que para atravesarla requieren de mecanismos específicos de transporte.

El transporte de iones a través de las membranas celulares se produce a través de tres tipos de proteínas de membrana: los canales iónicos, los transportadores y las bombas iónicas. En algunos casos, los iones pasan a favor de su gradiente de concentración a través de poros hidrofílicos denominados canales iónicos y, en otros, se transportan uniéndose a proteínas transportadoras o "carriers"; ambos sistemas de transporte son pasivos y, por tanto, no consumen energía. Otras veces, el transporte iónico se realiza contra un gradiente electroquímico, desde la zona más diluida a la más concentrada, utilizando unas proteínas denominadas bombas iónicas. Esta forma de transporte es activa y requiere el consumo de energía procedente de la hidrólisis del ATP.

Los canales iónicos son las principales proteínas de membrana que regulan el flujo iónico a través de las membranas celulares, debido a su abundancia, ubicuidad y diversidad. Los canales iónicos se encuentran en las membranas celulares de todos los organismos vivos y controlan prácticamente todos los procesos biológicos: la excitabilidad neuronal y muscular, la secreción hormonal, el aprendizaje y la memoria, la transducción sensorial, el balance osmótico (balance de sales y agua), la regulación de la presión sanguínea, la regulación de la proliferación celular, etc.

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana. Forman poros que permiten el paso selectivo de iones entre el interior y exterior de las células. Aunque los canales iónicos se encuentran en las membranas de todas las células, se han estudiado especialmente en el nervio y el músculo, donde son mediadores de la información. El flujo de iones a través de tales conductos genera una corriente eléctrica. Su apertura y cierre regulados genera potenciales de acción, que transmiten la información entre células. Aunque se descubrieron inicialmente en las células nerviosas y musculares, los canales iónicos se hallan en todos los tipos celulares, incluidos linfocitos, espermatozoides y células que forman tejidos o glándulas. En las glándulas desempeñan un destacado papel funcional, que abarca desde la proliferación y diferenciación celular hasta la secreción de hormonas. Revisten tal importancia los

canales iónicos en la fisiología y patología de los seres vivos, que constituye una de las principales dianas farmacológicas.

1.2 Clasificación de los canales iónicos

Tres propiedades caracterizan a los canales iónicos, acotadas por Steven A. Siegelbaum, del Instituto Médico Howard Hughes, y John Koester, del Instituto Psiquiátrico del estado de Nueva York: 1) la extremadamente rápida tasa de transporte de iones, del orden de 10 millones de iones/seg; 2) La selectividad a iones específicos; y 3) la modulación de su apertura y cierre (“gating”) por diferentes estímulos eléctricos, mecánicos, térmicos o químicos. En la Figura 2 se muestran ejemplos de la apertura y cierre de dos tipos de canales, unos que se abren en respuesta a la presencia de un agonista, como el receptor de acetilcolina (Figura 2A), y otros que se abren en respuesta a cambios en el voltaje de la membrana (Figura 2B).

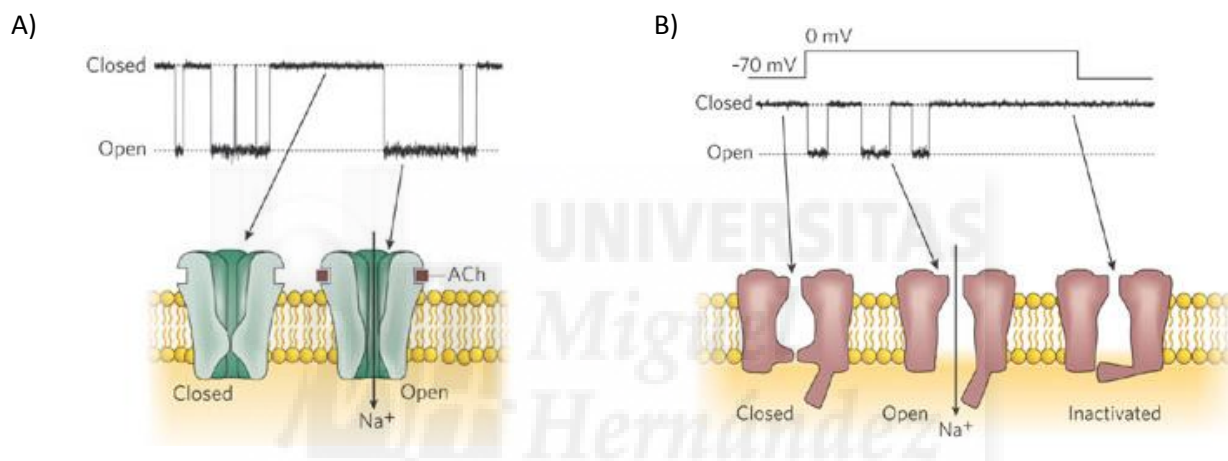


Figura 2. Ejemplos de registros de apertura y cierre de canales iónicos. Esquemas que ilustran cómo se abren y cierran los canales iónicos, con registros de canal único asociados. **A)** Apertura y cierre del receptor de acetilcolina que conduce sodio tras la unión del agonista acetilcolina. **B)** Apertura y cierre de un canal de sodio en respuesta al voltaje despolarizante. La tasa de transición entre los estados abierto y cerrado es $<10\ \mu\text{s}$. El flujo de transporte de iones a través del poro es del orden de 10^7 iones por segundo. Tras la apertura, algunos canales activados por voltaje entran en un estado inactivado (no conductor) como se puede observar en (B). (Tomado de Ashcroft, 2006)

Los canales iónicos constituyen una familia heterogénea de proteínas, que podemos clasificar en razón de sus propiedades biológicas y mecanismo de activación.

Si atendemos a su especificidad, los canales iónicos se clasifican en:

a) Canales catiónicos, canales iónicos que permiten el paso de iones con carga positiva. En función del catión que pasa por el poro, se distinguen los canales catiónicos selectivos de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y los canales catiónicos no selectivos entre cationes.

b) Canales aniónicos, canales iónicos que permiten el paso de iones con carga negativa. Los canales aniónicos son permeables, entre otros, al ión cloruro, Cl^- .

Si atendemos al mecanismo de activación, los canales iónicos se clasifican en:

a) Canales activados por voltaje (estímulo eléctrico), sensibles a los cambios de voltaje de la membrana (canales voltaje-dependientes). En este grupo se engloban los canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- .

b) Canales activados por ligando externo (estímulo químico), los canales se activan tras la interacción de un agonista con su receptor específico localizado en la superficie extracelular de la membrana celular (canales receptor-dependientes). El ligando suele ser un neurotransmisor y ejemplos de canales incluidos en este grupo son el receptor de acetilcolina, el receptor de GABA, el receptor de glicina, o el receptor de glutamato.

c) Canales activados por ligando interno (estímulo químico), los canales se activan tras la interacción de moléculas mediadoras intracelulares como Ca^{2+} , ATP, nucleótidos cíclicos, proteínas-quinasas, ácido araquidónico y sus derivados, etc.

d) Canales activados por temperatura (estímulo térmico), en este grupo se engloban los receptores de la familia de los TRPs (receptores de potencial transitorio), capaces de reconocer el espectro de temperaturas desde muy frías ($\leq 17\text{ }^\circ\text{C}$) a muy calientes ($\geq 50\text{ }^\circ\text{C}$).

e) Canales activados por presión (estímulo mecánico), los canales se activan por la deformación mecánica de la membrana celular, como la distensión o el aumento del volumen celular (canales mecanosensibles).

f) Otros canales, como los canales de las uniones estrechas o "gap-junction", los canales en células del sistema inmune, o canales iónicos de bacterias, hongos, protozoos y virus.

Sin embargo, esta división es muchas veces artificial, ya que la despolarización de la membrana puede inducir la liberación de neurotransmisores y ligandos endógenos y activar canales activados por receptores/mediadores, mientras que muchos ligandos endógenos pueden también modificar el potencial de membrana celular y activar canales voltaje-dependientes.

1.3 Estructura de los canales iónicos

Existe una enorme variedad de canales iónicos, pero todos tienen una estructura molecular común, indicando que han evolucionado de un gen ancestral común. Los canales iónicos son proteínas multiméricas, formadas por varias subunidades, donde cada subunidad tiene varios segmentos transmembrana, como se puede ver en el esquema de la Figura 3 que resume de estructura de un canal iónico.

Los canales iónicos están compuestos por: **1)** un poro, por el que pasan los iones; **2)** una compuerta, que abre o cierra el canal; **3)** el filtro de selectividad, que es una secuencia que está en el poro que deja pasar de forma selectiva iones específicos a través del canal; **4)** uno o varios sensores, en este caso se muestra un sensor de voltaje, el sensor es la parte del canal que responde a un estímulo determinado, específico del canal (estímulo eléctrico como el voltaje, estímulo químico como un neurotransmisor); **5)** y un mecanismo de transducción, mediante el cual, la recepción del estímulo por el sensor provoca un cambio conformacional de la proteína que se transmite hacia la compuerta produciendo la apertura o cierre del canal en respuesta a dicho estímulo.

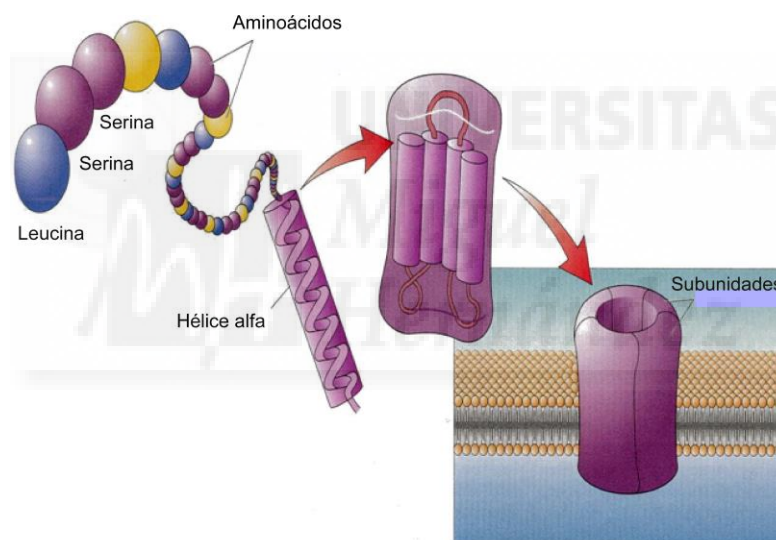


Figura 3. Estructura molecular de los canales iónicos. Los canales iónicos son proteínas multiméricas, formadas por varias subunidades, donde cada subunidad tiene varios segmentos transmembrana. (Tomado de Bear, M.F. Neuroscience, L.W.)

Los canales tienen estructura modular, y están formados por dos módulos principales: el módulo conductor, que forma el poro iónico, y el módulo regulador, que contiene el sensor. El canal iónico más sencillo está compuesto únicamente por el módulo del poro iónico que es un tetrámero cuyas subunidades están formadas por únicamente dos segmentos transmembrana, como los canales de potasio Kir; mientras que los más complejos como los canales de Na^+ o Ca^{2+} , están compuestos por 24 segmentos transmembrana, incluyendo los módulos conductor y regulador (Figura 4).

Otros están compuestos por dos poros; otros están compuestos por un poro y un módulo regulador sencillo, formado por un solo segmento transmembrana, como el receptor de glutamato; otros tienen cuatro o cinco segmentos transmembrana en su módulo regulador, como los canales de potasio activados por voltaje. Un canal de K^+ funcional está constituido por cuatro copias de este

polipéptido (cuatro subunidades separadas). Muy similares en su estructura son los canales de Na^+ y Ca^{2+} activados por voltaje, pero se diferencian en que éstos están constituidos por un solo polipéptido de unos 2000 aminoácidos, que contiene cuatro dominios transmembrana homólogos, siendo cada uno de ellos similar en secuencia y estructura a cada una de las subunidades individuales del canal de K^+ activado por voltaje. Estos dominios se encuentran unidos por cortas cadenas de aminoácidos no homólogos.

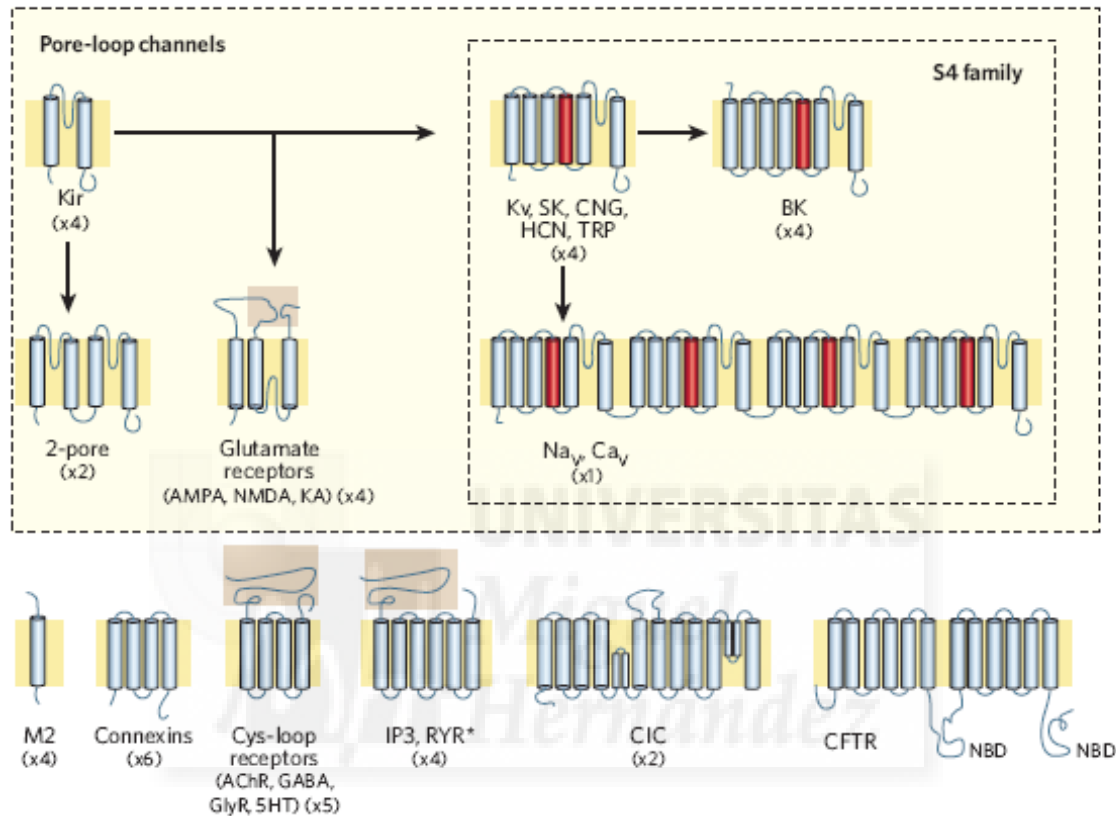


Figura 4. Tipos de canales iónicos. Predicción de la topología transmembrana de diferentes tipo de canales. Los números entre paréntesis se refieren al número de subunidades que forman el poro del canal. Los recuadros en beige indican dominios de unión de ligando. El dominio S4 está resaltado en rojo. Kir, canal de potasio rectificador de entrada. Kv, canal de potasio activado por voltaje. Na_v, canal de sodio activado por voltaje. CNG, canal activado por oligonucleótidos cíclicos. HCN, canal activado por hiperpolarización. TRP, receptores de potencial transitorio. CIC, canal de cloruro. CFTR, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística. IP3R, receptor de inositol trifosfato. RYR, receptor de ryanodina. (Tomado de Ashcroft, 2006)

1.4 Origen común de los canales catiónicos activados por voltaje

La superfamilia de canales catiónicos activados por voltaje, con 143 miembros, es uno de los grupos más grandes de proteínas implicadas en la transducción de señales, en número sólo por detrás de los receptores acoplados a proteínas G y de las proteínas kinasas. La superfamilia de canales catiónicos activados por voltaje incluye ocho familias: los canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} activados de voltaje, los canales activados por nucleótidos cíclicos (GNC), los canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (HCN), los receptores de potencial transitorio (TRPs), los canales de K^+ rectificadores de entrada, y los canales de K^+ de dos poros (Figura 5). Los canales catiónicos activados por voltaje son un ejemplo de evolución modular de proteínas, que se componen de un dominio del poro homólogo acoplado a diversos dominios reguladores de la apertura del canal que responden a cambios en el voltaje de la membrana, o a moléculas de señalización intracelular, o a ambos.

Mediante el control de las corrientes de cationes a través de la membrana celular, los canales catiónicos activados por voltaje son efectores clave de numerosos procesos fisiológicos tales como el comportamiento eléctrico de las células excitables, la liberación de neurotransmisores, la activación de la respuesta inmune, y la percepción sensorial.

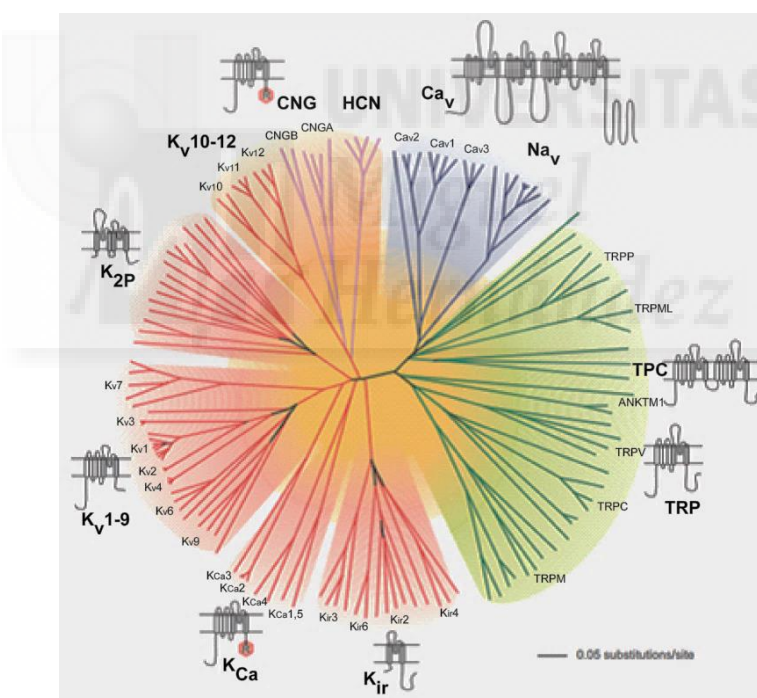


Figura 5. Origen común de los canales catiónicos activados por voltaje. Representación de la relación de la secuencia de aminoácidos de la mínima región del poro de la superfamilia de los canales iónicos activados por voltaje. Esta vista global de 143 miembros de los genes de canales iónicos estructuralmente relacionados destaca siete grupos de familias de canales iónicos y sus topologías de membrana. Los canales de cuatro dominios (Ca_v y Na_v) se muestran con ramas azules, los canales selectivos a potasio se muestran con ramas rojas, los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG y HCN) se muestran con ramas magenta, y los receptores de potencial transitorio (TRP) y relacionados se muestran con ramas verdes. Los colores del fondo separan los canales iónicos en grupos relacionados: azul claro, Ca_v y Na_v; verde claro, TRP; rojo claro, canales de potasio, excepto Kv10-12, que tienen un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y están más relacionados con los CNG y HCN; naranja claro, Kv10-12 y canales modulados por nucleótidos cíclicos, CNG y HCN. (Tomado de Yu and Catterall, 2004)

Un rasgo distintivo de la arquitectura de los canales catiónicos activados por voltaje es la estructura cuaternaria tetramérica (homotetramérica, heterotetramérica o pseudotetramérica) del dominio del poro. Dado que la integridad del tetrámero es esencial para la función de estas proteínas, la base molecular del reconocimiento entre subunidades, la oligomerización, y la estabilidad del complejo cuaternario de los canales es un aspecto crucial de su bioquímica de membrana. Para algunos canales de K^+ , se sabe que la especificidad de la asociación de los monómeros, la tetramerización, y la estabilidad de tetrámero está influenciado por las interacciones entre subunidades de dominios citoplasmáticos conservados tales como el dominio N-terminal T1 de ciertos canales de K^+ activados por voltaje (Li et al, 1992; Shen and Pfaffinger, 1995; Strang et al, 2001) y el dominio C-terminal RCK del canal MthK (Jiang et al, 2002; Dong et al, 2005). Sin embargo, los análisis de estructura-función de canales de K^+ también han revelado un papel importante de las regiones transmembrana y del filtro de selectividad en la estabilidad del dominio del poro del tetrámero (Tu et al, 1996; Heginbotham et al, 1997; Irizarry et al, 2002).

Estas similitudes entre los canales, sobretodo de los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} activados por voltaje, sugieren que todos los canales regulados por voltaje han evolucionado de un gen ancestral común, posiblemente muy similar al sencillo canal de potasio procariota de *Streptomyces lividans*, KcsA, que presenta una secuencia homóloga a los canales activados por voltaje. El canal de potasio procariota KcsA se toma por ello como modelo de canal de potasio.



2. Canales de potasio

2.1 Generalidades sobre los canales de potasio

Los tres grandes dominios de organismos, las Bacterias, las Archaeas y las Eukaryas (o eucariotas) tienen canales de potasio (Hille, 2001). Estas proteínas de membrana constituyen una familia diversa y ubicua de proteínas de membrana. Están presentes tanto en células excitables como no excitables y tienen papeles críticos en un amplio rango de procesos fisiológicos como la excitabilidad neuronal, la contracción muscular, la frecuencia cardíaca, la respuesta inmune, la secreción de hormonas (como la insulina) y liberación de neurotransmisores, la proliferación y diferenciación celular, la transducción sensorial, la modulación de la presión sanguínea, la regulación del volumen celular, la respuesta al estrés, funciones cognitivas, regulación metabólica, fertilización y apoptosis celular (Ashcroft, 2006). Además, mutaciones en genes de K^+ puede provocar patologías cardíacas o neuronales, como el síndrome del QT largo o la epilepsia (Ashcroft, 2006).

Es muy probable que los canales de potasio empezaran a evolucionar desde el momento en que la vida apareció en la Tierra, como atestigua la presencia de más de 200 tipos de canales de potasio en arqueas y bacterias (González et al, 2012). Se conocen más de 70 genes que codifican para canales de K^+ en el genoma humano, y más de 75 se han identificado en mamíferos, de los cuales la mayoría se expresan en el SN (Girard, 2004; Shieh et al, 2000). La primera vez que se identificó (Schrempf et al, 1995) y se cristalizó un canal de potasio (Doyle et al, 1998) fue todo un hito y esto se consiguió con el canal de potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA, por el grupo de R. MacKinnon. Este canal primitivo es una proteína transmembrana tetramérica, donde cada monómero está compuesto de dos dominios transmembrana (TM) conectados por la región el poro (P) que contiene el filtro de selectividad, con la secuencia consenso conservada T/SXGXGX, que le permite conducir selectivamente K^+ a través del gradiente electroquímico de la membrana (González et al, 2012). Además poseen características particulares como son: **1.** Tienen una vía o poro permeable al agua que permite que los iones de K^+ fluyan a través de la membrana celular; **2.** Tienen un filtro selectivo específico para el K^+ ; y **3.** Tienen un mecanismo de compuerta que sirve de interruptor para la conformación abierta y cerrada del canal (Shieh et al, 2000; Galárraga y Bargas, 1998; Hille, 1992). La estructura del poro del canal KcsA está presente en todos los canales de potasio conocidos hasta la fecha, incluyendo los presentes en hongos, protozoos y metazoos. Aunque la estructura del poro no ha evolucionado considerablemente, otras partes de la secuencia del canal muestran una considerable diversidad estructural (González et al, 2012).

2.2 Clasificación de los canales de potasio

Los canales de potasio se pueden clasificar de manera general en tres grandes familias con base en la homología de su estructura, es decir, según el número de hélices transmembrana (TM), lazos del poro (P), y sus características biofísicas (Girard et al, 2004; Shieh et al, 2000; Figura 5). Así, se clasifican en I) Canales con dos segmentos transmembrana y un poro (2TM/1P); II) Canales con cuatro segmentos transmembrana y dos poros (4TM/2P); y III) Canales con seis o siete segmentos transmembrana y un

poro (6-7TM/1P). Éstos últimos se dividen en *canales de K⁺ activados por voltaje (K_v)* y en *canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (K_{Ca})*.

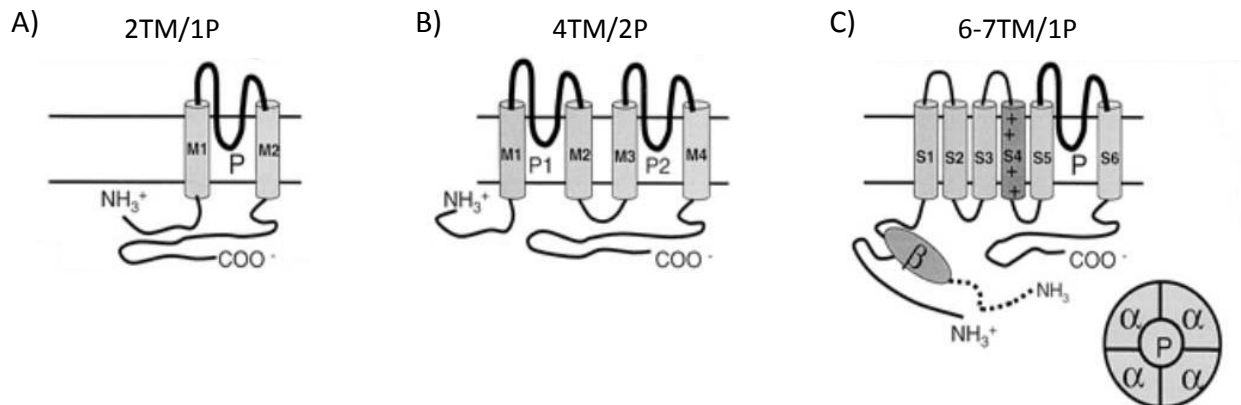


Figura 5. Representación esquemática de la clasificación estructural de los canales de K⁺. **A.** Son los canales que en su estructura tienen dos segmentos transmembrana y un poro (2TM/1P). Incluye a los canales rectificadores de entrada (Kir). **B.** Son los canales con cuatro segmentos transmembrana y dos poros (4TM/2P). Corresponde a una clase de canales de K⁺ con dos lazos P1 y P2 (K2P). **C.** Corresponde a los canales activados por voltaje (K_v) y a los activados por Ca²⁺ (K_{Ca}). Están compuestos de cuatro subunidades y cada una contiene seis segmentos transmembrana y un poro (6TM/1P). El segmento S4 corresponde al sensor de voltaje. (Modificada de Shieh et al, 2000).

I. Canales con dos segmentos transmembrana y un poro (2TM/1P):

Corresponde a la familia de canales de K⁺ rectificadores de entrada (Kir) o KCNJ. Estos canales tienen el mismo patrón estructural que el canal KcsA, sus subunidades contienen dos segmentos transmembrana que flanquean un poro y se ensamblan formando un tetrámero. Estos canales tienen un papel funcional muy importante en diversos órganos como el encéfalo, corazón, riñón, células endocrinas, oídos y retina. Se les han llamado rectificadores de entrada porque tienen corriente rectificadora en dirección de entrada, es decir que bajo potenciales electroquímicos iguales pero opuestos estos canales dejan pasar más corriente hacia el interior que hacia el exterior de la célula. Cuando el potencial de membrana empieza a ser menos negativo (despolarización celular) el canal se bloquea y el flujo saliente de K⁺ es limitado. En mamíferos se conocen 15 genes que codifican canales Kir que se agrupan en 7 subfamilias (Kir1-7). En el SNC las corrientes descritas para esta familia de canales son las I_{K1} (rectificadora de entrada), I_{GIRK} (activada por proteínas G), I_{KIR 4.1} (activada por ATP) y la I_{K(ATP)} (sensible a ATP) (Rogawski, 2000; Kubo et al, 2005).

II. Canales con cuatro segmentos transmembrana y dos poros (4TM/2P):

Esta familia de canales presenta las subunidades formadas por cuatro segmentos transmembrana y dos poros y, a diferencia de las otras dos familias de canales de potasio, se ensamblan como dímeros. En mamíferos se conocen 15 genes que codifican canales de K⁺ de dos poros (K_{2P} 1-5, 7, 9, 12, 13, 15, 18). También se les denomina como canales: TASK, TWIK, TALK, TREK, THIK o KCNK. Desde el punto de vista electrofisiológico se les conoce como canales de fuga y son voltaje independientes, rectificadores de entrada o activados por voltaje. Estos canales son reguladores de la excitabilidad pues están involucrados en la modulación del potencial de reposo de la membrana celular. Son regulados por

diversos mecanismos entre los que están: la tensión de oxígeno, el pH, los lípidos, el estiramiento mecánico, los neurotransmisores y receptores acoplados a proteínas G. Son el blanco molecular de ciertos anestésicos volátiles y locales. Las corrientes descritas para estos canales en el SNC son rectificadoras de entrada, o activada por voltaje (Taley et al, 2003; Lesage, 2003; Goldstein et al, 2005).

III. Canales con seis o siete segmentos transmembrana y un poro (6-7TM/1P)

III.1. Canales de K^+ activados por voltaje (K_V):

Constituyen la mayor familia de canales de K^+ y sus subunidades están compuestas por seis segmentos transmembrana (S1-S6) y un poro (S5-P-S6). Como su nombre indica, son canales específicos para K^+ y sensibles a los cambios de voltaje del potencial de membrana celular. Desempeñan un papel muy importante durante el potencial de acción, en especial al regresar a la célula despolarizada a su estado de reposo. Es un grupo muy diverso de canales y de acuerdo con las secuencia de aminoácidos en mamíferos incluye a las familias K_V1-12 . Esta clasificación de familias de canales de K^+ en mamíferos tiene sus homólogos en los genes de *Drosophyla melanogaster*, que corresponden a: *Shaker* (equivalente a $K_V1.1-K_V1.12$ de mamífero), *Shab* (equivalente a $K_V2.1-K_V2.2$ de mamífero), *Shaw* (equivalente a $K_V3.1-K_V3.4$ de mamífero) o *Shal* (equivalente a $K_V4.1-K_V4.2$ de mamífero). Con ocho genes diferentes, la subfamilia de *Shaker* ($K_V1.x$) es la más grande de esta clasificación estructural de canales de potasio. Otras subfamilias que son 6TM/1P son los KCNQ1-5 ($K_V7.x$), los *ether-a-go-go* o *Eag* ($K_V10.x$, activados por nucleótidos cíclicos), *Erg* ($K_V11.x$) y los *Elk* ($K_V12.x$) (Figura 6).

A pesar de que los K_V5 , K_V6 , K_V8 y K_V9 tienen la misma estructura general que los otros miembros de la familia de los K_V , no forman canales funcionales. Estas proteínas se han denominado subunidades silentes (K_VS). Forman canales heterotetraméricos con subunidades de K_V2 y K_V3 modulando sus propiedades biofísicas e inhiben la expresión de estos canales rectificadores de salida (González et al, 2012).

En el sistema nervioso central (SNC) las corrientes que se establecen a través de estos canales son de varios tipos entre las que están: **1.** Voltaje dependientes: I_A (de transiente rápido), I_D (retardada), I_K (rectificadora tardía) e I_M (activada por la despolarización y no inactivante). **2.** Rectificadoras tardías y **3.** Rectificadoras de salida (Gutman et al, 2005; Rogawski, 2000).

III.2 Canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}):

Constituye el segundo mayor grupo de canales selectivos al K^+ . A la familia de canales de 6 dominios transmembrana se añade la subfamilia de canales de potasio activados por calcio de conductancia pequeña (SKCa) y la subfamilia de canales Slo, de conductancias mayores. La subfamilia de canales SKCa, aunque contiene dos argininas en el segmento S4, son insensibles al voltaje y se abren con niveles submicromolares de Ca^{2+} intracelular. La subfamilia de canales Slo consta de cuatro miembros. Slo1 (o BK) y Slo3, a diferencia de los otros canales de potasio, contienen siete segmentos transmembrana y su N-terminal se sitúa en el medio extracelular. Los otros dos miembros de esta subfamilia, Slo2.1 y Slo2.2 tienen seis segmentos transmembrana (Figura 6).

De acuerdo con sus conductancias, este grupo se clasifica de en: BK o Maxi K (conductancia grande), IK (conductancia intermedia) y SK (conductancia pequeña) (*big, intermediate y small* respectivamente) e incluye 5 grupos (K_{Ca1-5}). Aunque la mayor parte de estos canales son insensibles al voltaje y activados por las bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular, algunos son activados por el voltaje y el Ca^{2+} intracelular, y otros se activan por el Na^+ y Cl^- intracelular (Wei et al, 2000).

Las corrientes de K_{Ca} descritas principalmente en el hipocampo son la I_C (rápida) I_{CT} (de transiente rápido) y la I_{AHP} (lenta) (Storm, 1990; Rogawski, 2000; Wei et al, 2005).

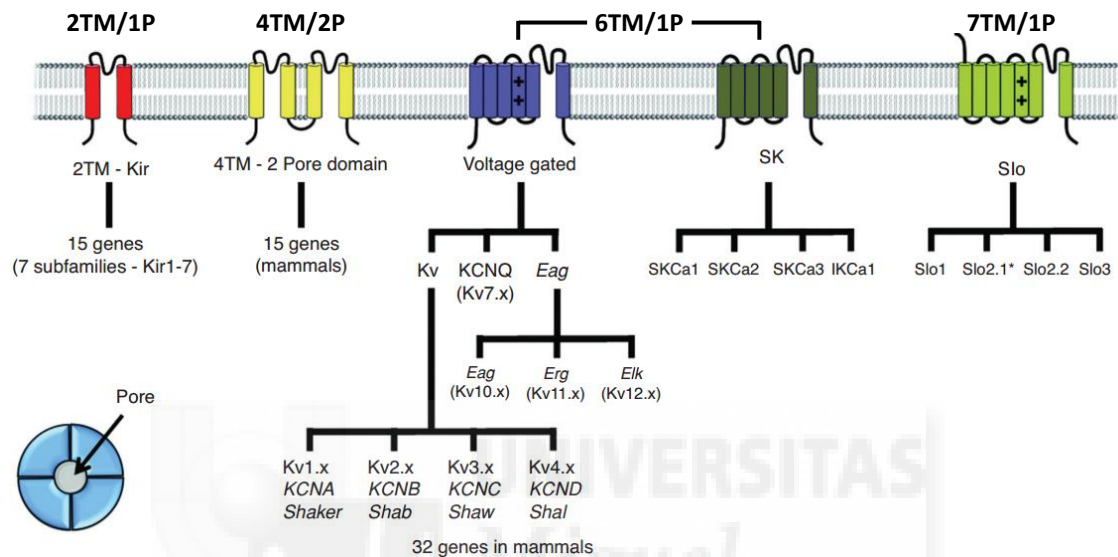


Figura 6. Esquema de las familias de los canales de K^+ clasificadas según su estructura. Las familias de los canales de K^+ pueden agruparse en función de su estructura en: las familias que tienen dos segmentos transmembrana y un poro (2TM/1P; canales Kir), 4TM/2P (canales de dos poros), 6TM/1P (los activados por voltaje y los activados por calcio), y 7TM/1P (canales Slo). Por simplicidad, la familia de gran conductancia Slo incluye los canales Slo2.x que tienen solo 6 segmentos transmembrana. Los canales con 6TM/1P pueden dividirse en cuatro familias: los activados por voltaje (Kv), los activados por voltaje de tipo KCNQ (KCNQ), los *ether-a-go-go* (Eag), y los canales activados por calcio (SK). Los canales Kv se dividen en cuatro subfamilias y los Eag en tres subfamilias que se nombran también en función de sus genes en *Drosophila melanogaster*. En la familia SK, IKCa1 significa canal de K^+ activado por Ca^{2+} de conductancia intermedia. En la tabla se muestran la nomenclatura según la "International Union of Pharmacology" (IUPHAR), según el "HUGO Gene Nomenclature Committee" (HGNC) y otros nombres comunes. (Adaptado de González et al, 2012)

3. Canales de K⁺ activados por voltaje (Kv)

A este grupo pertenecen los canales activados por voltaje Kv1-4, los ether-a-go-go (KCNH), los activados al aumentar la concentración intracelular de Ca²⁺ (KCNM y KCNN) y los KvLQT (KCNQ). Estos canales se activan durante la despolarización celular y, por su distinta cinética de activación-inactivación, participan en las diferentes fases de la repolarización del potencial de acción celular, modulando la frecuencia y morfología del mismo. Los canales funcionales resultan del ensamblaje entre 4 subunidades α y 4 β , formando homo o heterotetrámeros (Jan and Jan, 1997; MacKinnon, 1991). Cuando el canal es un homotetrámero, las cuatro subunidades α están codificadas por el mismo gen, mientras que los heterotetrámeros están constituidos por productos de distintos genes, pero siempre de la misma subfamilia. La homología de la secuencia aminoacídica de los canales Kv en las regiones transmembrana es de aproximadamente un 40% entre las subunidades α de las distintas subfamilias, mientras que dentro de cada subfamilia, Kv1-4, es de un 70%.

3.1 Subunidad α

Es la unidad central del canal, ya que contiene el poro conductor, el filtro de selectividad que permite el paso de K⁺ frente a otros cationes, el sensor de voltaje que controla los mecanismos que regulan la cinética de apertura y cierre del canal y los puntos de unión para los ligandos endógenos y fármacos. Presenta 6 segmentos que atraviesan la membrana (S1-S6) que se continúan por extremos carboxi (C-) y amino (N)-terminales intracelulares (Figura 1). El segmento S4, actúa como sensor de voltaje (MacKinnon, 1991 Yool and Schwartz, 1991), mientras que el lazo que une los segmentos S5 y S6 (segmento P) contiene la secuencia TVGYG que determina la selectividad del poro para el K⁺ (Heginbotham et al, 1994). Los canales Kv contienen en el segmento S6 una secuencia Pro-X-Pro (PXP, posiciones 473-475) capaz de producir la torsión del mismo cerca de la superficie intracelular de la membrana, lo que aumenta la entrada del vestíbulo interno del poro.

El poro iónico

El poro del canal está formado por el lazo que une los segmentos S5 y S6 (Heginbotham et al, 1994, Yellen et al, 1991). La boca interna del canal está formada por el lazo que une los segmentos S4 y S5 y las regiones citoplasmáticas de los segmentos S5 y S6, mientras que la boca externa la forman la región P y la parte extracelular de los segmentos S5 y S6. El segmento de unión de S4-S5 forma parte del poro interno y de la estructura receptora de la partícula de inactivación.

En experimentos de mutagénesis dirigida, en los que se ha analizado la selectividad iónica, la cinética de activación-inactivación y la sensibilidad a toxinas (charibdotoxina, dendrotoxina) y a tetraetilamonio cuando se aplica a la superficie extracelular (TEAo) o intracelular (TEAi), se ha podido demostrar que la región P consta de 19 aminoácidos (D431-T449) y penetra en el interior de la membrana (Yellen et al, 1991; MacKinnon and Miller, 1989; MacKinnon and Yellen, 1990). Los primeros 8 aminoácidos (D431-V438) y los 3 últimos (D447-T449) se localizan a la entrada del poro, observándose que la sensibilidad al TEAo externa aumenta casi 50 veces cuando la T449 se reemplaza por tirosina (T449Y), cisteína (T449C) o fenilalanina (T449F)(Heginbotham and MacKinnon, 1992), mientras que la mutación de este residuo por lisina, arginina, glutamato o valina reduce la sensibilidad al TEAo y la

amplitud de la corriente y suprime la rectificación del canal (Yellen et al, 1991; MacKinnon and Yellen, 1990). En el centro del segmento P se encuentra la secuencia VTMTTV (438-443), habiéndose demostrado que la T441 se localiza en la porción más profunda del poro y contribuye a la unión del TEAi (Yellen et al, 1991; MacKinnon and Miller, 1989; MacKinnon and Yellen, 1990; Papazian et al, 1991; Liman and Hess, 1991). La mutación T441S disminuye 10 veces la sensibilidad del canal al bloqueo producido tras la administración de TEAi, pero no altera la producida por el TEAo (Yellen et al, 1991; MacKinnon and Miller, 1989; MacKinnon and Yellen, 1990).

El sensor de voltaje

Los canales Kv disponen en su estructura dipolos que detectan las variaciones del potencial de membrana e inducen cambios conformacionales en la proteína del canal que conduzcan a su activación-apertura (Figura 1). Estudios de mutagénesis dirigida y de neutralización de cargas y sustitución por residuos de Cys han demostrado que el sensor del voltaje está formado por el segmento S4, que presenta cada 3 residuos un aminoácido cargado positivamente [X-X-(R/K)] y las cargas negativas de los segmentos S2 y S3, que ejercen una acción electrostática con el segmento S4 (Papazian et al, 1991; Liman and Hess, 1991; Papazian et al, 1995). Mutaciones en las que se neutralizan los aminoácidos cargados en S4 desplazan el valor del punto medio de activación del canal, lo que indica que participa en el cambio conformacional que conlleva a su apertura (Papazian et al, 1991; Liman and Hess, 1991).

Clásicamente se considera que cuando el canal se abre tiene lugar el movimiento de residuos cargados (arginina) a través del campo eléctrico transmembrana, acoplándose ambos procesos; se ha calculado que el movimiento de cargas equivale al de 14 electrones, lo que implica el movimiento de las 4 argininas que contiene cada una de las subunidades α que forman el canal (cada arginina contaría por un electrón) (Aggarwall and MacKinnon, 1996).

3.2 Inactivación de los canales Kv

En respuesta a un estímulo, las proteínas del canal son capaces de adoptar diversos estados conformacionales. En general, existe un estado conductor (estado abierto, que permite el paso de iones a su través) y dos no-conductores (estados inactivo y de reposo). A nivel del potencial de reposo celular, la probabilidad de apertura de algunos canales es mínima, es decir, que sólo un reducido número de canales puede abrirse al azar, pero sí pueden abrirse en respuesta a un estímulo adecuado. La despolarización celular aumenta la probabilidad de apertura del canal, pero si la despolarización se mantiene, la probabilidad de apertura disminuye como consecuencia del proceso de inactivación iniciado simultáneamente por el de activación; así el canal pasa al estado inactivo-cerrado desde el cual no puede volver a abrirse. Para que el canal vuelva a abrirse es necesario que el canal inactivado pase al estado de reposo, proceso al que denominamos reactivación del canal. Por tanto, la magnitud de la corriente que cruza la membrana depende de la densidad de canales, de la conductancia del canal abierto y de cuánto tiempo el canal permanece en dicho estado.

La inactivación tiene lugar por dos mecanismos, uno rápido o tipo N y otro lento o tipo C, que implican a los extremos correspondientes de la subunidad que forma el canal (Figura 7; Hoshi et al, 1991; Yellen, 2002). La inactivación de tipo N se explica según el modelo de la «bola y la cadena»

propuesta por Armstrong y Bezanilla en 1977, por el que los primeros 22 aminoácidos de cada uno de los 4 extremos N-terminales formarían una «bola de inactivación» que se une a través de una cadena de aminoácidos (residuos 23-83) a un receptor cargado negativamente, localizado en la boca intracitoplasmática del canal, que puede ser ocupado tras la apertura del mismo, produciendo su rápida inactivación (Hoshi et al, 1991; Zagotta y cols., 1990; Isacoff et al, 1991). MacKinnon demostró que existen 4 compuertas de inactivación (incluso con una sola el canal puede inactivarse), que cuando una obstruye el poro las demás ya no lo hacen y que la velocidad de reactivación del canal es independiente del número de compuertas de inactivación (MacKinnon et al, 1993).

Diversos hallazgos han confirmado la hipótesis de la bola y la cadena: **1)** al reducir el número de aminoácidos existentes entre los residuos 23 y 80 del extremo N-terminal, se acelera la velocidad de inactivación, ya que se acorta la longitud de la cadena que sujeta la bola; por el contrario, al aumentar el número de residuos la inactivación se retrasa (Isacoff et al, 1991; Hoshi y cols., 1990). **2)** Se abole tras la administración de TEA intracelular y por mutaciones que suprimen los primeros 22 aminoácidos del extremo N-terminal o rompen la secuencia de los segmentos hidrofóbicos S4-S5, y se restaura tras adicionar el péptido eliminado (Hoshi et al, 1991; Zagotta y cols., 1990; Hoshi y cols., 1990). **3)** La mutación de los residuos cargados positivamente que forman la bola retrasa la inactivación, lo que sugiere que la carga es responsable de la atracción de la bola por el poro. **4)** La inactivación tipo-N es insensible a mutaciones en la boca externa del poro iónico o del segmento S6 (Hoshi y cols., 1990, López-Barneo and Hoshi, 1993) y a la administración de TEA extracelular (Choi et al, 1999).

La inactivación lenta o de tipo C de los canales Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 y KCNH2 se bloquea cuando se aumenta la concentración de K⁺ extracelular (López-Barneo and Hoshi, 1993) o se aplica TEA a la superficie externa del canal, pero no cuando se aplica a la superficie interna, lo que parece reflejar la lenta constricción en la boca externa del poro del canal (Yellen et al, 1991; Hoshi et al, 1991; Choi et al, 1991). La inactivación de tipo C parece implicar cambios conformacionales cooperativos entre las cuatro subunidades α que forman el canal (Ogielska et al, 1995). Esta inactivación se acelera cuando la alanina en posición 469 del segmento S6 se reemplaza por valina y se retrasa cuando se reemplaza por histidina. Los canales que presentan inactivación lenta se reactivan más rápido que aquellos que se inactivan por un mecanismo intracelular rápido.

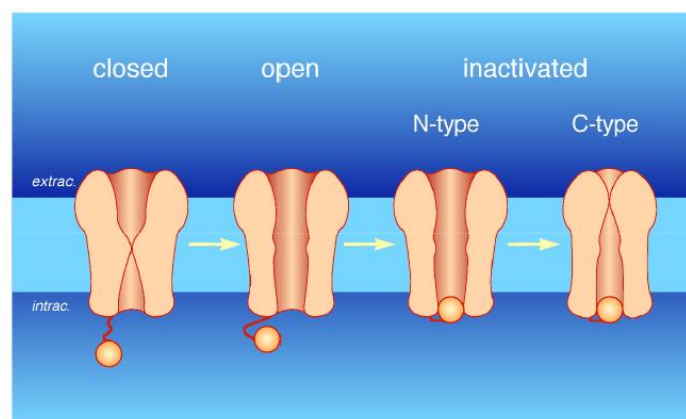


Figura 7. Mecanismos de inactivación. Los canales iónicos pueden inactivarse desde el estado abierto mediante cambios conformacionales que llevan al estado no conductor. Para los canales de potasio, se han identificado dos mecanismos de inactivación: una inactivación rápida, o de tipo N, y una inactivación lenta, o de tipo C. (Adaptado de Terlau and Stühmer, 1998).

3.3 Estructura de la subunidad α

En el año 1998, Doyle y cols (1998) describieron la estructura cristalográfica de alta resolución (3.2 Å) del primer canal de K^+ , el canal KcsA procedente de *Streptomyces lividans*, lo que constituyó un gran hito en el conocimiento de éstos y, en general, de todos los canales iónicos. La subunidad α de este canal bacteriano presenta sólo dos segmentos transmembrana (M1 y M2) que serían análogos a los segmentos S5 y S6 de los canales Kv, conectados por la región del poro de unos 30 aminoácidos, que incluye la hélice del poro (P) y el filtro de selectividad y se localiza en la superficie externa de la membrana (Figura 8). A pesar de ello, su secuencia aminoacídica es similar a la de otros canales de K^+ , como los Kv, los Kir o los activados por ligandos. El segmento M1 mira hacia la membrana y el M2 está inclinado unos 25° con respecto al plano de la membrana, por lo que delimita la entrada citoplasmática del poro del canal. El resultado es una estructura que asemeja un cono invertido, cuya base se dispone hacia la superficie de la membrana celular. La longitud del poro es de 45 Å, iniciándose en la cara citoplasmática por un túnel hidrofílico de 18 Å de longitud, que se abre en una cavidad ancha de unos 10 Å de diámetro, aproximadamente en el centro de la membrana; tras la cavidad, el poro se estrecha considerablemente, constituyendo esta barrera el filtro de selectividad. Éste está formado por las cadenas polares-carbonilo de las secuencias GYG y determina una región de 12 Å de longitud con una luz tan estrecha que sólo pueden atravesarla los iones K^+ deshidratados que alcanzan el medio extracelular.

Cuando el canal se abre, los iones de K^+ hidratados entran rápidamente en el túnel hidrofílico y desembocan en la cavidad; ambas estructuras están rodeadas de cadenas laterales hidrófobas, minimizándose la interacción electrostática del K^+ con el canal; se crea así una ruta de baja resistencia para el movimiento de K^+ desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad. A nivel de la cavidad, las hélices del poro (P) están orientadas de tal forma que dirigen sus extremos C-terminales electronegativos hacia el centro de la misma, lo que genera un campo eléctrico negativo que atrae y neutraliza la carga de los iones K^+ hidratados. Sin embargo, el filtro de selectividad está tapizado por átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de las cadenas de los aminoácidos que forman la secuencia GYG. Cuando un ión K^+ entra en el filtro de selectividad se deshidrata, y para compensar el coste energético de la pérdida de agua, los átomos de oxígeno entran en contacto con el ión y lo estabilizan. Una vez que los iones K^+ han penetrado en la parte final del poro, la fuerza de atracción entre el ión K^+ y el filtro de selectividad se ve perfectamente compensada por la fuerza de repulsión entre los iones y se produce su rápida salida hacia el espacio extracelular.

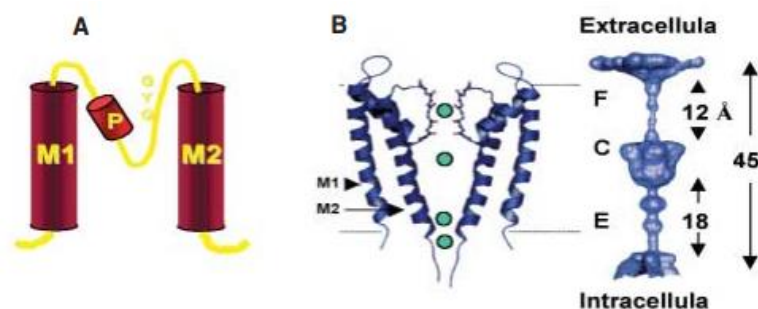


Figura 8. Estructura de la subunidad α del canal KcsA procedente de *Streptomyces lividans*. A) Topografía general, en la que se muestran los dos dominios transmembrana (M1, M2) y el poro (P), así como la secuencia GYG del filtro de selectividad. B) Representación tridimensional del tetrámero del canal KcsA. F, C y E indican, respectivamente, al filtro de selectividad, la cavidad y la entrada interna del canal. (Tomado de Tamargo, J., 2004)

3.4 Ensamblaje de las subunidades α del canal

La región T1 (de tetramerización) que precede al segmento S1 (residuos 83-196) y las cisteínas en posiciones 55, 96 y 505, están encargadas del ensamblaje de las 4 subunidades α para formar homotetrámeros en los canales de las familias *Shaker* y *Shal*, a la vez que impide el ensamblaje heteromérico de las subunidades α de distintas familias. Sin embargo en los canales de las subfamilias HERG y KCNQ serían los segmentos transmembrana más próximos al extremo C-terminal, los implicados en el ensamblaje de las subunidades α .

Gulbis y cols (1999 y 2000) analizaron, con una resolución de 2.1 Å, la interacción citoplasmática entre la subunidad α Kv1.1 de rata y la subunidad Kv β 2.1, en concreto, la región correspondiente a los residuos 36 a 367, es decir, sin el extremo N-terminal. El importante papel de la región T1 en la interacción con la subunidad Kv β 2.1 quedó demostrado al comprobar que su supresión, pero no la del extremo C-terminal, impide el ensamblaje entre ambas subunidades. La estructura de la región central de Kv β 2.1 es un tetrámero, con cada monómero formado por un barril de 90×90×40 Å y un corazón de ocho láminas β paralelas envueltas por hélices- α . La región T1 forma una plataforma de anclaje para la subunidad Kv β 2.1, formándose un complejo T14 β 4 en el que los dominios T1 quedan mirando hacia la boca citoplasmática del poro y la subunidad β hacia el citoplasma. El poro se comunica con el citoplasma a través de unas aperturas laterales cargadas localizadas por encima de dicho complejo.

3.5 Subunidades β

Aunque la expresión heteróloga de las subunidades α es suficiente para generar canales de K⁺ funcionales, para reproducir las características de los canales nativos es necesaria su coexpresión con subunidades β (Hanlon and Wallace, 2002; Pourrier et al, 2003). Algunas subunidades β (Kv β 1-4) carecen de segmentos transmembrana y de puntos de glicosilación, lo que sugiere que se trata de proteínas intracitoplasmáticas (Kv β 1-4), mientras que otras subunidades, codificadas por genes de la familia KCNE (MinK, MirP1) poseen un segmento transmembrana. Otro ejemplo de subunidades β son los receptores para sulfonilureas de los canales Kv6.1 y Kv6.2, que contienen 12 segmentos transmembrana y dos puntos de unión para nucleótidos (Seino and Miki, 2003). La interacción entre las subunidades α y β de los canales *Shaker* implica el dominio N-terminal hidrofílico de la subunidad α y el C-terminal de la β (Hanlon and Wallace, 2002; Pourrier et al, 2003).

Las subunidades Kv β 1.1-1.3, Kv β 2.1 y Kv β 3.1 se unen a las subunidades α de los canales Kv1, mientras que las Kv β 4 se asocian a los canales Kv2 (Hanlon and Wallace, 2002; Pourrier et al, 2003). La subunidad Kv β 1.1 acelera la inactivación tipo-N de los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.4 y la tipo-C del canal Kv1.5 y desplaza la curva de activación hacia niveles más hiperpolarizados de potencial de membrana; las subunidades Kv β 1.2 y Kv β 1.3 aceleran tanto la inactivación tipo N como la C, a la vez que modifican su dependencia de voltaje y la velocidad de deactivación de los canales Kv1.4. La Kv β 2.1 acelera la inactivación de los canales Kv1.4 y Kv1.5 y desplaza la curva de activación hacia niveles más hiperpolarizados.

La estructura de la subunidad Kv β 2.1 ha sido determinada mediante cristalografía de rayos X con una resolución de 2.8Å por Gulbis y cols (1999). Como otras proteínas integrantes de los canales de K⁺, las subunidades Kv β 2.1 son un homotetrámero de oxidoreductasas que contienen un punto activo con actividad catalítica y un cofactor NADPH (adenina nicotinamida adenina dinucleótido reducida). Sin embargo, se desconoce el sustrato específico del sitio activo de la subunidad β , su función biológica y la estequiometría α/β en los distintos canales Kv. Además, dichos autores proponen que la subunidad β podría funcionar como un sistema óxido-redox del canal de K⁺, de tal forma que la apertura-cierre del mismo podría estar regulado por transiciones NADPH-NADP⁺, lo que concuerda con el hallazgo de que la coexpresión de canales Kv con subunidades β confiere sensibilidad al O₂ (Pérez-García, et al 1999).

Las subunidades Kv β 1.1, Kv β 2.1 y Kv β 4.1 pueden actuar como chaperonas, facilitando el ensamblaje de las subunidades α y β y su tráfico hacia la superficie, facilitando la expresión de las subunidades α en determinados puntos de la membrana en los que se unen a una superfamilia de proteínas que presentan dominios PDZ y SH3 (Shi et al, 1996). Las subunidades KChIPs (Kv Channel Interaction Protein) regulan la función y expresión de los canales que generan corrientes transitorias sensibles a 4-aminopiridina (Kv2.1, Kv1.3 y Kv4.3) y la subunidad KChAP (K⁺ Channel Associated Protein) regula las de los canales Kv1.3, Kv2.1 y Kv4.3 (Kuryshv et al, 2000).



4. El canal de potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA

El fortuito descubrimiento del gen del canal de potasio, *kcsA*, en *Streptomyces lividans* (Apéndice 1) permitió la purificación (Schrempf et al, 1995), reconstitución funcional (Schrempf et al, 1995; Cuello et al, 1998; Heginbotham et al, 1999) y cristalización (Doyle et al, 1998; Zhou et al, 2001) de la proteína tetramérica que comparte las características electrofisiológicas y estructurales generales de los canales de potasio. Siendo un canal fácilmente reconstituible *in vitro*, KcsA es actualmente el sistema modelo (Durell y Guy, 1999) que mejor se adapta para elucidar los detalles moleculares de la relación estructura-función de los canales iónicos (Guidoni et al, 1999).

El gen *kcsA* de *Streptomyces lividans* codifica una proteína integral de membrana de 160 aminoácidos con una secuencia similar a todos los canales de potasio conocidos, sobretodo en la región del poro. Los alineamientos múltiples de la secuencia de aminoácidos muestran que *kcsA* tiene una elevada homología con las regiones S5, S6 y H5 de canales de potasio de la familia de los canales de potasio activados por voltaje, principalmente con la subfamilia representada por la proteína *Shaker* de *Drosophila melanogaster* (Schrempf et al, 1995). Por otra parte, la topología transmembrana de KcsA está también relacionada con la subfamilia de los canales eucariotas rectificadores de entrada que tienen una región del poro flanqueada por dos segmentos transmembrana (Schrempf et al, 1995). Además, un aminoácido de glutamato único de la región del poro (P-región) de los rectificadores de entrada se encuentra también en KcsA (E71) (Heginbotham et al, 1998).

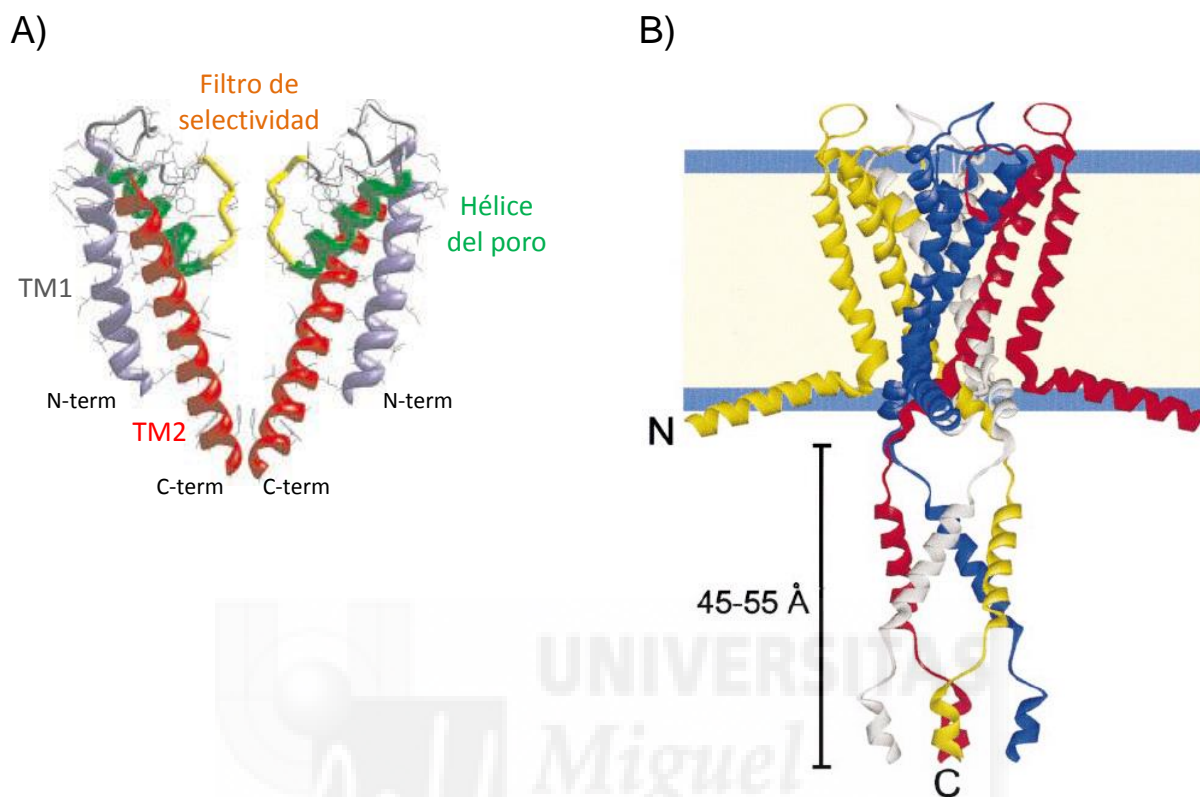
4.1 Estructura general del canal de potasio, KcsA

La determinación de la estructura tridimensional del canal de potasio KcsA, determinada por primera vez por cristalografía de Rayos-X en 1998 por el grupo del Dr. Roderick MacKinnon (PDB 1BL8; Doyle et al, 1998) a una resolución de 3.2 Å, supuso al Dr. MacKinnon la obtención del premio Nobel en 2003. La estructura fue determinada desde el aminoácido 23 al 119, de 160 aminoácidos totales, pero carecía de resolución suficiente para los oxígenos de los carbonilos del filtro de selectividad. Posteriormente, también el grupo de MacKinnon obtuvo la misma estructura cristalográfica a la mayor resolución de 2 Å (PDB 1K4C; Zhou et al, 2001) mediante la utilización de un anticuerpo unido a la región extracelular del canal y, por su parte, el grupo del Dr. Eduardo Perozo obtuvo una estructura del canal completo determinada mediante resonancia de espín electrónico (Cortes et al, 2001).

La estructura cristalizada de KcsA revela que es un canal homotetramérico en el que las cuatro subunidades forman un cono invertido con el filtro de selectividad en la región extracelular. Cada subunidad tiene dos segmentos transmembrana a modo de hélices alfa (TM1 y TM2), que están conectadas por unos 30 aminoácidos que forman la región del poro, que consiste en el lazo extracelular (p-loop), la hélice del poro y el filtro de selectividad, y los segmentos N- y C-terminales en la parte intracelular (Figura 10).

El poro iónico que forma el canal contiene el filtro de selectividad situado en la región más extracelular, con 12 Å de largo y sólo 3 Å de diámetro en su parte más estrecha, mientras que hacia la región intracelular, el poro es más ancho y de paredes hidrofóbicas. La característica más importante de esta estructura es que las cadenas laterales de los aminoácidos que forman el filtro selectivo no están en contacto directo con el paso de los iones, sino que son los oxígenos de los carbonilos del esqueleto

de la proteína los que están expuestos a los iones formando cuatro anillos de oxígenos a lo largo del filtro de selectividad (Figura 11).



4.2 Hidratación/Deshidratación del K⁺ en la entrada extracelular y en la cavidad central

El filtro de selectividad se abre directamente al medio extracelular de tal manera que expone los cuatro átomos de oxígeno del carbonilo de las G79 formando un anillo que rodea el perímetro de la entrada del poro (Figura 11A). Parece evidente que los átomos de oxígeno de los carbonilos de las G79 intervienen en la hidratación y deshidratación de un ión de K⁺ en la entrada extracelular (Zhou et al, 2001).

El filtro de selectividad se continúa en la región intracelular con la cavidad central, una dilatación del poro de conducción de unos 10 Å de diámetro situada a mitad de camino a través de la membrana (Figura 11B). En el centro de la cavidad situada en la entrada intracelular del filtro de selectividad se ha detectado una elevada densidad electrónica correspondiente a un ión de K⁺ hidratado, rodeado por ocho moléculas de agua, cuatro “arriba” y cuatro “debajo” del ión de K⁺ (Figura 11B). Mediante este diseño, la cavidad adquiere una muy alta concentración de K⁺ (2M) en el centro de

la membrana, con el ión K^+ posicionado en el eje del poro, listo para entrar en el filtro de selectividad (Zhou et al, 2001).

El cristal muestra cómo el canal de K^+ desplaza las moléculas de agua alrededor de un ion de K^+ en su entrada extracelular, y cómo el canal sostiene un ion de K^+ en un antiprisma cuadrado de moléculas de agua en una cavidad cerca de su entrada intracelular. Los átomos de oxígeno de los carbonilos del filtro de selectividad forman un antiprisma cuadrado muy similar alrededor de cada sitio de unión de K^+ , como para imitar las aguas de hidratación (Figura 11C). Así, la disposición de ocho átomos de oxígeno que rodean a cada ión de K^+ en el filtro de selectividad se asemeja a la disposición de los ocho átomos de oxígeno del agua alrededor del ión K^+ en la cavidad. En cada caso, el ión K^+ se sitúa cerca del centro de un cubo distorsionado (un antiprisma cuadrado) en el que el plano cuadrado de los átomos de oxígeno de “encima” del ion está rotado con respecto al plano de “abajo” (Zhou et al, 2001).

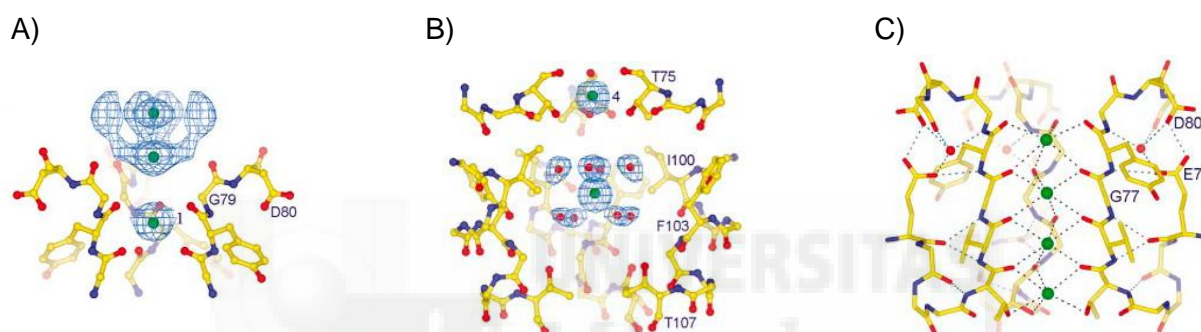


Figura 11. Filtro de selectividad de KcsA. **A)** Densidad electrónica en la entrada extracelular del poro. Los aminoácidos se muestran en forma de palos y bolas y los iones de K^+ como esferas verdes. Se muestra la densidad electrónica del ión K^+ en la posición 1 del filtro de selectividad como referencia. **B)** Vista de un ión K^+ hidratado en la cavidad central. Ocho moléculas de agua (esferas rojas) rodean un ión de K^+ (esfera verde) en la cavidad. Los aminoácidos que forman la cavidad se muestran en forma de palos y bolas. Para mayor claridad, se muestran solo los átomos de la cadena principal y de las cadenas laterales que miran a la cavidad (T75, I100, F103, G104 y T107). **C)** Filtro en elevada concentración de iones K^+ (PDB 14KC). En las tres representaciones, la subunidad más cercana al espectador ha sido eliminada para mayor claridad. (Tomado de Zhou et al, 2001).

4.3 Eficacia y selectividad en la conducción de iones

Tanto la eficacia como la selectividad en el alto flujo de iones a través del canal se pueden entender una vez conocida su estructura.

En cuanto a la eficacia, en ambas superficies interior y exterior de la membrana, se encuentran una serie de aminoácidos cargados negativamente, los cuales presumiblemente aumentan la concentración local de cationes. El camino de los iones comienza en la superficie interna que es un canal ancho lleno de moléculas de agua donde el ion puede retener su esfera de hidratación. Las hélices cortas proporcionan mayor estabilización del catión en esa posición con sus extremos carboxilo terminales apuntando a los iones potasio que se encuentran dentro del canal. Cerca de la región extracelular, el interior del canal se estrecha en la región del filtro de selectividad forzando al ión a separarse de las moléculas de agua que lo hidratan. Los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de la cadena principal en el filtro de selectividad reemplazan a las moléculas de agua en la esfera de

hidratación del K^+ , formando una serie perfecta de esferas de coordinación a través de las cuales se mueve el ión. Los iones pasan a través del filtro en fila individual. Su mutua repulsión electrostática ha de ser posiblemente la causa de su balance de interacción con el filtro de selectividad, manteniendo su rápido movimiento (Zhou et al, 2001).

Y en cuanto a la selectividad, los canales de K^+ son más de 100 veces más permeables al K^+ que al Na^+ y según la estructura cristalizada, este canal no puede ser atravesado por los iones cuando están rodeados de moléculas de agua. El modelo estándar del mecanismo de selectividad que surgió a partir de la obtención de esta estructura fue que el radio de los anillos que forman los oxígenos de los carbonilos del filtro, de sólo 1,5 Å, es precisamente el del radio de hidratación del potasio y que son lo suficientemente rígidos como para reemplazar la capa de hidratación de este ion únicamente, en tanto que un ion más pequeño como Na^+ o Li^+ tendría una barrera energética muy alta al tratar de pasar deshidratados y con una substitución de coordinación muy pobre, y un ion más grande no podría pasar por razones estéricas (Figura 12).

Por tanto, la estabilización preferente del K^+ frente al Na^+ es la base de la selectividad de este filtro por el ión K^+ , apoyado por mutaciones en esta zona que eliminan la selectividad del canal.

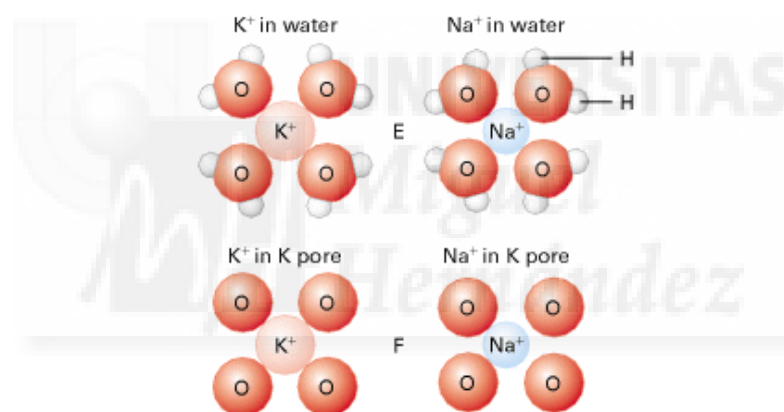


Figura 12. Iones K^+ versus iones Na^+ en el filtro de selectividad de KcsA. Los Iones de potasio, en solución hidratada, pierden sus moléculas de agua unidas a medida que pasan a través del filtro de selectividad, y en su lugar se coordinan con los cuatro oxígenos del carbonilo de la cadena principal, cada uno procedente de una glicina del lazo que alinea el poro del canal de cada subunidad. Los iones de sodio, al ser más pequeños, no pueden coordinarse perfectamente con estos cuatro oxígenos en el filtro y por tanto, sólo esporádicament son capaces de pasar por él. (Adaptado de C. Armstrong, 1998).

Pese a su simplicidad estructural, ha surgido una gran controversia en la bibliografía acerca de su caracterización funcional, como veremos en el siguiente apartado.

4.4 KcsA y MthK representan las estructuras cerrada y abierta de los canales de potasio

La comparación de las estructuras de KcsA, el canal de K^+ de *Streptomyces lividans*, y MthK, el canal de K^+ de *Methanothermobacter thermautotrophicus*, muestra que las hélices intracelulares de MthK se doblan en un punto bisagra (bisagra de “gating”) justo debajo de filtro de selectividad abriendo el vestíbulo intracelular hasta un diámetro de unos 12 Å en su punto más estrecho (A88 en MthK y G104 en KcsA). La bisagra de “gating” corresponde a la G83 en MthK y G99 en KcsA y constituye un aminoácido extremadamente conservado a lo largo de la evolución (Figura 13). El grupo de MacKinnon

(Jiang et al, 2002) observó una elevada homología en la región de las hélices intracelulares justo debajo del filtro de selectividad, en canales procariontes, en canales eucariotes, en canales con dos o con seis segmentos transmembrana por subunidad, en canales activados por ligando, o activados por voltaje, e incluso en canales activados por nucleótidos cíclicos (CNG; Figura 13). Por ello, se ha aceptado en la comunidad científica que KcsA y MthK representan las estructuras cerrada y abierta de los canales de potasio, respectivamente.

Posteriormente, se cristalizó KcsA con las hélices intracelulares abiertas, pero contenía el filtro colapsado, mostrando una conformación abierto-inactivado (Cuello et al, 2010). Otras estructuras cristalizadas muestran el canal atrapado en conformaciones parcialmente abiertas, con las hélices intracelulares en diferentes grados de apertura en el rango de 12 Å hasta 32 Å (medido entre los carbonos α de T112 de subunidades opuestas), pero las estructuras cristalizadas muestran que conforme se abren las hélices intracelulares, el filtro se colapsa en conformación no conductora que indica que el canal está inactivado (Cuello et al, 2010).

Estudios de mutagenesis indican que en los canales de K^+ eucariotes activados por voltaje existe un sitio conservado adicional por donde la hélice intracelular también se dobla. El sitio es la secuencia PVP, que no existe en KcsA ni en MthK (del Camino et al, 2000). Todo indica que la mecánica de la apertura del poro está conservada en los diferentes canales de K^+ , con muy diferentes estructuras, tales como los sensores de voltaje transmembrana o los dominios de unión a ligandos intracelulares, que tienen que adaptarse mecánicamente al poro de modo que puedan ejercer una fuerza lateral sobre las hélices intracelulares (Jiang et al, 2002).

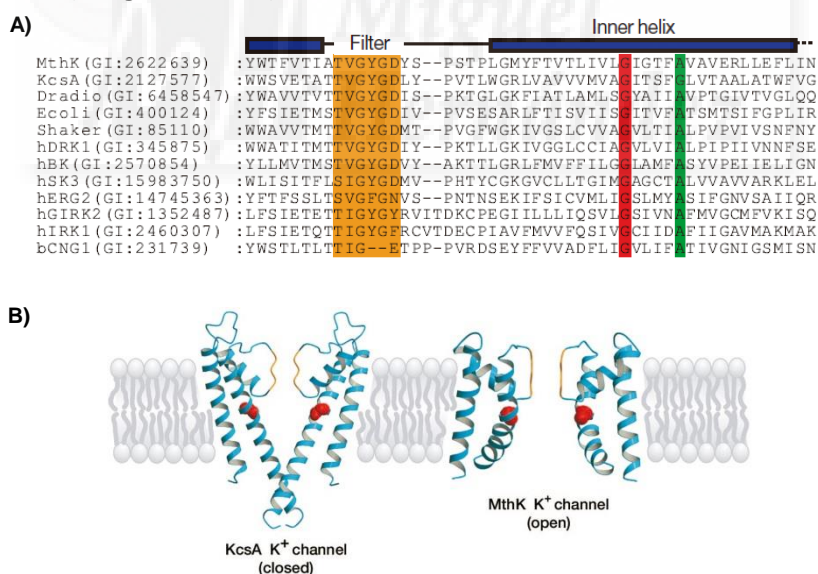


Figura 13. Conservación de la bisagra de "gating" en diferentes canales iónicos. A) Secuencia de aminoácidos de las hélices intracelulares de varios canales de potasio y un canal CNG. El filtro de selectividad aparece en naranja, la bisagra de "gating" en rojo, y el aminoácido en el punto más estrecho del vestíbulo intracelular de MthK en verde. MthK, canal de K^+ de *M. thermotrophicus*; KcsA, canal de K^+ de *Streptomyces lividans*; Dradio, canal de K^+ de *Deinococcus radiodurans*; Ecoli, canal de K^+ de *Escherichia coli*; Shaker, canal de K^+ de *Drosophila melanogaster*; hDRK1, canal de K^+ de *Homo sapiens*; hBK, canal BK de *H. sapiens*; hSK3, canal SK de *H. sapiens*; hERG2, canal de K^+ de *H. sapiens*; hGIRK2, canal de K^+ activado por proteína G de *H. sapiens*; hIRK1, canal de K^+ de *H. sapiens*; bCNG1, canal activado por nucleótidos cíclicos de *Bos taurus*. Entre paréntesis se indican los números ID de cada proteína (Tomado de Jiang et al, 2002). **B)** Estructuras en conformación abierta y cerrada del poro del canal de potasio. La conformación cerrada la representa el canal de potasio bacteriano KcsA (dos subunidades; Doyle et al, 1998), y MthK (dos subunidades; Jiang et al, 2002) representa una conformación abierta. Se muestra el filtro de selectividad en naranja y la hélice externa (M1) se dispone adyacente a la bicapa lipídica. En la hélice interna (M2) se destaca en rojo la glicina que actúa de bisagra para la flexión del M2 en la conformación abierta (Tomado de Yu y Catterall, 2004).

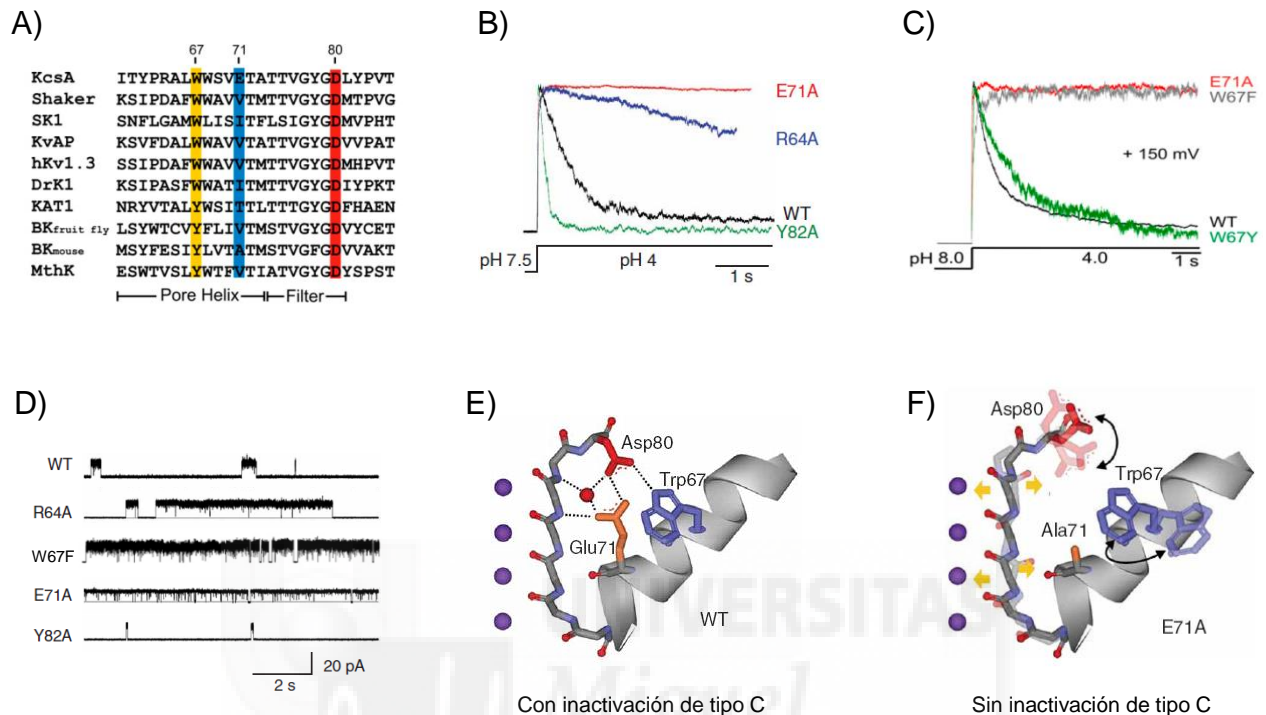
4.5 Las dos puertas de conducción de los canales iónicos

Es conocida la existencia de dos puertas de conducción de iones en la mayoría de los canales: la puerta intracelular, que en el canal de potasio KcsA se abre bajo acidificación del medio intracelular, y la puerta extracelular conformada por el filtro de selectividad y la cara extracelular del canal, que controla la probabilidad de apertura de los canales (Meuser et al, 2001; Blunck et al, 2006; Cuello et al, 2010). El movimiento de la puerta intracelular se ha relacionado con los cambios conformacionales descritos en los canales dependientes de voltaje y los rectificadores de entrada mediante métodos indirectos y pueden correlacionarse con las conformaciones abiertas observadas en las estructuras cristalizadas de MthK y KvAP (Cordero-Morales et al, 2006a). Además, las estructuras de MthK y KcsA se correlacionan bien con las estructuras cristalizadas de las conformaciones abierta y cerrada del canal NaK, respectivamente (Alam y Jiang, 2008). Sin embargo, la espectroscopía de EPR demuestra que la puerta intracelular se abre al máximo a bajo pH independientemente de la magnitud de la probabilidad de apertura de canal único, implicando que la apertura y cierre de los canales en estado estacionario se origina principalmente por reorganizaciones en el filtro de selectividad (Cordero-Morales et al, 2006a).

En KcsA, la activación de la puerta intracelular por acidificación está seguida de un proceso de inactivación similar a una inactivación de tipo C (Cordero-Morales et al, 2006a). La inactivación de tipo C está gobernada por una red de puentes de hidrógeno formada por la triada W67-E71-D80, que ejerce un papel crítico en la dinámica y estabilidad conformacional del filtro de selectividad. Así, se han identificado tres mutantes del p-loop: R64A, E71A y Y82A, que afectan principalmente a la inactivación de tipo C modificando la probabilidad de apertura de KcsA en estado estacionario (Meuser et al, 2001; Cordero-Morales et al, 2006a). La inactivación se elimina por la mutación E71A en la hélice del poro, y dos estructuras cristalizadas de KcsA E71A obtenidas a 2,5 Å han revelado grandes movimientos estructurales del filtro de selectividad durante la conducción de iones, proporcionando una foto instantánea del rango de conformaciones posibles en esta región del canal durante su apertura y cierre. Una estructura es bastante similar a KcsA original, mientras que la otra muestra cambios conformacionales en tres regiones del poro: el esqueleto carbonado del filtro de selectividad, el D80 en la boca extracelular del poro, y el W67 en la hélice del poro (Figura 14; tomada de Cordero-Morales et al, 2006a). Estos datos permiten explicar un posible mecanismo de acción de la mutación E71A en la estabilización del estado abierto. Así, en el canal original (Figura 14, izquierda, tomada de Cordero-Morales et al, 2006a), la interacción entre D80 y W67 desestabiliza la conformación conductiva del filtro y promueve la inactivación a través de un mecanismo todavía desconocido. La eliminación del carboxilato D80-E71 en el mutante E71A (Figura 14, derecha) causa un incremento en la dinámica de D80 y perturba la interacción D80-W67. Esto reduce fuertemente la entrada en el estado inactivado, estabilizando el estado abierto (ver Figura 14, tomada de Cordero-Morales et al, 2006a). También, la entrada en el estado inactivado de tipo C se ha relacionado con la fuerza de la interacción por puentes de hidrógeno entre E71 y D80 detrás del filtro de selectividad, y se desencadena de forma alostérica por la reorganización de la puerta intracelular.

Además, el puente de hidrógeno entre el W67 y D80, conservado en la mayoría de los canales de K⁺, constituye otra interacción crítica que determina la tasa y extensión de la inactivación de tipo C. La ruptura de la interacción equivalente en *Shaker* (W434-D447) y en Kv1.1 (W366-D379) modula el

proceso de inactivación, lo que sugiere que estos aminoácidos juegan un papel análogo en los canales de potasio activados por voltaje. Por tanto, la triada W67-E71-D80 ejerce un papel crítico en la dinámica y la estabilidad conformacional del filtro de selectividad y podría servir como un modulador general de la apertura y cierre del filtro de selectividad en otros miembros de la superfamilia de los canales de K⁺.



4.6 Controversia en la caracterización previa de la actividad del canal de potasio KcsA

La bibliografía previa de la caracterización funcional de las propiedades de canal único del canal de potasio KcsA está rodeada de controversia, por discrepancias todavía sin explicar, de forma que unos grupos de investigación han obtenido resultados aparentemente contradictorios a los obtenidos por otros grupos de investigación. Así, contrasta significativamente lo obtenido por el grupo de la Dra. Hildgund Schrepf (Meuser et al, 1999) frente a lo obtenido por el grupo del Dr. Christopher Miller (LeMasurier et al, 2001) (Tabla 1).

La primera caracterización funcional de KcsA fue realizada por el grupo de la Dra. Schrepf (Meuser et al, 1999) tras aislar y purificar el canal por primera vez (Schrepf et al, 1995) y tras

obtenerse su primera cristalización en 1998, cuya estructura permitió describir las propiedades de permeación y selectividad iónica de los canales de potasio, motivo por el cual se otorgó el premio Nobel al Dr. Roderick MacKinnon en 2003 (Doyle et al, 1998). Mediante la reconstitución del canal en membranas de asolectina a una ratio molar L/P de 2500, el grupo de la Dra. Schrempf describe KcsA como un canal cuya apertura requiere la presencia de Mg^{2+} y pH ácido intracelular. Describen subestados en las aperturas y una alta probabilidad de apertura, así como una moderada selectividad por iones de K^+ , obteniendo una ratio de permeabilidad K^+/Na^+ de 11. Además del sodio, detectaron que también pasaba por el filtro de selectividad los cationes divalentes Mg^{2+} and Ca^{2+} , así como el amonio, metil-, dimetil-, y trimetilamonio, siendo bloqueado por tetrametilamonio, lo que permitió estimar el diámetro del poro del canal abierto en unos 6 Å, mayor que el cristalizado, cuyo diámetro mínimo es de unos 2 Å. Esto implica que los iones de K^+ no deben perder su esfera de hidratación y deducen que deben permear por el filtro de selectividad rodeados de unas 6 moléculas de agua. Concluyen que el poro debe tener cierta flexibilidad, en concordancia con estudios previos de EPR (Perozo et al, 1999), y que sus resultados de canal abierto no pueden ser fácilmente reconciliados con las propiedades deducidas mediante la estructura cristalizada, por lo que concluyen que el cristal debe tener el poro atrapado en su estado cerrado y, por tanto, no puede ser la base para explicar el mecanismo de permeación y selectividad iónica de los canales de potasio.

En cambio, la caracterización funcional realizada posteriormente por el grupo del Dr. Miller (Heginbotham et al, 1999; LeMasurier et al, 2001) contrasta significativamente con lo obtenido por el grupo de la Dra. Schrempf. Mediante reconstitución del canal en membranas de POPE:POPC (75:25) a una ratio molar L/P de 100000 a 250000, el grupo del Dr. Miller describe KcsA como un canal cuya apertura no necesita Mg^{2+} y únicamente requiere pH ácido intracelular. Describen ausencia de subestados en las aperturas y una muy baja probabilidad de apertura, así como una elevada selectividad por iones de K^+ y bloqueo intracelular por los iones Na^+ , Ba^{2+} y Cs^+ , obteniendo una ratio de permeabilidad K^+/Na^+ de 150. Describen ésta y otras propiedades análogas a las encontradas en muchos canales de K^+ eucariotas estudiados por métodos electrofisiológicos y, contrariamente al grupo de la Dra. Schrempf, establecen KcsA como un fiel modelo estructural para la permeación iónica de los canales de K^+ eucariotas.

Posteriormente, sin embargo, se observó que KcsA se abre también a pH neutro cuando se somete a un gradiente de K^+ hacia el exterior (Zakharian y Reusch, 2004-a). Además, se ha propuesto que una versión más "fisiológica" de KcsA podría corresponder a un complejo conductor supramolecular en el que el canal coensambla con polihidroxitirato y polifosfatos inorgánicos (Zakharian y Reusch, 2004-b), que son materiales abundantes de reservorio en muchos organismos procariontes.

A pesar de que las discrepancias anteriores nunca han sido explicadas completamente, se ha aceptado de forma generalizada que KcsA se comporta como un canal selectivo de K^+ , moderadamente voltaje-dependente, con una característica muy baja probabilidad de apertura y la peculiar propiedad de apertura a pH ácido intracelular.

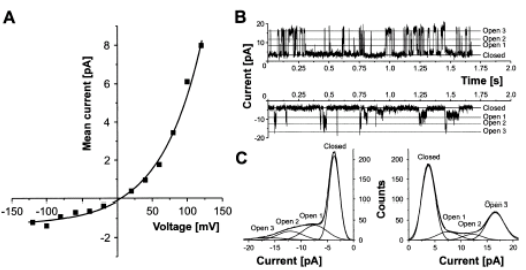
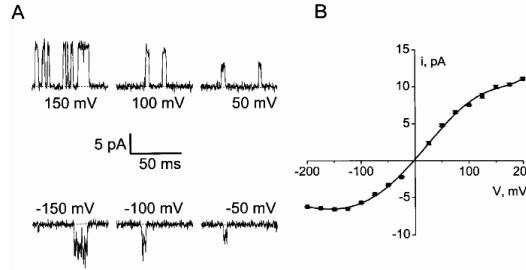
Grupo de la Dra. Schrempf	Grupo del Dr. Miller
 <p style="text-align: center;">Meuser, et al, 1999</p>	 <p style="text-align: center;">LeMasurier, et al, 2001</p>
<ul style="list-style-type: none"> -Bicapas planas de asolecina (ratio molar L/P 2500). -Apertura inducida por pH ácido intracelular y Mg^{2+}. -Muestra aperturas con 3 subestados, de conductancias: 20, 40 y 90 pS a +100mV. -Alta probabilidad de apertura: 0.45 a +100mV; 0.43 a -100mV. -No se bloquea por sodio intracelular; $P_{K^+}:P_{Na^+} = 11$ -Los cationes bivalentes Mg^{2+} and Ca^{2+}, así como el amonio, metil-, dimetil-, y trimetilamonio pasan el filtro de selectividad, siendo bloqueado por tetrametilamonio. -El canal abierto tiene un diámetro de 5,8 Å. -Concluyen que la estructura cristalizada de KcsA (Doyle et al, 1998) corresponde al estado cerrado y, por tanto, no puede ser la base para explicar el mecanismo de permeación y selectividad iónica de los canales de potasio. 	<ul style="list-style-type: none"> -Bicapas planas de POPE:POPG (75:25; ratio molar L/P 100000-250000). -Apertura inducida únicamente por pH ácido intracelular. -Muestra aperturas sin subestados. Conductancias de cuerda de 56 pS a +200 mV y 31 pS a -200mV. Conductancia de la pendiente a 0 mV de 97 pS. -Muy baja probabilidad de apertura: cercana a cero. -Se bloquea por sodio intracelular; $P_{K^+}:P_{Na^+} \approx 150$. -La secuencia de selectividad en soluciones simétricas otorga mayor conductancia al K^+: $K^+ > Rb^+, NH_4^+, TI^+ \gg Cs^+, Na^+, Li^+$ -Los potenciales de inversión en soluciones biiónicas muestran una mayor competencia del Tl^+ frente al K^+: $Tl^+ > K^+ > Rb^+ > NH_4^+ \gg Na^+, Li^+$ -Concluyen que la estructura cristalizada de KcsA (Doyle et al, 1998) sí sirve para explicar el mecanismo de permeación y selectividad iónica de los canales de potasio.

Tabla 1. Controversia en la bibliografía previa de la caracterización funcional de KcsA. Características funcionales principales de KcsA obtenidas por el grupo de la Dra. Schrempf (izquierda) versus las obtenidas por el grupo del Dr. Miller (derecha).

5. Los canales iónicos como dianas farmacológicas

La neuromodulación es de una importancia crítica en el control de los comportamientos complejos en diversos organismos. Dado que los canales iónicos son moléculas clave que intervienen en la neuromodulación, es de importancia fundamental entender los mecanismos moleculares que están detrás de la modulación de los canales iónicos neuronales y cómo dicha modulación llega a cambiar la fisiología y comportamiento neuronal. Se ha demostrado que cambios en la excitabilidad de la membrana mediada por canales iónicos están detrás de muchas condiciones fisiológicas y patofisiológicas, pero cómo son integrados esos cambios a nivel de sistemas permanece como una importante meta a revelar en el futuro.

Hace unas cinco décadas, los canales iónicos no eran más que una hipótesis. Hoy, los canales iónicos están bien establecidos como elementos fundamentales de la excitabilidad de la membrana. La transición desde una mera descripción convincente de entidades que controlan el transporte pasivo de iones a través de la membrana hasta su comprobación indiscutible se produce a través de varios tipos de investigación pionera. Tras la identificación y caracterización histórica de las conductancias de sodio y potasio dependientes de voltaje por Hodgkin y Huxley, la caracterización por biología molecular, farmacológica y electrofisiológica llevó a la identificación de moléculas especializadas llamados canales iónicos. Los canales iónicos son una clase ubicua de proteínas de membrana especializadas que forman poros en la membrana plasmática permitiendo el movimiento de iones a través de la membrana, y por tanto, contribuyen a la actividad eléctrica de neuronas individuales y a la comunicación entre ellas. La transferencia de dicha información en y entre neuronas, mediada por canales iónicos, es esencial para la función cerebral y el control del comportamiento.

En la actualidad, se acepta ampliamente que los canales iónicos están sujetos a una regulación estrecha. La apertura y cierre de los canales iónicos está influenciada por varios factores como el voltaje de la membrana, ligandos extracelulares (ej, neurotransmisores), mensajeros intracelulares (ej, calcio y nucleótidos cíclicos) y modificaciones postraduccionales del propio canal. Los canales iónicos pueden estar regulados también por una o más moléculas de señalización, que pueden modular las propiedades del canal por asociación directa con el canal, o a través de proteínas auxiliares (como quinasas o fosfatasa, subunidades β , la calmodulina (CAM), proteínas citosólicas 14-3-3, proteínas de anclaje a quinasas (AKAPs), receptores acoplados a proteínas G, Ca^{2+} intracelular, lípidos como PIP_2 , etc. Las proteínas que se asocian con los canales pueden coexistir constitutivamente con el canal o pueden unirse al canal en una forma regulada dinámicamente. Esta asociación puede llevar a cambios en el gating del canal, en su ensamblaje o tráfico, o en la respuesta del canal a cambios en los eventos de señalización celular. Estas influencias moduladoras pueden, en efecto, ajustar con precisión la actividad de los canales para satisfacer las necesidades de la célula.

El análisis de la clasificación molecular de las dianas de los fármacos muestra que todos los fármacos conocidos de administración oral únicamente se unen a unas 500 dianas moleculares distintas (Drews, 2000). Sin embargo, sólo un 5% de estas dianas moleculares han sido clasificadas como canales iónicos. Este relativamente bajo porcentaje (comparado p. ej. con enzimas) probablemente resulta de la ausencia de puntos de inicio disponibles para la química médica y de dificultades para configurar cribados relevantes para identificar nuevas series químicas. Los usos de fármacos basados en canales

iónicos cubre muchas áreas terapéuticas, y esto sugiere que hay un considerable potencial para el descubrimiento de fármacos basados en canales iónicos con dianas nuevas y ya existentes.

Dado que el “gating” y la permeabilidad selectiva de los canales iónicos son responsables del mantenimiento del potencial de membrana celular y del control de la excitabilidad celular (Armstrong y Hille, 1998), papel clave en el funcionamiento de todas las células, no es sorprendente que los canales iónicos sean dianas farmacológicas tan importantes (Ashcroft y Röper, 1993). Se estima que aproximadamente 300 subunidades de canales iónicos están codificadas en el genoma humano, dando lugar a muchos más canales funcionales por combinación con varias subunidades auxiliares. Por ejemplo, los canales de potasio, que representan el subgrupo de canales iónicos más grande y diverso, juegan un papel central en la regulación del potencial de membrana de las células (Kaczorowski and Garcia, 1999). En consecuencia, los inhibidores y activadores de canales de potasio ofrecen significativas oportunidades terapéuticas en los sistemas cardíaco, de músculo liso, neuronal, inmune y secretor (Liu et al, 1998).

Un aspecto importante del desarrollo de los canales iónicos como dianas farmacológicas es su capacidad para existir en múltiples estados conformacionales (por ej. abierto, cerrado, e inactivado) y su capacidad de mostrar sensibilidad a los fármacos “dependiente del estado” (Liu et al, 1998). Esta propiedad del bloqueo “dependiente del estado” puede ser explotada terapéuticamente para descubrir fármacos que se dirijan selectivamente a las formas del canal presente bajo condiciones “patológicas”, y que no afecten al canal que funciona normal. Los beneficios de ser capaz de seleccionar moduladores de canales iónicos “dependientes de estado” mediante cribados puede ser de importancia fundamental en el descubrimiento de nuevas químicas médicas y para evitar complicaciones de toxicidad potencial (Gribkoff and Kaczmarec, 2009).

5.1 Canalopatías

Cada vez se conocen más patologías asociadas a la alteración de la función de los canales iónicos, son las llamadas canalopatías. Ejemplos son la epilepsia, dolor neuropático, migraña, sordera, arritmias, etc. Las alteraciones se deben a mutaciones puntuales, deleciones, etc. de los canales de sodio, potasio, calcio y cloruro en distintos dominios de las proteínas (Figura 15).

El conocimiento ya adquirido sobre la etiología de las canalopatías, y el que generaremos en los próximos años, permitirá disponer de métodos de diagnóstico precoz y tratamiento acertado y oportuno, lo que repercutirá en una menor incidencia y gravedad de las crisis sintomáticas asociadas. En principio, la única forma de corregir estas patologías genéticas es a través de la terapia génica, que implica la sustitución del gen mutado por otro nuevo. Ahora bien, mientras esto no sea del todo factible, habrá que recurrir a otros procedimientos para mitigar la gravedad de los síntomas. El diagnóstico precoz permite implantar terapias preventivas; por ejemplo aplicar tratamientos que disminuyan la excitabilidad del SNC ya sea potenciando los sistemas inhibidores o bloqueando los excitadores.

Muchos de los fármacos del mercado ejercen su función modulando los canales iónicos, activándolos o bloqueándolos, y permiten corregir diversas patologías.

El conocimiento más exacto y detallado del funcionamiento de los canales iónicos, así como de las causas que alteran su función y producen patologías, permitirá el diseño de tratamientos mejores y más eficaces que permitan aumentar la calidad de vida.

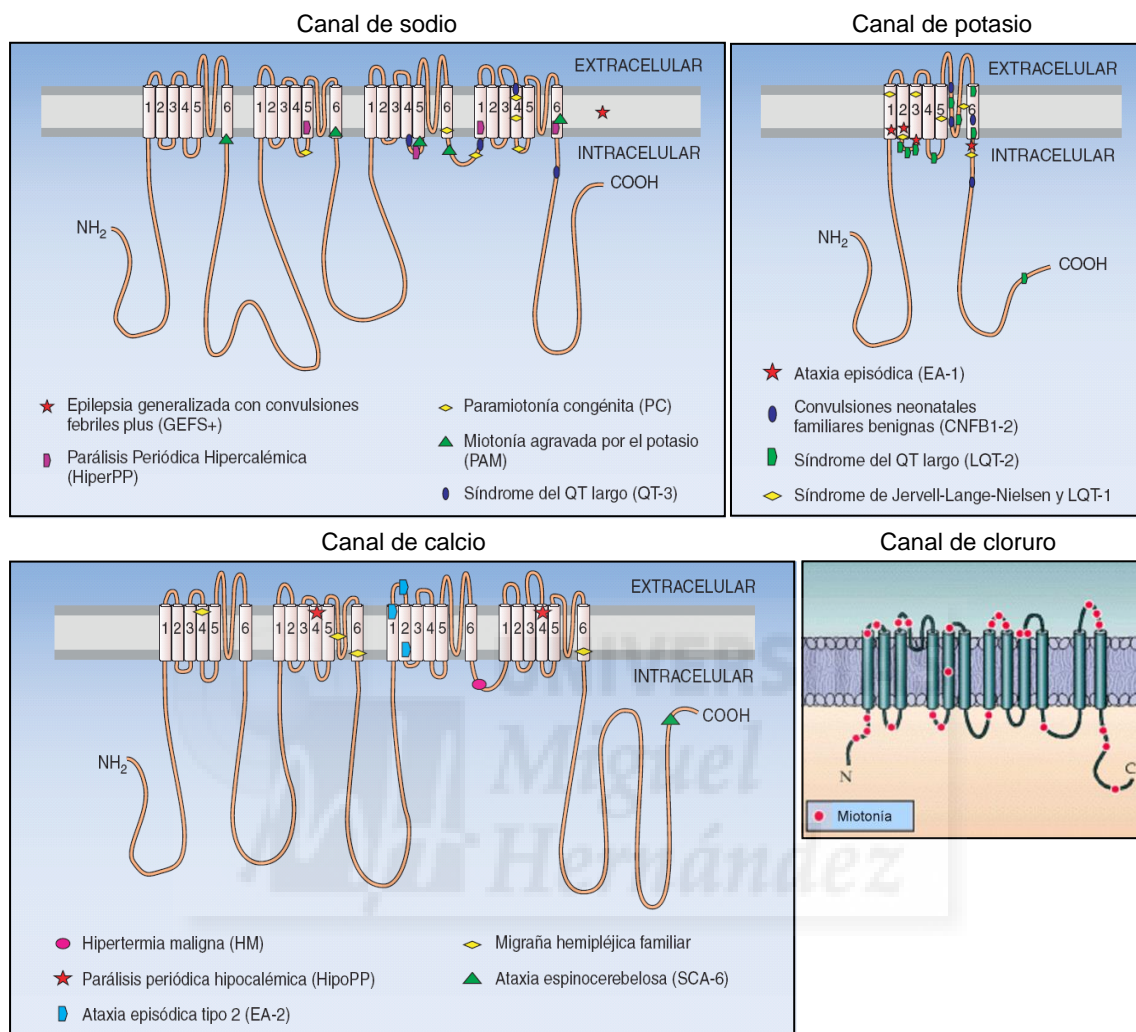


Figura 15. Las mutaciones en los canales iónicos activados por cambios en el voltaje de la membrana son la causa de diversas neuropatías. Las mutaciones en los canales de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ se han detectado en distintos dominios de las proteínas. Queda así reafirmada la observación de la gran heterogeneidad genotípica asociada a una canalopatía. La mayoría de alteraciones de la arquitectura funcional de estas proteínas producen disfunción y patología. (Tomada de Planell-Cases et al, 2005)

6. Métodos de estudio de los canales iónicos

Para el estudio de la actividad de los canales iónicos se han desarrollado diversos sistemas de registro de corriente:

- a) Sistemas nativos: se buscan células que contengan el canal de interés, los otros canales se bloquean farmacológicamente.
- b) Sistemas de expresión heteróloga: se buscan células que no contengan el canal de interés, y éste se sobreexpresa en ellas.
- c) Sistemas de reconstitución: El canal de interés, previamente expresado y purificado, se reconstituye en membranas artificiales para el registro de su actividad.

En los dos últimos sistemas de registro se necesita disponer del gen correspondiente al canal de interés clonado para expresarlo heterológamente en diferentes células y poder producir la proteína. De esta forma, mediante el estudio de canales iónicos normales y mutados y el empleo de diferentes toxinas se ha podido estudiar la estructura y función de casi todo tipo de canales.

Las estrategias más utilizadas en el laboratorio son los sistemas de expresión heteróloga, y los sistemas de reconstitución, debido a las posibilidades que ofrece de realizar mutagénesis que permiten una mayor versatilidad de los estudios de estructura y función de los canales.

Ejemplos de sistemas de expresión heteróloga son los oocitos de *Xenopus*, donde se inyecta el RNA del gen clonado, o células que pueden ser de mamífero como las HEK 293, donde se transfecta el gen en un plásmido con un promotor que permita una fuerte sobreexpresión del canal.

Ejemplos de sistemas de reconstitución en membranas artificiales, son las bicapas planas o los liposomas gigantes. Esto requiere la expresión y purificación previa del canal de interés y su reconstitución posterior en dichas membranas lipídicas, que imitan a la membrana celular original donde están los canales. Tiene la ventaja sobre los anteriores de que permite modificar la composición lipídica a voluntad. El sistema de reconstitución en liposomas gigantes corresponde al sistema utilizado en la presente Tesis Doctoral.

Para el registro de los canales iónicos se utilizan dos técnicas principales de registro electrofisiológico:

La técnica del "voltage-clamp", fue iniciada por Cole, (1946) y posteriormente desarrollada por Hodgkin y Huxley (1949, 1952) para el estudio de los potenciales de acción. Consiste en mantener fija la diferencia de potencial de la membrana celular (mediante un sistema de retroalimentación), de esta forma midiendo la corriente necesaria para mantener dicha diferencia de potencial, se puede cuantificar el flujo de iones a través de la membrana. Una variante de esta técnica es el "voltage-clamp" de doble electrodo. Esta técnica ha resultado ser extraordinariamente útil para el estudio de los canales iónicos expresados en oocitos de *Xenopus* (Stuhmer 1992, 1998). Se compone como su propio nombre indica de dos electrodos. Uno de ellos mide la diferencia de potencial que hay entre ambos lados de la membrana (electrodo de voltaje) y el otro se encarga de introducir o sacar la corriente necesaria (electrodo de corriente) para que la diferencia de potencial que mide el electrodo de voltaje permanezca constante y sea lo más próxima posible a la que le marca el amplificador (Vcmd).

La técnica de “patch-clamp” fue introducida por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976, para registrar corrientes de canal único de fibras musculares de rana, por lo cual recibieron el Premio Nobel, y después mejorada para registros de parches de membrana excindidos (Hamill et al, 1981). La técnica del “patch-clamp” permite investigar la apertura, cierre de los canales y medir la conductancia de iones en canales iónicos individuales. Al igual que el voltage-clamp, consiste en mantener fija la diferencia de potencial, pero de un pequeño trozo de membrana, de esta forma midiendo la corriente necesaria para mantener dicha diferencia de potencial, se puede cuantificar el flujo de iones a través de dicho trozo de membrana. Se pueden medir corrientes del orden del pA. Se realiza con un único electrodo.

Para medir la corriente de un pequeño parche de membrana se utiliza una pipeta de vidrio limpia con un orificio terminal de una micra de diámetro, que se presiona contra una célula intacta quedando cerrada por adherencia. Una ligera succión da lugar a la formación de un cierre hermético para evitar la pérdida de iones, de modo que la resistencia entre el interior de la pipeta y la disolución externa es de muchos gigaohmios (10^9 ohmios). Este cierre de gigaohmios (llamado gigasello) asegura que la corriente eléctrica que fluye a través de la pipeta sea idéntica a la corriente que fluye a través de la membrana que cubre el extremo de la pipeta. El gigasello permite realizar mediciones de corriente con alta resolución cuando se aplica a través de la membrana un voltaje conocido.

La técnica de "Patch-Clamp" puede utilizarse de formas diferentes, proporcionando distintos tipos de información. El más utilizado es la configuración “inside-out”, en la que queda expuesto al exterior de la pipeta, al baño, lo que antes estaba en el interior celular. Esto se consigue acercando la pipeta a la membrana de interés, succionando un poquito para conseguir el sello de la membrana a la pipeta de “patch” y retirando la pipeta para separar el trocito de membrana. Esta técnica de “patch-clamp” en configuración “inside-out” corresponde a la metodología utilizada en esta Tesis Doctoral para el registro de la actividad de KcsA y sus mutaciones y por ello, a continuación, se procede a describir en detalle dicha metodología.

7. La técnica de Patch-Clamp

Este apartado es una descripción detallada de la técnica de “patch-clamp” y de sus diferentes configuraciones. Toda la información que se describe en este apartado está tomada de las fuentes bibliográficas siguientes: libro “Single-Channel Recording”, de B. Sakmann y E. Neher, 2ª edición; libro “Ion Channels of Excitable Membranes”, de B. Hille, 3ª edición; libro “Molecular Cell Biology”, de Lodish et al., 6ª edición; y libro “Molecular Biology of the Cell”, Alberts et al, 4ª edición.

7.1 La técnica de “patch-clamp” permite medir el movimiento de iones a través de canales iónicos

Alan Hodgkin y Andrew Huxley dilucidaron en 1952 el papel fundamental de los canales iónicos en la transmisión de impulsos eléctricos, donde los canales iónicos permiten el flujo pasivo de los iones a favor de su gradiente electroquímico. Por ello recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1963.

Más tarde, Erwin Neher y Bert Sakmann desarrollaron la técnica de “patch-clamp” que permite investigar la apertura, cierre, y conductancia iónica de un canal iónico individual. Esta metodología permitió la primera demostración de la existencia de canales iónicos selectivos en una membrana biológica, frente a simples poros de membrana (Neher y Sakmann, 1976). El desarrollo de la técnica de patch-clamp revolucionó la electrofisiología hasta el punto de permitir estudiar las proteínas que controlan los flujos iónicos a través de las membranas, y con una sensibilidad tal que incluso permitía estudiar la actividad biológica de una única proteína (Hamill et al., 1981; Hille, 1992). Este hecho supuso la obtención del premio Nobel a sus autores, Neher y Sakmann, en 1992.

Mejoras posteriores han refinado su aplicabilidad a todas las preparaciones biológicas (incluyendo células animales, vegetales, bacterias, levaduras y orgánulos subcelulares). El desarrollo del “gigasello” (Sigworth y Neher, 1980; Neher, 1982) y el desarrollo de varias configuraciones de registro (“cell-attached”, “inside-out”, “outside-out”, “whole-cell”) permitió el registro de parches de la membrana celular, de parches de membrana aislados de la célula, y de registro intracelular (Hamill et al., 1981). Para una revisión extensa ver las lecturas Nobel de Neher (1992) y Sakmann (1992), y otras fuentes como Sakmann y Neher, 1984; Sigworth, 1986; o Neher, 1988. Cada año se publican más de 1000 artículos científicos que emplean la técnica de “patch-clamp” y junto a la biología molecular, la técnica de “patch-clamp” constituye un pilar indispensable de la biología celular. Dada la riqueza y complejidad de la interacción de proteínas entre sí para llevar a cabo las funciones celulares, el uso de la técnica de “patch-clamp” es creciente y cada vez más esencial.

Como se ilustra en la Figura 15, esta técnica mide la corriente eléctrica causada por el movimiento de iones a través de un pequeño parche (“patch”) de la membrana plasmática. El término “clamp” se usa porque se emplea un dispositivo electrónico para mantener o “fijar” (“to clamp”) el potencial de membrana a un valor establecido, mientras se registra la corriente iónica que pasa a través de canales individuales. Así, la técnica de “Patch-Clamp” consiste en mantener fija la diferencia de potencial de un pequeño trozo de membrana. De esta forma, midiendo la corriente necesaria para mantener dicha diferencia de potencial, se puede cuantificar el flujo de iones a través de dicho trozo de membrana (Figura 16).

Esta técnica emplea un único electrodo que simultánea a elevada frecuencia el registro de voltaje (para mantenerlo fijo en el parche de membrana) y el registro de corriente (la inyectada para mantener fijo el potencial de membrana). Sus ventajas con respecto a la clásica de fijación de voltaje con dos electrodos (desarrollada en los años 50 para el estudio de potenciales de acción), son que se puede aplicar a células pequeñas, en las que sería imposible introducir dos electrodos, y que presenta una buena relación señal-ruido, por lo que permite el registro de corrientes del orden de picoamperios (pA) con la ayuda de un amplificador. El electrodo de registro se denomina micropipeta y contiene un filamento de plata (Ag), que se clorura recubriéndolo de una capa de Ag/AgCl; estos iones de Cl son los que se utilizarán para estabilizar y fijar el potencial de membrana.

El primer paso para ejecutar esta técnica es formar un sello de alta resistencia eléctrica entre la membrana celular y el electrodo de registro, para lo cual éste se introduce en el interior de una pipeta de vidrio cuya punta se pule al fuego hasta poseer un diámetro de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$. La pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, con lo que se forma un sello eléctrico de alta resistencia (de unos $50\ \text{M}\Omega$) que asegura que la mayoría de corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medida de corriente. Si la punta de la pipeta mantiene limpia su superficie, la aplicación de una ligera succión o presión negativa en su interior permite conseguir sellos de resistencia aún mayor, del orden de $1\text{-}100\ \text{G}\Omega$, conocidos como gigasellos, que reducen el ruido del registro y evitan el flujo de corriente entre la pipeta y el baño, por lo que se puede fijar el potencial del parche de membrana. Se adquiere así la configuración de célula adherida (o "cell attached").

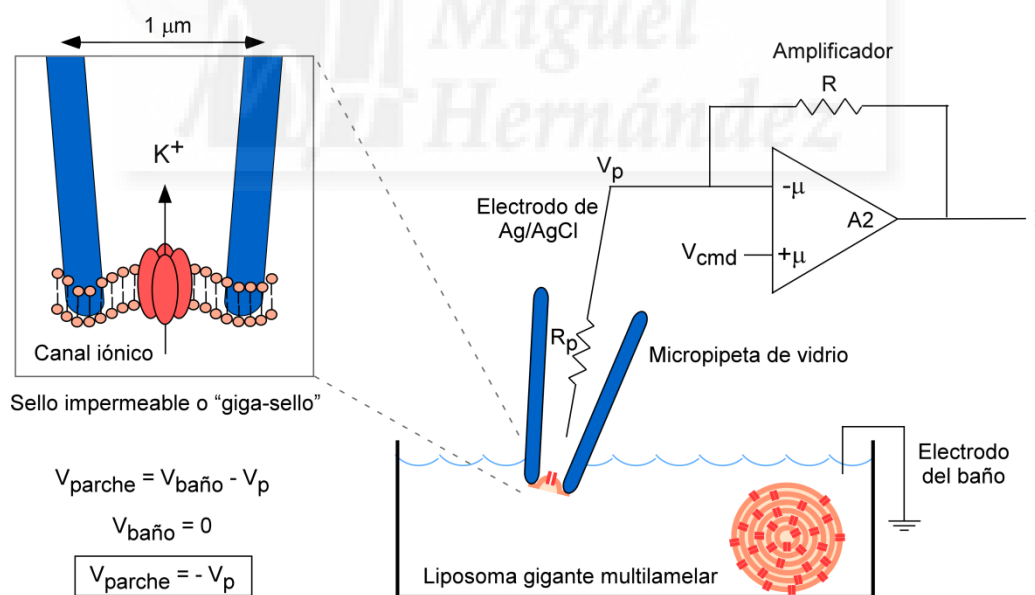


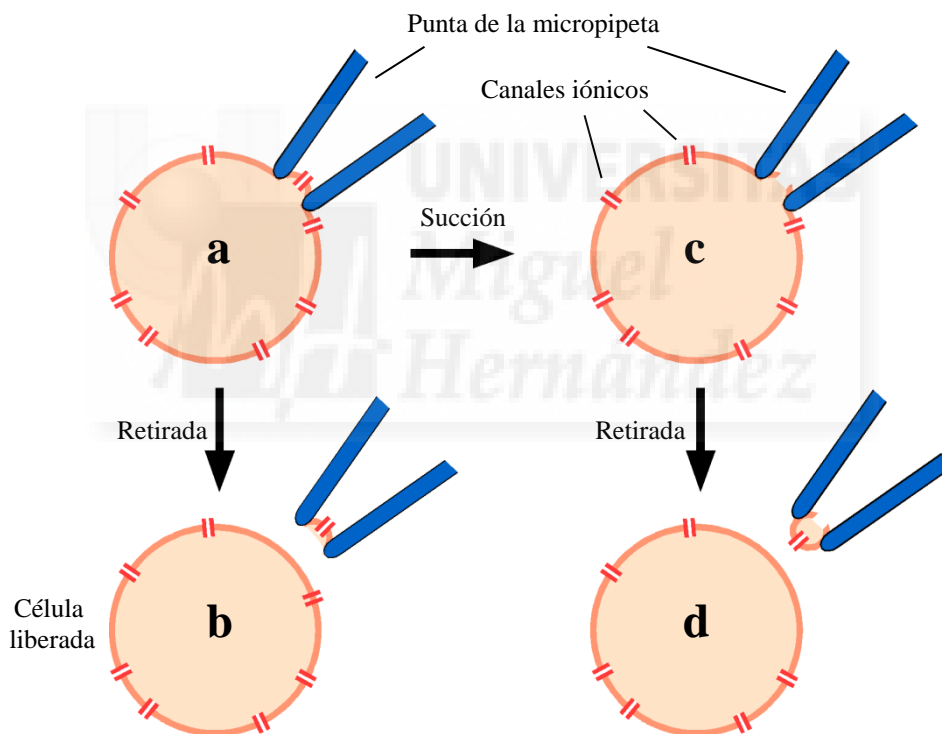
Figura 16. Esquema eléctrico de la técnica de "patch-clamp" en la configuración "inside-out". Esquema del sistema de registro en liposomas gigantes en la configuración "inside-out" usada en esta Tesis Doctoral. Se ha amplificado la zona correspondiente al parche de membrana, que contiene un canal iónico. El sistema se basa en un amplificador diferencial de alta ganancia (A2), el cual mide la diferencia entre el potencial de comando (V_{cmd}) y el potencial de la pipeta (V_p). La salida de A2 se efectúa a través de una resistencia (R) con un valor muy alto, para tener una alta sensibilidad. La salida de A2 corresponde con la corriente (I) necesaria para mantener el potencial del parche de membrana (V_{parche}) igual al de comando. Dicho valor es la corriente que registramos. El potencial de comando ("holding") se aplica al interior de la pipeta, y el baño se mantiene como tierra virtual. En la configuración "inside-out", el potencial del parche de membrana es la diferencia entre el potencial del baño ($V_{\text{baño}}$) y el de la pipeta (V_p). Sin embargo, como el baño está llevado a tierra, su valor de potencial es cero, y por tanto, el V_{parche} corresponde al V_p cambiado de signo.

7.2 Configuraciones de la técnica de "Patch-Clamp"

La técnica de patch-clamp puede ser usada de varias formas, como se muestra en la Figura 17. Todos los métodos empiezan con una pipeta pulida y limpia presionando frente a una célula intacta para formar un gigasello entre la pipeta y la membrana que toca. El registro de corriente a través de los canales puede realizarse con el parche todavía unido al resto de la célula, como en la Figura 17A, o aislado, como en la Figura 17B o 17D. La ventaja del parche aislado es su facilidad para alterar la composición de las soluciones a cada lado de la membrana para comprobar el efecto de diferentes sustancias en el comportamiento del canal. Un parche aislado puede construirse con la orientación opuesta, tal que la superficie citoplasmática de la membrana mira hacia el interior de la pipeta.

A) Configuración "on-cell" o "cell-attached", mide el efecto de sustancias extracelulares en el parche de membrana plasmática todavía unido a la célula.

C) Configuración "whole-cell", mide el efecto de sustancias extracelulares en todos los canales de la membrana plasmática.

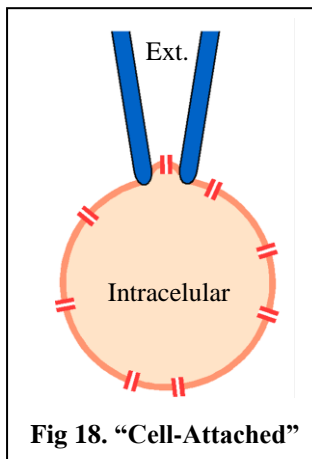


B) Configuración "inside-out", mide el efecto de sustancias intracelulares en los canales del parche aislado.

D) Configuración "outside-out", mide el efecto de sustancias extracelulares en los canales del parche aislado.

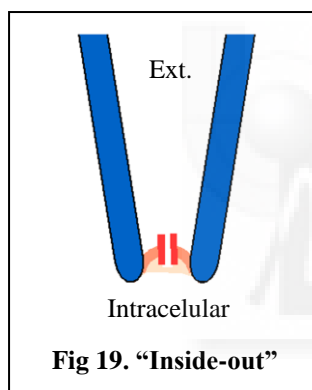
Figura 17. Diferentes configuraciones de patch-clamp. Los efectos de diferentes concentraciones iónicas y otras sustancias en el flujo de corriente de canales individuales hacia el interior y exterior de la célula puede medirse en células intactas o en parches aislados (A, B, D). En la configuración de célula entera (C), el trocito de membrana en el parche se rompe, permitiendo la medida del flujo de corriente a través de todos los canales iónicos. El efecto de diferentes solutos en los canales es estudiado más fácilmente con parches aislados y separados de la célula (B, D). (Adaptado de B. Hille, 1992, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2d ed., Sinauer Associates, p. 89.)

Configuración “sobre la célula” (“cell-attached”o “on-cell”)



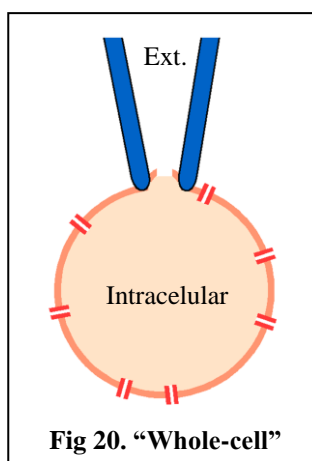
Esta es la técnica más sencilla. Consiste en la realización de un sello con la membrana de la célula (Figura 18). Se usa cuando los canales objeto del estudio requieren factores desconocidos, presentes en el medio intracelular. Es una técnica no invasiva que no altera la célula objeto del estudio. Posee la ventaja de que las medidas se realizan en el entorno fisiológico de los canales. La principal desventaja de esta configuración es que no se puede conocer el potencial de membrana de la célula objeto del experimento. El potencial de membrana de la célula se suma al de la pipeta.

Configuración “interior-fuera” (“inside-out”)



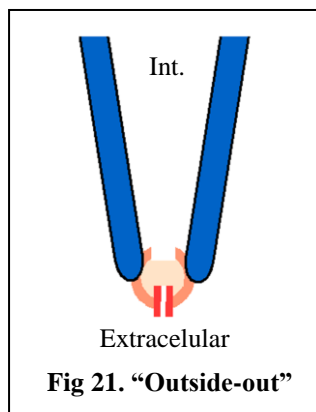
Para obtener esta configuración es necesaria la realización de un sello con la configuración “cell-attached”. Una vez obtenido dicho sello se retira la pipeta con un pequeño trozo de membrana. De esta forma el lado intracelular queda en la parte externa de la pipeta (Figura 19). Esto permite el cambio del medio intracelular. Presenta la ventaja sobre el método anterior de que se conoce la verdadera diferencia de potencial a la que está sometido el parche de membrana. Su principal inconveniente es que la escisión del parche de la membrana de la célula produce la pérdida de importantes factores citosólicos necesarios para el buen funcionamiento de los canales.

Configuración de “célula-entera” (“whole-cell”)



Para llegar a esta configuración se realiza primero un “cell-attached” y posteriormente se aplica presión negativa para romper la membrana que hay bajo los bordes de la pipeta. Esto permite la comunicación entre el interior de la pipeta y el medio intracelular (Figura 20). Con esta técnica se pueden medir corrientes macroscópicas, puesto que se mide la corriente global de la célula. No permite el cambio del medio citosólico pero sí el del medio extracelular. Presenta el inconveniente de que se pierden factores citosólicos. Está técnica no se puede realizar en ovocitos debido a su gran volumen.

Configuración “exterior-fuera” (“outside-out”)



Para lograr esta configuración es necesario el paso por la configuración “whole cell”. Una vez obtenida se retira la pipeta y se aplica presión negativa. Esto provoca que la parte extracelular de la membrana de la célula quede en la parte externa de la pipeta (Figura 21). Se utiliza para la realización de estudios en los que resulte conveniente el cambio del medio extracelular. Presenta el inconveniente de que al igual que en la configuración “inside-out” se pierden componentes del medio intracelular.

7.3 Los registros de “patch-clamp” permiten estudiar las propiedades de los canales iónicos

El movimiento de entrada y salida de iones a través del parche de membrana puede ser cuantificado a partir de la cantidad de corriente eléctrica necesitada para mantener el potencial de membrana al valor fijado. Para conservar la electroneutralidad, cada ión positivo (p.ej., un ión Na^+) que entra en la célula a través de la membrana plasmática es compensado por la entrada de un electrón en el citosol que proviene del electrodo situado en él; el flujo de corriente resultante es medido por un dispositivo de registro electrónico. Por el contrario, el movimiento de cada ión positivo desde la célula (p.ej. un ión K^+) es compensado por la retirada de un electrón del citosol.

Los registros de patch-clamp de la Figura 22 ilustran el uso de esta técnica para estudiar las propiedades de canales iónicos de Na^+ (A) y de K^+ (B) en la membrana plasmática de células musculares. En (A) se muestran dos parches de membrana muscular, cada uno conteniendo un canal de Na^+ activado por voltaje, y fijados al voltaje de 10 mV. Bajo estas condiciones, los pulsos transitorios de corriente que cruzan la membrana provienen de la apertura y cierre de canales de Na^+ individuales (ver Figura 22A). Lo primero que muestran los registros de “patch-clamp” es que los canales individuales se abren de la forma “todo o nada”. Cada canal está abierto o cerrado, no hay cambios de permeabilidad graduales para canales individuales. A partir de estas trazas, es posible determinar el tiempo que estos canales están abiertos (sobre 0.7 ms) y el flujo iónico a su través (9900 Na^+ ions/ms).

Los registros de corriente de la Figura 22B corresponden a aperturas de canales de K^+ y se pueden observar varias propiedades de los canales activados por voltaje. En el voltaje despolarizante de -10 mV, los canales se abren muy poco frecuentemente y permanecen abiertos sólo durante unos pocos milisegundos, como se observa por el número y anchura, respectivamente de los saltos hacia arriba de las trazas. Además, el flujo iónico a través de ellos es bastante pequeño, medido por la corriente eléctrica que pasa a través de cada canal abierto (la altura de los saltos). Despolarizaciones mayores de la membrana, +20 mV y +50 mV, aumentan la frecuencia de apertura de estos canales. Además, a través de cada canal abierto se mueven más iones de K^+ (la altura de los saltos es mayor) porque la fuerza que impulsa los iones de K^+ hacia fuera es mayor en un potencial de membrana de +50 mV que de -10 mV.

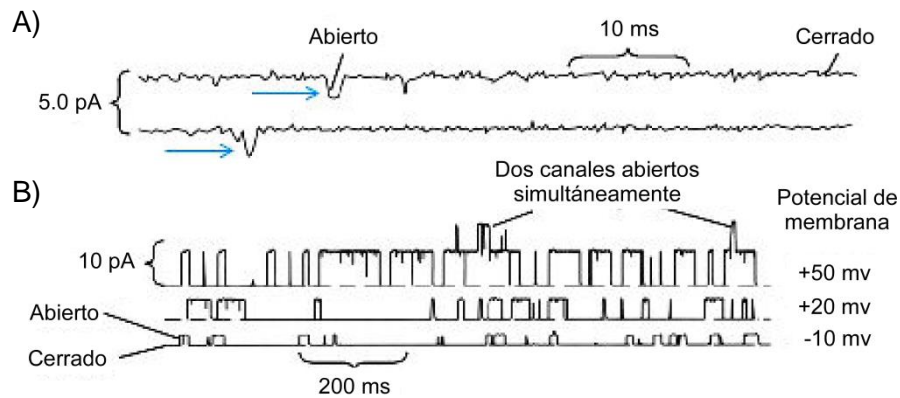


Figura 22. Registros de corriente a través de canales individuales activados por voltaje mediante “patch-clamp” de células musculares. A) Se muestran dos parches de membrana despolarizada a 10 mV. Los impulsos transitorios de corriente eléctrica en picoamperios (pA), registrados como grandes desviaciones hacia abajo (flechas), indican la apertura de un canal de Na^+ y el movimiento de los iones de Na^+ hacia el interior a través de la membrana. Las desviaciones más pequeñas en la corriente representan el ruido de fondo. La corriente promedio a través de un canal abierto es 1.6 pA, o $1,6 \times 10^{-12}$ amperios. Dado que 1 amperio = 1 culombio (C) de carga por segundo, esta corriente es equivalente al movimiento de cerca de 9900 iones Na^+ por canal por milisegundo: $(1,6 \times 10^{-12} \text{ C / s}) (10^3 \text{ s / ms}) (6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas / mol}) \div 96500 \text{ C / mol}$. **B)** Los parches de membrana se fijaron a tres potenciales diferentes, +50, +20 y -10 mV. Las desviaciones hacia arriba en la corriente indican la apertura de canales de K^+ y el movimiento de los iones de K^+ hacia el exterior a través de la membrana. El aumento de la despolarización de la membrana de -10 mV a +50 mV aumenta la probabilidad de apertura del canal, el tiempo que permanece abierto, y la cantidad de corriente eléctrica (número de iones) que pasan a través de él. [(A) Tomado de Sigworth y Neher, 1980; (B) Pallota et al, 1981; Modificado de Hille, 1992, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2d ed., Sinauer Associates, p. 122.]

OBJETIVOS/GOALS





OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es la caracterización de algunos de los mecanismos de modulación de los canales de potasio, proteínas que regulan un amplio rango de procesos fisiológicos y, por ello, importantes dianas farmacológicas. El modelo elegido para ello es el canal de potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA, cuya cristalización motivó la concesión del Premio Nobel al Dr. Roderick MacKinnon. Sin embargo, la caracterización funcional de KcsA ha estado rodeada de cierta controversia y como modelo de referencia, consideramos importante su clarificación. Así, los objetivos desglosados de esta Tesis Doctoral son:

- OBJETIVO 1:** Optimización de la expresión, purificación, reconstitución en lípidos y registro electrofisiológico de KcsA.
- OBJETIVO 2:** Papel del C-terminal en la oligomerización de KcsA. Se explorará la implicación de la región C-terminal de KcsA en la oligomerización de la proteína como requisito necesario para su actividad.
- OBJETIVO 3:** Caracterización de la actividad de KcsA. Se buscarán posibles mecanismos de apertura nativos y alternativos al mecanismo de apertura activado por pH ya descrito.
- OBJETIVO 4:** Modulación de la actividad de KcsA. Se estudiará la modulación de la actividad de KcsA por diferentes agentes. Se estudiará la posibilidad de que el péptido inactivante del canal de potasio *Shaker*, ShB, pueda inactivar a KcsA, dada la su homología con estos canales. Se buscarán nuevos fármacos basados en moléculas capaces de modular la actividad de los canales de potasio de inactivación rápida, potenciales dianas farmacológicas de especial relevancia.

GOALS

The main goal of this PhD Thesis is the characterization of some of the mechanisms of modulation of the potassium channels, proteins that regulate a wide range of physiological processes and, therefore, important drug targets. The model chosen for this is the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans*, whose crystallization led to the Nobel Prize to Dr. Roderick MacKinnon. However, the functional characterization of KcsA has been surrounded by controversy and as a reference model, we consider important its clarification. Thus, the objectives of this PhD Thesis are:

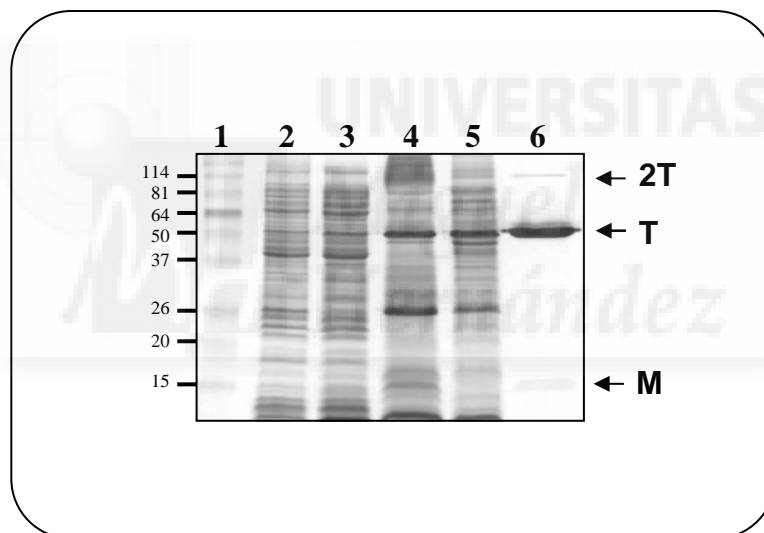
- OBJECTIVE 1:** Optimization of the expression, purification, reconstitution into lipids and electrophysiological recording of KcsA.
- OBJECTIVE 2:** Role of the C-terminal of KcsA on its oligomerization. The involvement of the C-terminal region on oligomerization of KcsA as a prerequisite for its activity will be explored.
- OBJECTIVE 3:** Characterization of the activity of KcsA. We will search possible mechanisms of native KcsA opening, alternative to the pH-dependent mechanism previously described.
- OBJECTIVE 4:** Modulation of the KcsA activity. We will study the modulation of the KcsA activity by different agents. We will examine the possibility that the inactivating peptide of the potassium channel *Shaker*, ShB, could inactivate KcsA, given its homology with that channel. New drugs based on molecules capable of modulating the activity of fast inactivating voltage-gated potassium channels will be searched, as potential drug targets of significant relevance.

PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA





**OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN,
PURIFICACIÓN, RECONSTITUCIÓN EN LÍPIDOS
Y REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE KcsA**





OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN, RECONSTITUCIÓN EN LÍPIDOS Y REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE KcsA

RESUMEN

En este Capítulo se describe la puesta a punto de la metodología principal que fue introducida por primera vez en el laboratorio para la realización de esta Tesis Doctoral. Se comienza desde la recepción del gen *kcsA* clonado en el vector pQE-30, la generación de diversos mutantes, la optimización de la expresión en bacterias y la purificación de la proteína KcsA en un solo paso mediante columnas de afinidad. Se optimiza la digestión de KcsA con quimotripsina para la eliminación de su C-terminal. A continuación, se optimiza la reconstitución de KcsA en vesículas lipídicas de asolectina. Se comprueba la obtención de vesículas grandes unilamelares cerradas, LUVs, en la reconstitución de KcsA, la orientación de la proteína en los LUVs y su incorporación en liposomas gigantes de asolectina para el registro electrofisiológico de su actividad. Finalmente, se optimiza el protocolo de registro, la cantidad de proteína y las composiciones lipídicas para el registro de la actividad de KcsA en liposomas gigantes mediante patch-clamp de parche escindido en configuración "inside-out".

OPTIMIZATION OF THE EXPRESSION, PURIFICATION, RECONSTITUTION INTO LIPIDS AND ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDING OF KcsA

ABSTRACT

This chapter describes the development of the main methodology that was first introduced in the laboratory for conducting this PhD Thesis. The experimental work of this PhD Thesis began with the reception of the *kcsA* gene of *Streptomyces lividans* in our laboratory cloned into the vector pQE-30, kindly provided by Dr. Antonio Ferrer. Next, we performed different mutants, and the optimization of the bacterial expression and purification of the protein KcsA in a single step by affinity columns. We optimized KcsA digestion with chymotrypsin for the removal of its C-terminus. Then, we optimized the reconstitution of KcsA in lipid vesicles of asolectin. We tested the obtention of large unilamellar vesicles, LUVs, in reconstituted KcsA, the orientation of the protein in the LUVs, and their incorporation into giant liposomes of asolectin for recording electrophysiological activity. Finally, we optimized the protocol, i.e. the amount of protein and lipid compositions, for the recording of the activity of KcsA in giant liposomes by patch-clamp in "inside-out" configuration.



OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN, RECONSTITUCIÓN EN LÍPIDOS Y REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE *KcsA*

I Clonación del gen *kcsA* en pQE-30 y generación de mutantes

I.1 Clonación del gen *kcsA* en pQE-30

Esta Tesis Doctoral se inició con la donación a nuestro grupo del gen *kcsA*, de *Streptomyces lividans*, amablemente cedido por los doctores Marco Caprini y Antonio V. Ferrer. El gen *kcsA* está clonado en pauta de lectura en el vector plasmídico pQE-30 (Qiagen), que proporciona resistencia a ampicilina y una cola de 6 histidinas en el amino-terminal de *KcsA*, para su expresión en bacteria como proteína recombinante (Figura 1a).

Se eligió el plásmido pQE-30 como vector debido a la clonación del gen *kcsA* en él obtenida previamente con éxito por el grupo de Schrempf, los primeros en conseguir obtener la proteína funcional después de su expresión, purificación y reconstitución en vesículas lipídicas (Schrempf, H., et al, 1995; Meuser, D., et al, 1999; Splitt, H., et al, 2000).

La secuencia de la proteína *KcsA* expresada por esta construcción consta de un total de 172 aminoácidos (Figura 1b), 160 aminoácidos propios del gen *kcsA* (ver Tabla 2) más 12 aminoácidos que le aporta el vector pQE-30, que incluyen una cola de seis histidinas en el N-terminal de la proteína para permitir su posterior purificación (ver Tabla 3).

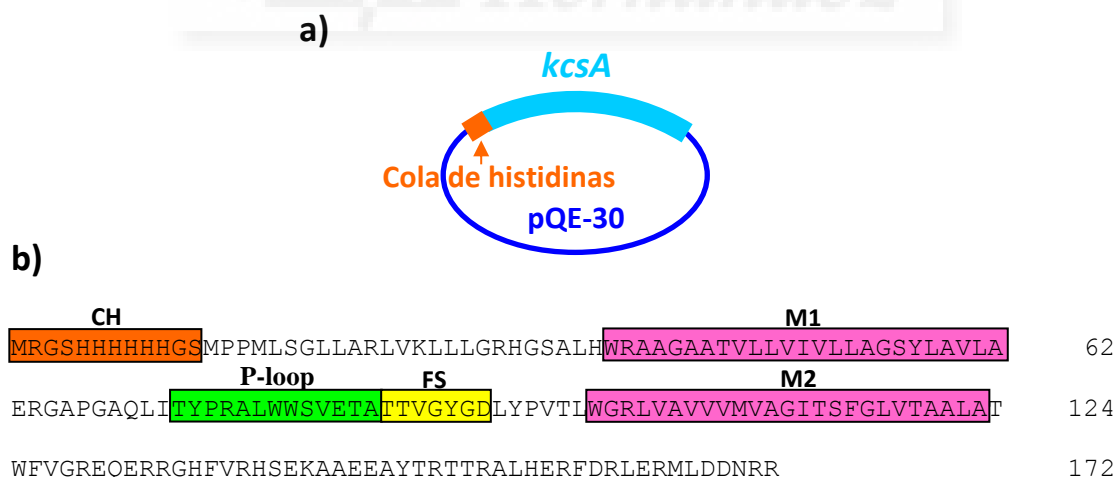


Figura 1. Construcción original de *KcsA*. a) Construcción del gen *kcsA* en el vector pQE-30. Se muestra la cola de histidinas en el extremo N-terminal del gen *kcsA*. b) Secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante *KcsA* codificada por esta construcción. Se destacan las zonas más características de esta proteína. CH, cola de histidinas; FS, filtro de selectividad; M1, segmento transmembrana 1; M2, segmento transmembrana 2; P-loop, hélice del poro.

ATG	CCA	CCC	ATG	CTG	TCC	GGT	CTT	CTG	GCC	AGA	TTG	GTC	AAA	CTG	CTG	CTC	GGG	CGC	CAC	GGC	AGT	GCG	69
M	P	P	M	L	S	G	L	L	A	R	L	V	K	L	L	L	G	R	H	G	S	A	23
CTG	CAC	TGG	AGG	GCC	GCG	GGT	GCC	GCG	ACG	GTC	CTC	CTG	GTG	ATC	GTC	CTC	CTC	GCG	GGC	TCG	TAC	TTG	138
L	H	W	R	A	A	G	A	A	T	V	L	L	V	I	V	L	L	A	G	S	Y	L	46
GCC	GTC	CTG	GCT	GAG	CGC	GGC	GCA	CCG	GGC	GCG	CAG	CTG	ATC	ACG	TAT	CCG	CGG	GCG	CTG	TGG	TGG	TCC	207
A	V	L	A	E	R	G	A	P	G	A	Q	L	I	T	Y	P	R	A	L	W	W	S	69
GTG	GAG	ACC	GCG	ACG	ACC	GTC	GGC	TAC	GGC	GAC	CTG	TAC	CCC	GTG	ACT	CTG	TGG	GGC	CGG	CTC	GTG	GCC	276
V	E	T	A	T	T	V	G	Y	G	D	L	Y	P	V	T	L	W	G	R	L	V	A	92
GTG	GTG	GTG	ATG	GTC	GCC	GGG	ATC	ACC	TCC	TTC	GGT	CTG	GTG	ACC	GCC	GCG	CTG	GCC	ACC	TGG	TTC	GTC	345
V	V	V	M	V	A	G	I	T	S	F	G	L	V	T	A	A	L	A	T	W	F	V	115
GGC	CGG	GAA	CAA	GAG	CGC	CGG	GGC	CAC	TTC	GTG	CGC	CAC	TCC	GAG	AAG	GCC	GCC	GAG	GAG	GCG	TAC	ACG	414
G	R	E	Q	E	R	R	G	H	F	V	R	H	S	E	K	A	A	E	E	A	Y	T	138
CGG	ACG	ACC	CGG	GCG	CTG	CAC	GAG	CGT	TTC	GAC	CGT	TTG	GAG	CGA	ATG	CTC	GAC	AAC	CGC	CGG	TGA	483	
R	T	T	R	A	L	H	E	R	F	D	R	L	E	R	M	L	D	D	N	R	R	stop	160

Tabla 2. Secuencia del gen *kcsA* en oligonucleótidos y aminoácidos. Se muestra desde el primer codón (ATG) del gen *kcsA*, correspondiente a la primera metionina, hasta el codón de stop (secuencia TGA), que termina la traducción de la secuencia en aminoácidos.

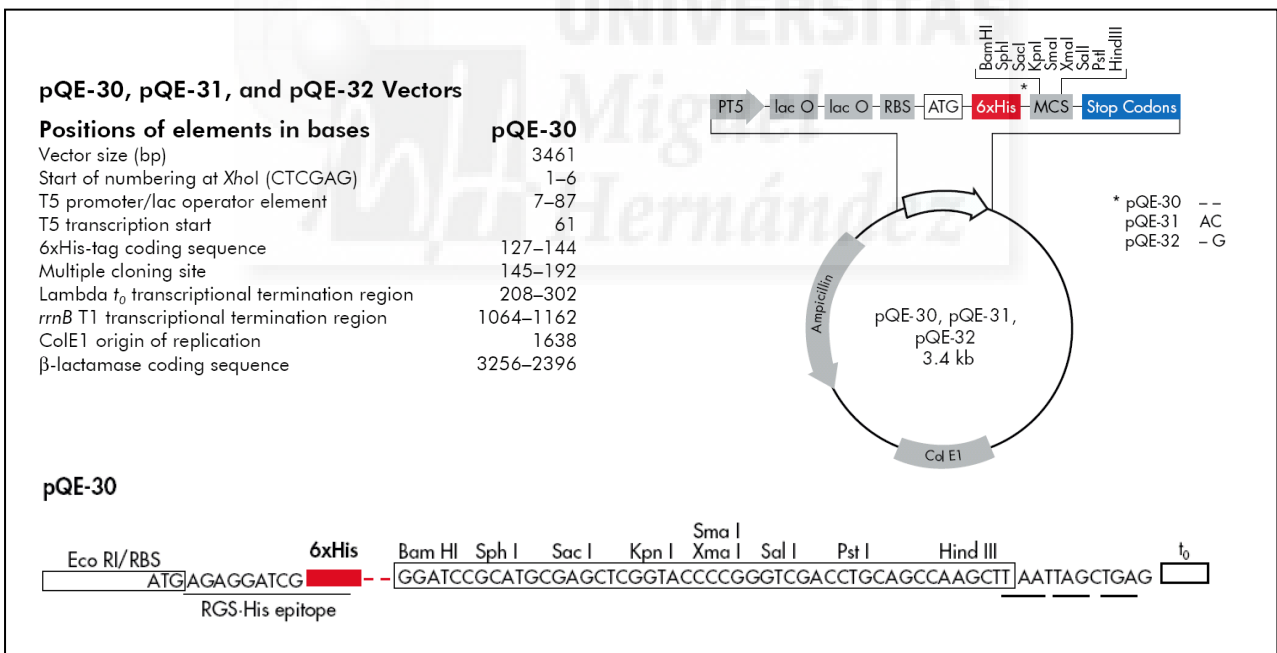


Tabla 3. Esquema del vector pQE-30 (Qiagen). Vector para clonación directa de productos de PCR en un vector de expresión. PT5 = promotor T5; lac O = operador LAC; RBS = sitio de unión del ribosoma; ATG = codón de inicio; 6xHis = cola de 6 histidinas; MCS = sitios de clonación múltiple; Stop Codons = codones de stop en las tres pautas de lectura; Col E1 = origen de replicación Col E1; Ampicillin = gen de resistencia a ampicilina. (Tomado de Qiagen)

1.2 Construcción de deleciones del C-terminal de KcsA: KcsA Δ 154-160, Δ 125-160, Δ 120-160 y Δ 115-160

A partir de la construcción original de KcsA, se realizaron las construcciones delecionadas correspondientes para eliminar los últimos 7, 35, 40 o 45 aminoácidos de su C-terminal, es decir, las deleciones de KcsA Δ 154-160, Δ 125-160, Δ 120-160 y Δ 115-160.

Las deleciones del C-terminal de KcsA se realizaron por inserción de un codón de stop en su secuencia así como los sitios de corte específicos de la enzima de restricción BamHI (5'-GGA TCC) flanqueando la zona C-terminal que se deseaba eliminar, para permitir su extracción mediante corte con dicha enzima y posterior religación del plásmido.

La inserción del codón de stop y de los sitios de corte para BamHI en la secuencia del gen *kcsA* se realizó por PCR inversa. Tras comprobar que el gen *kcsA* original en pQE-30 carecía de sitio de corte para BamHI, se sintetizaron oligonucleótidos (en adelante "cebadores") que contenían dicho sitio de corte, tanto el cebador con sentido (+) como el cebador antisentido (-), y un codón de stop en este último. El cebador con sentido fue el mismo para todas las deleciones. Los cebadores sintetizados se detallan en la Tabla 4.

DELECIÓN	CEBADOR (-)
154-160	5'- <u>GCG GAT</u> <u>GGA TCC</u> <u>TCA</u> TCG CTC CAA ACG GTC GAA ACG pQE-30 BamHI Stop 153 152 151 150 149 148 147
125-160	5'- <u>GCG GAT</u> <u>GGA TCC</u> <u>TCA</u> GTG GCC CCG GCG CTC TTG TTC pQE-30 BamHI Stop 124 123 122 121 120 119 118
120-160	5'- <u>GCG GAT</u> <u>GGA TCC</u> <u>TCA</u> TTG TTC CCG GCC GAC GAA CCA pQE-30 BamHI Stop 119 118 117 116 115 114 113
115-160	5'- <u>GCG GAT</u> <u>GGA TCC</u> <u>TCA</u> GAA CCA GGT CGC CAG CGC GGC pQE-30 BamHI Stop 114 113 112 111 110 109 108
	CEBADOR (+)
TODAS	5'-CGG <u>TGA</u> <u>GGA TCC</u> <u>ATC</u> CGC ATG CGA GCT CGG TAC CCC 160 Stop BamHI pQE-30

Tabla 4. Cebadores utilizados para la construcción de las deleciones. Subrayados se indican los nucleótidos del vector pQE-30, el sitio de corte de BamHI, el codón de stop y los últimos nucleótidos del gen *kcsA* para cada deleción.

Se utilizó la polimerasa de DNA Pfu (Fermentas) para amplificar el plásmido entero de la construcción del gen *kcsA* en el vector pQE-30 por PCR inversa, insertándose un codón de stop detrás del último aminoácido que se deseaba fuera traducido (Figura 2):

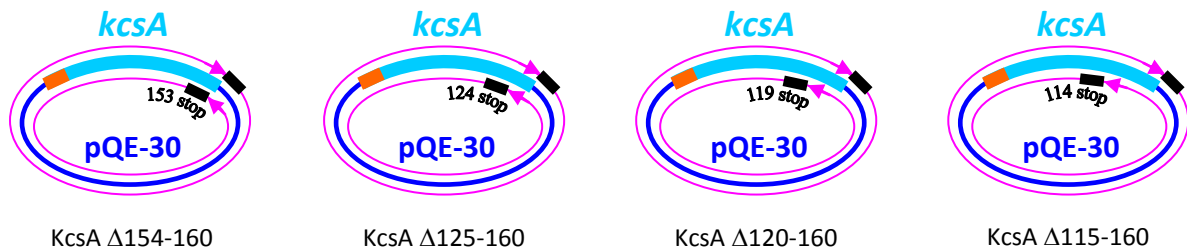


Figura 2. Esquema de la PCR inversa realizada para cada deleción. Se señala el sentido de la amplificación y la posición de los cebadores. ■ = cebador; → = sentido de la amplificación.

Los productos de la PCR se precipitaron con fenol/clorofórmico, se digirieron con BamHI (Fermentas), se purificaron y se religaron con la T4 DNA ligasa (Roche Diagnostics). Un ejemplo del procedimiento se muestra en la Figura 3:

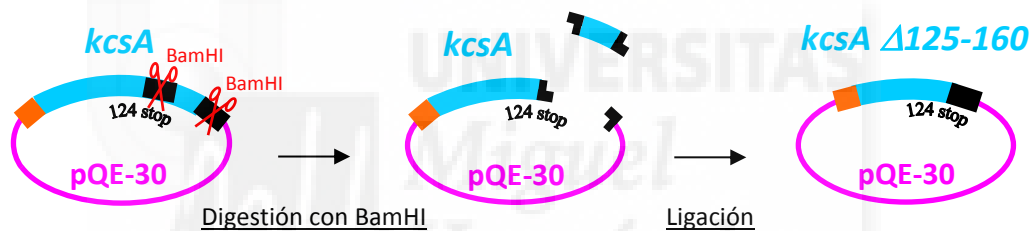


Figura 3. Esquema de la digestión con BamHI y religación del plásmido para el ejemplo de *KcsA* Δ125-160.

Las deleciones se chequearon transformando las ligaciones en células XL1-blue, tras la eliminación de los plásmidos parentales mediante corte con DpnI. De la placa sembrada de la transformación de cada deleción se seleccionaron 12 colonias que se extendieron en otra placa y, de las cuales, se inocularon algunas en medio LB para crecerlas y chequear el contenido plasmídico mediante una extracción rápida, como se representa en la Figura 4.

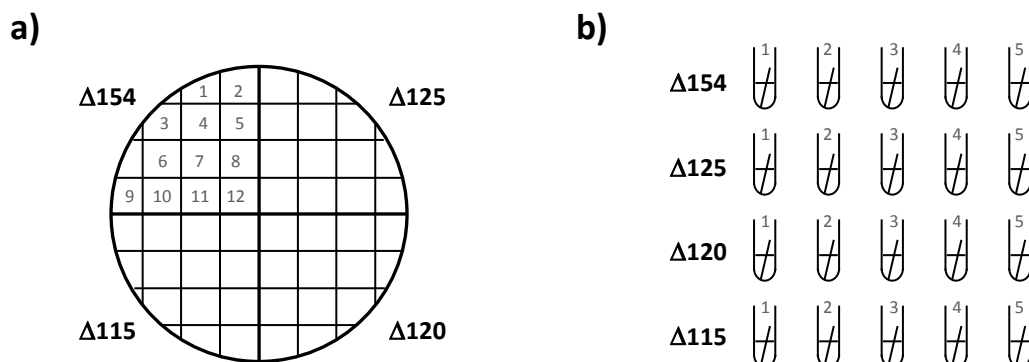


Figura 4. a) Colonias extendidas en placa. b) Inóculos de 5 ml para extracción rápida.

Tras la extracción de los plásmidos, éstos se digirieron con BamHI para chequear en un gel de agarosa al 1%, las colonias positivas, que se cortan con la enzima, candidatas a contener el plásmido con la delección (asteriscos blancos, Figura 5).

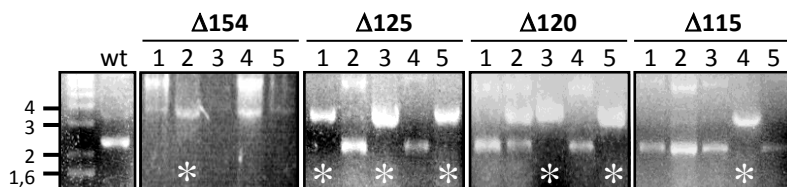


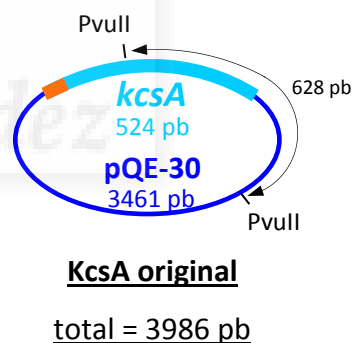
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del extracto plasmídico de varias colonias de cada delección. Los asteriscos blancos señalan las colonias positivas, que se cortan con BamHI, candidatas a contener la delección.

La colonia positiva (colonia nº 2) de *KcsA* Δ154-160 se envió a secuenciar y las colonias positivas candidatas a contener las delecciones de mayor tamaño (colonias nº 1, 3 y 5 de Δ125, colonias nº 3 y 5 de Δ120 y la colonia nº 4 de Δ115) se digirieron con PvuII (Fermentas) para comprobar las que contenían *KcsA* con el correcto tamaño de cada delección. El tamaño que debía tener el plásmido de cada una de estas delecciones, en pares de bases (pb), se detalla en la Figura 6 siguiente:

a)

	Cortado con PvuII 2 sitios de corte	Cortado con BamHI 1 sitio de corte
KcsA original	3357 + 628 pb	No se corta
KcsA Δ154-160	3357 + 607 pb	3964 pb
KcsA Δ125-160	3357 + 523 pb	3880 pb
KcsA Δ120-160	3357 + 508 pb	3865 pb
KcsA Δ115-160	3357 + 493 pb	3850 pb

b)



c)

Vector pQE-30..... = 3461 pb	KcsA Δ154-160 = -7 aa = -21 pb
Inserto <i>kcsA</i> original total = 524 pb	KcsA Δ125-160 = -35 aa = -105 pb
Inserto <i>kcsA</i> original (entre el aa 1 y el	KcsA Δ120-160 = -40 aa = -120 pb
codón de stop, inclusives)..... = 519 pb	KcsA Δ115-160 = -45 aa = -135 pb

Figura 6. a) Tabla que resume el tamaño en pares de bases (pb) de los segmentos que quedan del plásmido original y de cada delección al ser cortados con las enzimas de restricción PvuII o BamHI. **b)** Esquema de la construcción original de *KcsA* mostrando los sitios de corte de PvuII. Para ver el sitio de corte de BamHI en las delecciones ver figura 3. **c)** Izda, esquema resumen informativo de los tamaños del vector e inserto; drcha, tamaños de los segmentos eliminados en cada delección. aa = aminoácido.

Las digestiones con PvuII se chequearon en una SDS-PAGE al 10% (en tampón tris-acetato, TAE), que permite una mejor observación de la diferencia de tamaños en segmentos menores de 1 Kb. Así, se observaron plásmidos con el tamaño correcto de las deleciones en las colonias nº 1 de $\Delta 125-160$, nº 3 de $\Delta 120-160$, y nº 4 de $\Delta 115-160$ (asteriscos blancos, Figura 7).

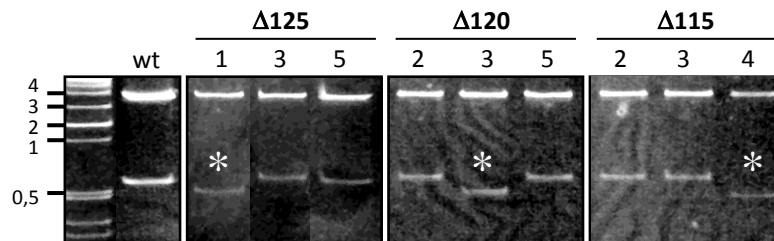


Figura 7. SDS-PAGE al 10%, en tampón TAE, de los plásmidos candidatos a positivos digeridos con PvuII. Los asteriscos blancos muestran las colonias positivas que contienen el tamaño correcto de la deleción.

La secuencia correcta de cada deleción se comprobó por secuenciación.

1.3 Mutagénesis dirigida de *KcsA*

Se realizaron diferentes mutaciones en aminoácidos específicos de *KcsA*, elegidos estratégicamente para comprobar distintos aspectos como la tetramerización o la agrupación de la proteína. Las mutaciones elegidas fueron:

- 1-KcsA S22C
- 2-KcsA E118C
- 3-KcsA E118C/R121C
- 4-KcsA L5R/L12R
- 5-KcsA G7R/L17R/L18R

Estas mutaciones específicas fueron realizadas por sustitución del codón correspondiente al aminoácido de la secuencia natural por el mutante deseado, mediante PCR de plásmido entero con cebadores complementarios (Figura 8).

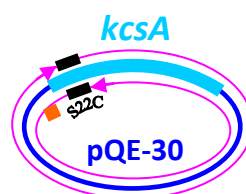


Figura 8. Esquema de la PCR de plásmido entero realizada para el ejemplo de la mutación *KcsA* S22C. Se señala el sentido de la amplificación y la posición de los cebadores.

Los cebadores sintetizados para mutagénesis dirigida se detallan en la Tabla 5:

MUTACIÓN	CEBADOR	
S22C	(+)	5'-CTCGGGCGCCACGGCT/aGTGCGCTGCACTGG
	(-)	5'-CCAGTGCAGCGCACa/tGCCGTGGCGCCCGAG
E118C	(+)	5'-TGGTTCGTGCGCCGGT/gG/aT/aCAAGAGCGCCGG
	(-)	5'-CCGGCGCTCTTGA/tC/tA/cCCGGCCGACGAACCA
E118C/R121C	(+)	5'-TGGTTCGTGCGCCGGT/cG/aT/aCAAGAGT/cGCCGGGGCCACTTC
	(-)	5'-GAAGTGGCCCCGGCA/gCTCTTGA/tC/tA/gCCGGCCGACGAACCA
L5R/L12R	(+)	5'-CCCATGCG/tGTCCGGTCTTGTGCCAGAC/tG/tGGTCAAA
	(-)	5'-TTTGACCC/aG/aTCTGGCCAGAAGACCGGACC/aGCATGGG
G7R/L17R/G18R	(+)	5'-CTGTCCC/gGTCTTCTGGCCAGATTGGTCAAACCTGCTGCG/tCC/gGGCGCCAC
	(-)	5'-GTGGCGCCG/cGC/aGCAGCAGTTTGACCAATCTGGCCAGAAGACG/cGGACAG

Tabla 5. Cebadores utilizados para mutagénesis dirigida de *KcsA*. Los nucleótidos en gris y minúscula representan los originales y a su izquierda sus mutaciones.

Las mutaciones se chequearon transformando, en células XL1-blue, el DNA procedente de la PCR, tras la eliminación del DNA parental metilado mediante corte con DpnI. De la placa sembrada de la transformación de cada mutación, se seleccionaron 10 colonias, que se extendieron en otra placa y de las cuales se incubaron algunas en medio LB para crecerlas y chequear el contenido plasmídico mediante secuenciación tras una extracción rápida, como se representa en la Figura 9.

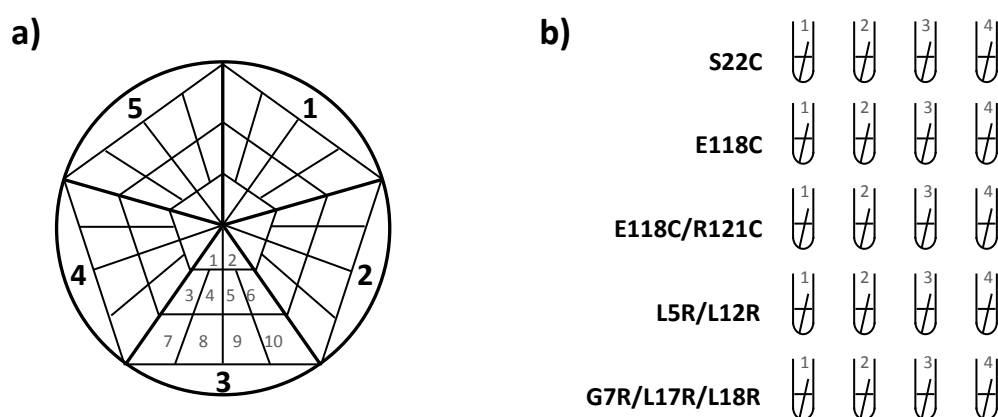


Figura 9. a) Colonias extendidas en placa. b) Inóculos de 5 ml para extracción rápida.

Se comprobó la secuencia correcta por secuenciación de los plásmidos purificados.

II Expresión y purificación del canal de potasio KcsA

Tras la clonación del gen *kcsA* en el vector pQE-30, se procedió a poner a punto la transformación, expresión y purificación de la proteína en nuestro laboratorio siguiendo la metodología aplicada con éxito por el grupo de Schrempf (H, Schrempf et al, 1995; Meuser, D., et al, 1999; Splitt, H., et al, 2000), aunque con algunas modificaciones, mediante purificación en un solo paso a través de una columna de afinidad de Ni²⁺-NTA, y eluyendo la proteína con imidazol.

II.1 Optimización de la expresión de KcsA

KcsA tuvo el máximo de expresión a las 2 h de inducción con IPTG.

Se determinaron las mejores condiciones de expresión de KcsA en la cepa bacteriana M15 (pREP4), resistente a kanamicina, en cultivos a pequeña escala, variando tanto la temperatura de crecimiento como la duración del cultivo. Para ello se transformó la construcción original de KcsA en las células M15 (pREP4) óptimas para una elevada expresión de la proteína y se inocularon en medio rico en nutrientes (medio 2xYT) para su crecimiento. Se hicieron en paralelo dos cultivos a distintas temperaturas (30 y 37 °C). Cuando la densidad óptica (D.O.) llegó a 0.6-0.8 (a las 2 horas aprox.) se indujo la expresión de KcsA con la adición de isopropilo α -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 M y se tomaron alícuotas a distintas horas de inducción (2, 4, 6 y 24 horas). Tras la lisis celular y calentamiento de las alícuotas, se chequeó la expresión de KcsA monomérico a diferentes tiempos y temperaturas de inducción en una electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 13.5% (Figura 10). En promedio (N=4), el máximo de expresión de la proteína se obtuvo a las 2h de inducción con IPTG, tanto a 30 como a 37 °C coincidiendo con el máximo crecimiento bacteriano. La proteína aparecía con un peso molecular similar al esperado (17.4 KDa) correspondientes a los 172 aminoácidos del monómero.

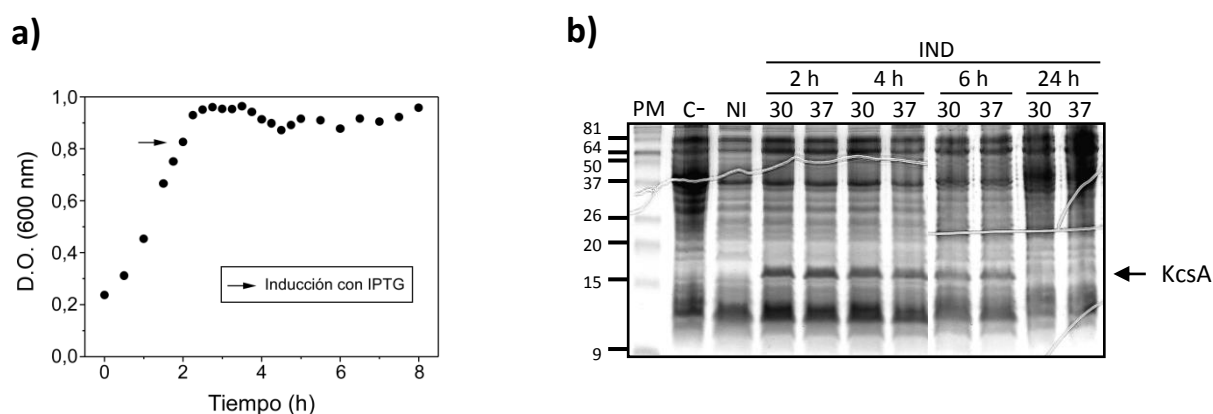


Figura 10. Optimización de la expresión de KcsA. **a)** Densidad óptica del cultivo de células M15 transformadas con KcsA creciendo a 30 °C. **b)** SDS-PAGE al 13,5% teñido con Azul Coomassie mostrando la expresión de KcsA monomérico en la cepa M15 (pREP4) a diferentes horas y temperaturas de inducción. PM = Patrón de pesos moleculares; C- = Extracto proteico de células M15 (pREP4) no transformadas; NI = Extracto proteico de células M15 (pREP4) transformadas pero no inducidas; IND = Extracto proteico de células M15 (pREP4) transformadas e inducidas con IPTG 0,5 M; La flecha señala la banda de proteína correspondiente a la expresión de KcsA.

Una vez optimizada la expresión, como rutina para su producción a gran escala se siguió el protocolo optimizado. Así, la transformación se lleva a cabo en células M15 (pREP4) y una colonia de las células transformadas se preinocula en 100 ml de medio de crecimiento Luria Bertani (LB) con ampicilina y kamamicina y se incuba toda la noche a 37 °C y 200 rpm para facilitar el crecimiento microbiano. Al día siguiente los 100 ml de LB se inoculan en 1 L de medio de crecimiento rico 2xYT con antibióticos y se incuban a 30 °C y 200 rpm hasta llegar a un crecimiento bacteriano en fase exponencial (densidad óptica de 0,6-0,8). A partir de ese momento se induce la expresión de KcsA con IPTG 0,5 M y se mantiene el crecimiento bacteriano durante 2 horas en las mismas condiciones de velocidad y temperatura. En este momento de máxima expresión de KcsA, se centrifugan las células y se procede a la purificación de la proteína.

II.2 Optimización de la purificación de KcsA por cromatografía de afinidad

Unión de KcsA a la columna de Ni²⁺-NTA.

Se utilizó cromatografía de afinidad para purificar KcsA recombinante. Se utilizó la afinidad de la cola de histidinas de la proteína por el níquel que contiene una columna de agarosa de ácido nitrilotriacético (Ni²⁺-NTA, de Qiagen) para unir específicamente a KcsA y separarla del resto de proteínas mediante lavados.

La agarosa de Ni²⁺-NTA está compuesta de níquel unido a ácido nitrilotriacético acoplado a Sefarosa CL-6B (Qiagen). El NTA es un adsorbente quelante tetradentado que se une al níquel por 4 de los 6 sitios de unión de la esfera de coordinación del ión níquel, dejando 2 sitios libres para interactuar con las histidinas (Figura 11a). Así, el NTA une fuertemente las colas de histidinas de proteínas recombinantes, separándolas eficientemente del resto, evitando impurezas y contaminación por níquel de las proteínas purificadas.

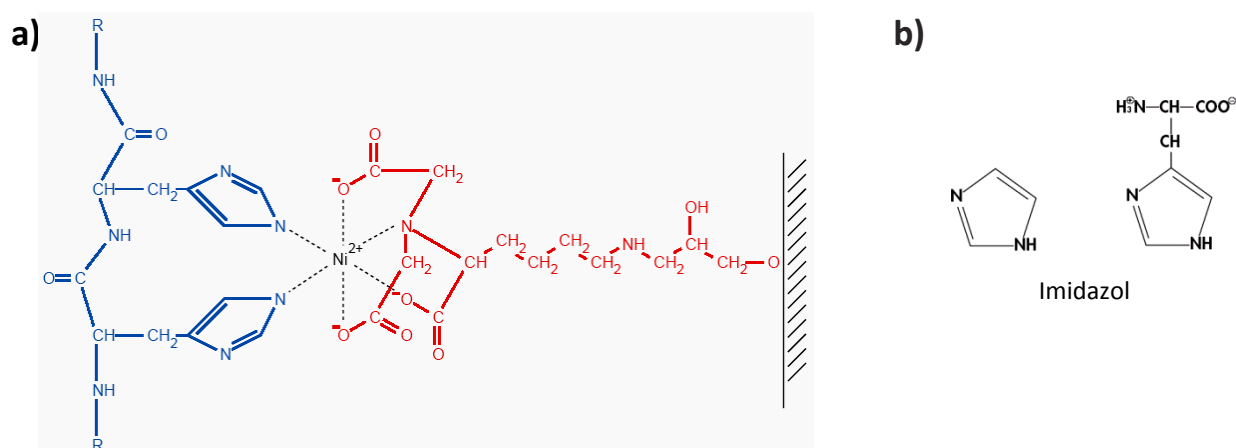


Figura 11. Interacción entre aminoácidos vecinos de histidinas con la matriz Ni-NTA. a) El NTA (en rojo) se une al níquel por 4 de los 6 sitios de unión de la esfera de coordinación del ión níquel, dejando 2 sitios libres para interactuar con las histidinas (en azul). Así es como la cola de histidinas de KcsA se une específicamente al níquel de la columna de agarosa de ácido nitrilotriacético y se purifica separándose del resto de proteínas. **b)** Estructura atómica comparada del anillo de imidazol y del aminoácido histidina.

El anillo de imidazol es parte de la estructura de la histidina (Figura 11b). Los anillos de imidazol de la cola de histidinas se unen a los iones níquel inmovilizados por los grupos NTA de la matriz. El imidazol, por sí mismo, puede también unirse al níquel y romper la unión de aminoácidos de histidina dispersos en proteínas naturales. Con bajas concentraciones de imidazol, se evita la unión inespecífica y de baja afinidad de histidinas dispersas en proteínas naturales, mientras la cola de histidinas todavía se une fuertemente a la matriz Ni²⁺-NTA.

Hay tres formas de eluir la proteína unida a la matriz Ni²⁺-NTA: con pH ácido, con altas concentraciones de imidazol y con quelantes como el EDTA o el EGTA. Las histidinas tienen un pK_a aproximadamente de 6,0 y se protonan si el pH se reduce (pH 4,5-5,3). Bajo estas condiciones, la proteína con la cola de histidinas no puede unirse al níquel y se disociará de la matriz Ni²⁺-NTA. De forma similar, si la concentración de imidazol se incrementa a 100-250 mM, la proteína con la cola de histidinas se disociará porque no puede competir por los sitios de unión en la matriz Ni²⁺-NTA. Quelantes como el EDTA o EGTA unen el ión níquel y lo extraen de los grupos NTA. Esto causa que la proteína con la cola de histidinas eluya como un complejo de proteína-metal. Mientras que todos los métodos de elución (imidazol, pH y EDTA) son en teoría, igualmente efectivos, el imidazol es más suave y permite purificar la proteína en condiciones nativas. En cambio, la proteína puede dañarse por la reducción del pH, o sufrir algún posible efecto no deseado al copurificarla con níquel. Como se deseaba la purificación de KcsA en condiciones nativas, se desechó el método de elución por EDTA y se comprobaron los métodos de elución por pH y por imidazol.

Elución de KcsA por pH y por imidazol

Se partió de 500 ml de 2xYT inoculado con M15 (pREP4) transformadas con KcsA, que tras dos horas de inducción con IPTG 0,5 M a 30 °C, se centrifugaron las células y se lisaron con sonicador en presencia de inhibidores de proteasas. Tras la sonicación, se centrifugó y el pellet (que contenía la fracción de membrana) se solubilizó con tampón Hepes pH 7,5, KCl 100 mM y 10 mM de dodecilmaltósido (DDM; Calbiochem) durante toda la noche. Después se centrifugó y el sobrenadante solubilizado se dividió en dos que se añadieron, cada uno, a una columna de 0,5 ml de agarosa de ácido nitrilotriacético (Ni²⁺-NTA, de Qiagen) previamente equilibrada en el tampón de la proteína, para purificar por ambos métodos. Se utilizó la afinidad de la cola de histidinas de la proteína por el níquel que contiene dicha columna, para unir específicamente a KcsA y, mediante lavados con el tampón de solubilización se separó del resto de proteínas. Tras los lavados (absorbancia a 280 nm < 0,01) se procedió a eluir la proteína. Para eluir con gradiente de pH se mezclaron con la agarosa 5 ml de tampón Pipes pH 6,4 con las mismas sales del tampón de solubilización y, pasada 1 h, se eluyó de la columna recogiendo en alícuotas de 0,5 ml. Cuando la absorbancia fue < 0,01 se hizo lo mismo pero con tampón acetato/acético pH 4, y después con pH 3,5. Para eluir con imidazol se mezclaron con la agarosa 5 ml de tampón Hepes pH 7,5 con 600 mM de imidazol y las mismas sales del tampón de solubilización y, pasada 1 h, se eluyó de la columna recogiendo en alícuotas de 0,5 ml. Fracciones de 20 µl de las alícuotas eluidas, así como de la agarosa correspondiente, se calentaron a 95 °C y se cargaron en un SDS-PAGE al 13,5 % (Figura 12).

Se obtuvo que la proteína KcsA no se eluye por gradiente de pH y se queda pegada a la columna de níquel, incluso a pH 3, mientras que ésta sí se logra eluir de la columna con imidazol 600 mM.

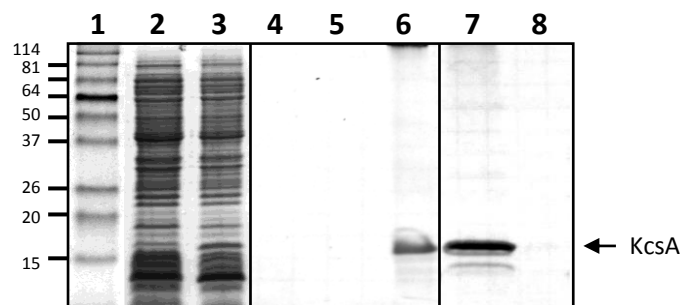


Figura 12. Optimización de la purificación de KcsA. SDS-PAGE al 13,5 % teñido con Azul Coomassie mostrando la expresión y purificación de KcsA con pH e imidazol. En la elución con pH, la proteína KcsA se queda pegada a la columna de níquel, mientras que ésta se logra purificar y eluir de la columna con imidazol. Calle 1 = Patrón de pesos moleculares; Calle 2 = Extracto proteico de células M15 (pREP4) no inducidas; Calle 3 = Extracto proteico de células M15 (pREP4) inducidas durante 2 h; Calle 4 = Elución con pH 6,4; Calle 5 = Elución con pH 4,0; Calle 6 = Agarosa Ni^{2+} -NTA a pH 3; Calle 7 = Elución con 600 mM de imidazol; Calle 8 = Agarosa Ni^{2+} -NTA con 600 mM de imidazol.

En resumen, la proteína KcsA expresada en las células M15 (pREP4) fue purificada con éxito mediante la cola de seis histidinas en su amino terminal, en un solo paso a través de una columna de afinidad de Ni^{2+} -NTA y en condiciones nativas por elución de la columna con 600 mM de imidazol. Además, este método coincidió con el utilizado con éxito por otros grupos, aunque con algunas modificaciones, como el de C. Miller (L. Heginbotham et al, 1997, L. Heginbotham et al, 1998) o el grupo de H. Schrempf (D., Meuser, et al, 1999, H., Splitt, et al, 2000, D., Meuser, et al, 2001), por el que consiguieron una reconstitución funcional de la proteína. A continuación se determinó la concentración óptima de imidazol para la elución de KcsA de la columna de Ni^{2+} -NTA.

II.3 Caracterización de la elución de KcsA con gradiente de imidazol

Se caracterizó en detalle la elución de KcsA de la columna de Ni^{2+} -NTA mediante un gradiente ascendente de 10 a 400 mM de imidazol, para determinar la concentración óptima de elución de KcsA. Para ello, se equilibró una columna de 500 ml de agarosa Ni^{2+} -NTA con tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, que contenía DDM 1 mM, KCl 100 mM e Imidazol 10 mM (tampón de lavado) y se colocaron sobre ella 200 μg de KcsA purificado y dializado en tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, que contenía DDM 1 mM y KCl 100 mM. El gradiente se pasó a través de la columna mezclando con un gradientador 3 ml de tampón de lavado a 10 mM de imidazol y 3 ml de tampón de lavado a 400 mM de imidazol, como se muestra en la Figura 13. El gradiente pasado a través de la columna se recogió en 23 alícuotas de 250 μl , tras el cual se pasó tampón con imidazol 1 M para eluir posibles restos de proteína.

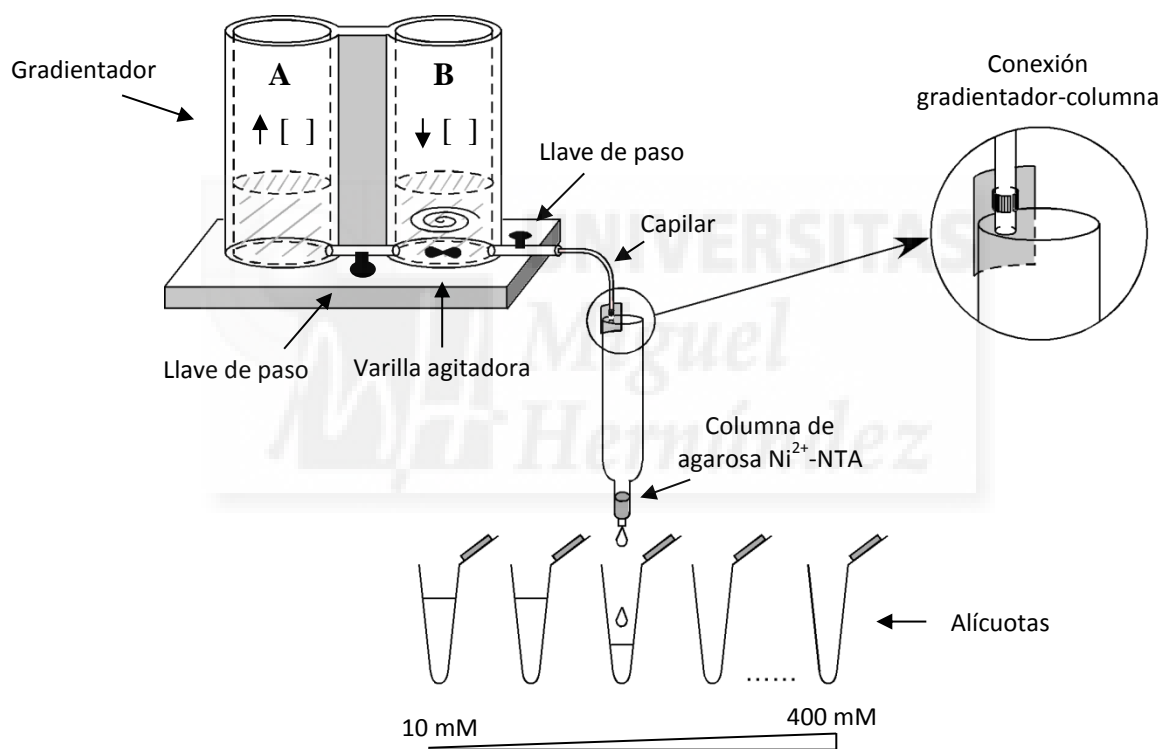
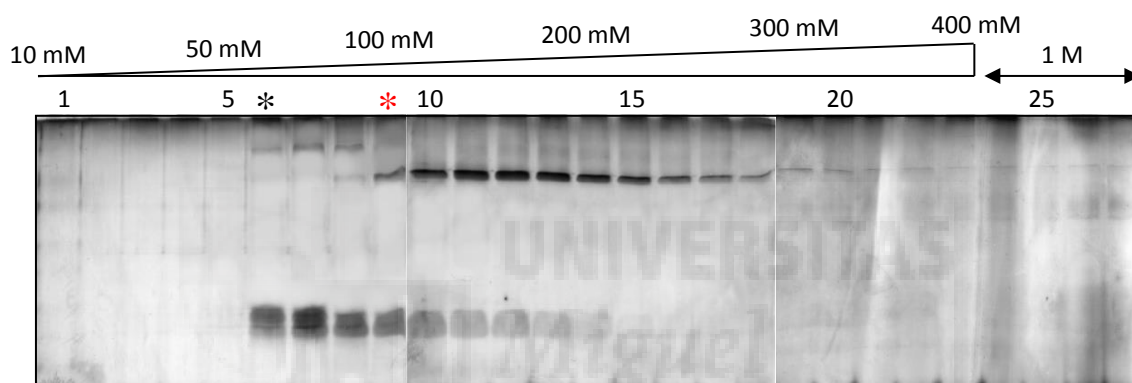


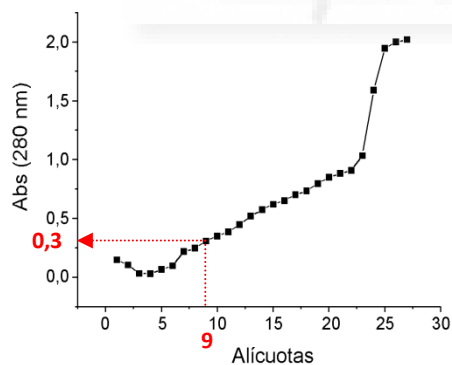
Figura 13. Elución de KcsA con gradiente de imidazol. Esquema del gradientador conectado a la columna de Ni^{2+} -NTA para elución de KcsA con gradiente ascendente de 10 a 400 mM de imidazol. El gradientador, de metacrilato, consta de dos compartimentos, A y B, conectados por la parte de abajo, mediante una llave de paso, y con salida en compartimento B, cerrada por otra llave de paso. La columna de Ni^{2+} -NTA está conectada al gradientador mediante un capilar. La solución de imidazol más concentrada (400 mM) se colocó en el compartimento A y la solución más diluida (10 mM) en el compartimento B. Tras conectar la agitación del compartimento B y apertura de las llaves de paso, el gradiente comenzó a pasar por la columna recogiendo en alícuotas de 1 ml. Se amplía el detalle del mecanismo de la conexión del capilar del gradientador con la columna de agarosa, para provocar un deslizamiento lineal del fluido por la pared de la columna.

De cada alícuota recogida se cargaron 20 μl en una SDS-PAGE al 13,5 % que se reveló con Coomassie (Figura 14a). El monómero empezó a salir en la alícuota nº 6 (asterisco negro) y el tetrámero en la alícuota nº 9 (asterisco rojo). Se midió la absorbancia a 280 nm de las alícuotas eluidas (Figura 14b), y se comparó con la recta patrón de absorbancia del tampón del gradiente con imidazol, en el rango de 0 a 1 M (Figura 14c). Se determinó que el tetrámero (que sale en las alícuotas 9 a 20, con máximo en la 12) eluye en el rango de 100 a 300 mM de imidazol (con el máximo a 160 mM); mientras que el monómero (que sale en las alícuotas 6 a 14, con máximo en la 7) eluye en el rango de 60 a 200 mM de imidazol (con el máximo a 80 mM). A partir de la alícuota nº 6 la absorbancia aumenta en un pequeño escalón correspondiente a la absorbancia de la proteína adicionada a la del imidazol. El fuerte aumento de la pendiente a partir de la alícuota 23 se corresponde con el golpe de imidazol 1 M.

a)



b)



c)

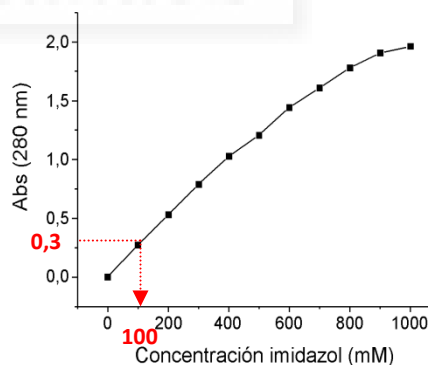


Figura 14. Caracterización de la elución de KcsA con gradiente de imidazol. a) SDS-PAGE al 13,5 % de las alícuotas de KcsA eluido de la columna de Ni^{2+} -NTA con gradiente de imidazol de 10 a 400 mM y tampón con imidazol 1 M. El monómero empezó a salir en la alícuota nº 6 (asterisco negro) y el tetrámero en la alícuota nº 9 (asterisco rojo). b) Absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas de la columna con el gradiente de imidazol. A partir de la alícuota nº 6 la absorbancia aumenta en un pequeño escalón correspondiente a la absorbancia de la proteína adicionada a la del imidazol. El fuerte aumento de la pendiente a partir de la alícuota 23 se corresponde con la salida de imidazol 1 M. c) Recta patrón de la absorbancia a 280 nm de cada concentración de imidazol.

II.4 Resumen de la expresión y purificación optimizada de KcsA

Tras la clonación del gen *kcsA* en el vector pQE-30, se procedió a su transformación, expresión y purificación optimizadas, coincidiendo con la metodología aplicada con éxito por el grupo de Schrempf (H, Schrempf et al, 1995; Meuser, D., et al, 1999; Splitt, H., et al, 2000), aunque con algunas modificaciones, por purificación en un solo paso a través de una columna de afinidad de Ni²⁺-NTA, eluyendo la proteína con imidazol.

Transformación y expresión de KcsA

La transformación se llevó a cabo en células M15 (pREP4), óptimas para una elevada expresión de proteína. Una colonia de las células transformadas fue preinoculada en 100 ml de medio de crecimiento Luria Bertani (LB) con ampicilina y kamamicina e incubada toda la noche a 37 °C y 200 rpm para facilitar el crecimiento microbiano. Al día siguiente los 100 ml de LB fueron inoculados en 1 L de medio de crecimiento rico 2xYT con antibióticos e incubados a 30 °C y 200 rpm hasta llegar a un crecimiento bacteriano en fase exponencial (densidad óptica de 0,6-0,8). A partir de ese momento se indujo la expresión de KcsA con IPTG 0,5 M y se mantuvo el crecimiento bacteriano durante 2 horas en las mismas condiciones de velocidad y temperatura. En este momento de máxima expresión de KcsA, se centrifugaron las células y se procedió a la purificación de la proteína.

Purificación de KcsA

El proceso de purificación de KcsA comenzó con la lisis celular mediante sonicación con sonda para romper las paredes celulares. Para ello, se resuspendieron en tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, que contenía lisozima 0,4 mg/ml, sacarosa 0,45 M, EDTA 8 mM e inhibidor de proteasas PMSF 0,75 mM (tampón de resuspensión). Las células resuspendidas se sonicaron con sonda y en hielo durante varios ciclos de sonificado-hielo y se centrifugaron para eliminar el material sobrenadante. Posteriormente se procedió a la solubilización del material sedimentado, que, entre otros, contiene las proteínas de membrana. Para ello, el sedimento se solubilizó, mediante politrón, con tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, que contenía el detergente dodecilmaltósido (DDM; Calbiochem) 10 mM, KCl 100 mM, Imidazol 10 mM y PMSF 0,75 mM (tampón de solubilización). A continuación se centrifugó de nuevo y se procedió a la purificación de la proteína KcsA. Para ello, el sobrenadante, ya con la proteína KcsA solubilizada, se añadió a una columna de agarosa de nitrilotriacético rica en níquel (Ni²⁺-NTA, de Qiagen; 1 ml de agarosa por cada litro de cultivo original), previamente lavada con tampón de solubilización. La cola de histidinas de KcsA se une específicamente al níquel de la columna permitiendo la separación de KcsA del resto de proteínas. El material solubilizado se dejó pasar a través de la columna y ésta se lavó pasando tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, que contenía DDM 1 mM, KCl 100 mM e Imidazol 10 mM (tampón de lavado), hasta que dejó de salir proteína, estimando dicho momento cuando la absorbancia de las proteínas a 280 nm fue $\leq 0,01$. Esta baja absorbancia era indicativa de que sólo quedaba KcsA unido a la columna de Ni²⁺-NTA y se procedió a la elución de la proteína KcsA retenida en la columna. Para ello se pasó tampón de lavado pero con alto contenido en imidazol (1 M) (tampón de elución), que se une

fuertemente al níquel, desplazando a la proteína KcsA de la columna y permitiendo así su elución purificada (ver las etapas de la purificación de KcsA en la Figura 15). La proteína eluida se recogió en alícuotas de 1 ml. Las alícuotas que contenían proteína (observado mediante electroforesis) se juntaron y se halló la concentración de proteína, previa diálisis frente a 2 L de tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, que contenía DDM 1 mM y KCl 100 mM (tampón de diálisis), para eliminar el imidazol, que interfería en la medida. Una vez eliminado éste, se halló la concentración de KcsA purificada mediante densitometría de la banda de KcsA comparada con un patrón de albúmina de suero bovino (BSA) en SDS-PAGE, y mediante DC-Protein Assay (BioRad). Ambos métodos dieron resultados similares y en lo sucesivo se determinó la concentración mediante el más sencillo método del DC-Protein. Como resultado, la purificación de KcsA fue del 99% aprox., con un rendimiento de 1 a 4 mg de KcsA por litro de cultivo y obtenida a una concentración de 0,5 a 2 mg/ml. Se obtenía una banda mayoritaria de KcsA tetramérico de unos 55 kDa (T), acompañada por una débil banda de KcsA monomérico de unos 15 kDa aprox. (M) y otra de un peso molecular correspondiente a dos tetrámeros de KcsA (2T).

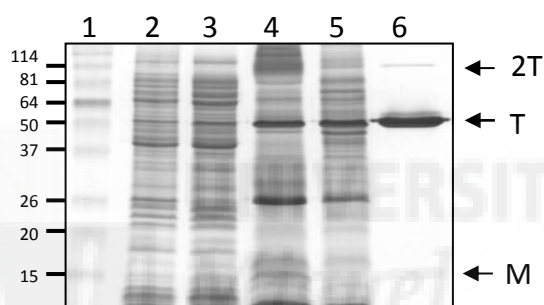


Figura 15. SDS-PAGE al 13,5 % mostrando las etapas en la purificación de KcsA. Calle 1 = Patrón de pesos moleculares; Calle 2 = Extracto proteico de células M15 (pREP4) no inducidas; Calle 3 = Extracto proteico de células M15 (pREP4) inducidas durante 2 h; Calle 4 = Sedimento con la fracción de membrana; Calle 5 = Proteínas de membrana solubilizadas; Calle 6 = KcsA purificado. 2T= grupo de dos tetrámeros; T= Tetrámero; M= Monómero.

III Gradiente de sacarosa de KcsA purificado

El gradiente de sacarosa de KcsA purificado permite separar tetrámero y monómero

Una propiedad de la purificación de KcsA es la posibilidad de separar las fracciones de tetrámero y monómero de KcsA purificado, en caso de necesidad. Por ello, se optimizó un método de separación de tetrámero y monómero mediante gradiente de sacarosa.

Se realizó un gradiente continuo del 2% al 10% de sacarosa en tampón de solubilización (Hepes 20 mM, pH7 que contenía KCl 100 mM, imidazol 10 mM y DDM 10 mM) en tubos de centrifuga SW41 de policarbonato de 12 ml de capacidad. El gradiente se realizó en un gradientador, como en la Figura 12, mezclando 5 ml de tampón al 2% de sacarosa (compartimento A) y 5 ml de tampón al 10% de sacarosa (compartimento B), y conectado al tubo SW41, donde se hizo el gradiente. Sobre el gradiente se depositaron 200 μ g de KcsA wt solubilizado en tampón de elución (Hepes 20 mM, pH7 que contenía KCl 100 mM, imidazol 500 mM y DDM 10 mM). Se centrifugó en el rotor basculante SW41 durante 20 horas a 35000 rpm y 15 $^{\circ}$ C. Tras la centrifugación se recogieron 40 alícuotas de 250 μ l desde la parte inferior del tubo. De cada alícuota recogida se cargaron 20 μ l en una SDS-PAGE al 13,5 % que se reveló con plata (Figura 16a). Tras el revelado, se determinó el porcentaje de tetrámero y monómero en cada alícuota por densitometría de las bandas (Figura 16b). Como resultado, el tetrámero de KcsA salió en las 10 primeras alícuotas, con el máximo alrededor de la alícuota n $^{\circ}$ 5, y el monómero salió en las alícuotas 12 a 20, con el máximo alrededor de la alícuota n $^{\circ}$ 17. Las alícuotas 21 a 40 salieron en blanco. Se obtuvo así, una separación eficiente de tetrámero y monómero, interesante para poder aplicar en cualquier experimento que así lo requiera.

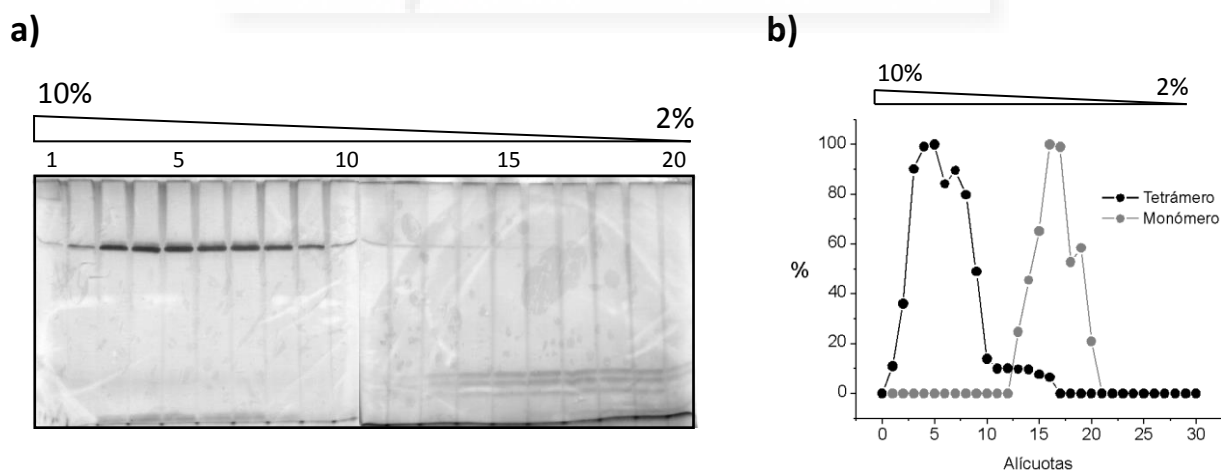


Figura 16. Separación de tetrámero y monómero por gradiente de sacarosa de KcsA purificado. a) SDS-PAGE al 13,5 % mostrando la separación de tetrámero y monómero en las 20 primeras alícuotas de un gradiente de sacarosa del 2 al 10 %. El tetrámero sale en la alícuotas 2 a 10, mientras que el monómero sale en las alícuotas 12 a 20. b) Porcentaje de tetrámero y monómero en cada alícuota obtenido por densitometría de las bandas. El máximo de tetrámero salió alrededor de la alícuota n $^{\circ}$ 5 y el máximo de monómero alrededor de la alícuota n $^{\circ}$ 17.

IV Eliminación del C-terminal de KcsA por digestión con quimotripsina

IV.1 Optimización de la digestión con quimotripsina

Para experimentos posteriores, como la interacción de KcsA con el péptido inactivante de *Shaker*, fue interesante la obtención de KcsA sin el C-terminal. En un trabajo anterior (E. Perozo et al., 1998) se obtuvo KcsA 1-125 mediante un tratamiento proteolítico con quimotripsina de KcsA tetramérica purificada, que eliminaba los 35 últimos aminoácidos del C-terminal de la proteína. Debido a la ausencia de detalle sobre las condiciones óptimas de corte (tipo y cantidad de quimotripsina, tiempo y temperatura de corte, etc), se establecieron las condiciones óptimas para cortar KcsA tetramérico purificado con el fin de obtener una delección en C-terminal de 35 aminoácidos (KcsA 1-125).

Se cortó KcsA tetramérico purificado y solubilizado, para que todos los C-terminales fuesen accesibles a la quimotripsina. Se utilizó quimotripsina de tipo II (C-4129, SIGMA), que corta en el C-terminal de residuos aromáticos (Y, F y W) y con menos afinidad en el C-terminal de algunos residuos con cadenas laterales voluminosas (L, M, N y Q), guardada a -20 °C en alícuotas de 100 µl a 0.5 mg/ml. Para evitar cortes inespecíficos se usó a concentraciones limitantes en varias relaciones KcsA:quimotripsina (50:1, 100:1 y 500:1 (w:w)), distintas temperaturas (30 y 37 °C) y distintos tiempos de corte (15', 30', 1 h, 2 h, 3 h, 5 h y 24 h) que se pararon con PMSF 5 mM. Las muestras se cargaron en SDS-PAGE al 13,5 % y se revelaron con Coomassie. Se observó el corte progresivo de KcsA hasta obtenerse una banda estable cuyo peso molecular correspondía a una delección de unos 35 aminoácidos. Las condiciones óptimas para cortar KcsA tetramérico purificado se obtuvieron incubando con quimotripsina a una relación 50:1, durante 3 h a 37 °C (Figura 17).

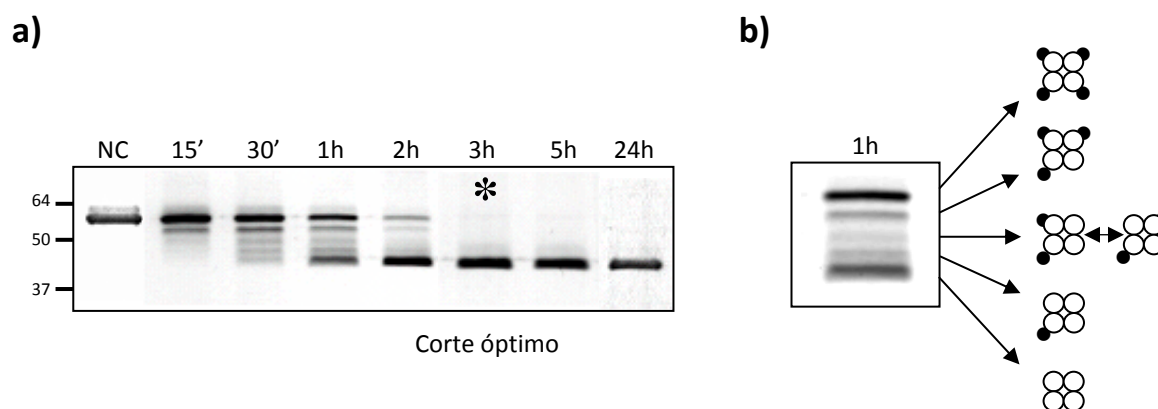


Figura 17. Digestión de KcsA con quimotripsina. a) Ejemplo representativo de la progresión del corte de KcsA con el tiempo de reacción en presencia de quimotripsina, a una relación 50:1 y 37 °C. Se muestra el corte óptimo de la proteína a las 3 h de duración (asterisco). b) Detalle de las bandas de KcsA sin cortar y cortada en 1, 2, 3, y 4 subunidades, en etapas intermedias del corte. Los círculos blancos representan las cuatro subunidades de un canal de KcsA y los puntos negros representan el C-terminal de cada subunidad.

La diferencia de pesos moleculares entre KcsA entero (60 kDa aprox.) y cortado (45 kDa aprox.) concuerda con la pérdida de unos 15 kDa que produciría la deleción de 35 aminoácidos en C-terminal (Figura 17a). Con el progreso de la reacción se obtienen 4 bandas por debajo de la banda de KcsA no cortado (NC), que se interpretó como correspondientes a deleciones del C-terminal de una, dos, tres y las cuatro subunidades que conforman el canal, sucesivamente (Figura 17b). Estas bandas se obtienen antes de obtenerse la banda única a 45 kD, que se correspondería con las cuatro subunidades cortadas.

Dada la observada sensibilidad de la enzima a mínimas variaciones en la concentración de la proteína, se estableció aconsejable realizar siempre un corte de prueba, en sólo 50 µg de KcsA con la relación optimizada 50:1 y a 37 °C, previo al corte en mayores cantidades, para asegurar el tiempo de corte óptimo en cada preparación de KcsA.

En resumen, las condiciones óptimas para cortar KcsA tetramérico purificado fueron incubando KcsA solubilizado con quimotripsina a una relación 50:1, durante 3 h a 37°C. Además de la estimación del peso molecular en SDS-PAGE, a continuación se comprobó por determinación de aminoácidos (MALDI-TOF) y por inmunoblot anti-HIS, que la proteína cortada con este protocolo correspondía a KcsA 1-125, por el corte entre los aminoácidos F125 y V126 que elimina los últimos 35 aminoácidos del C-terminal.

Además se comprobó que la población minoritaria de monómero de KcsA desaparece casi completamente durante la proteólisis con quimotripsina (Figura 19), indicando que el monómero desensamblado está algo más desplegado dejando sitios de corte accesibles a la quimotripsina, que no son accesibles en KcsA tetramérico (van den Brink-van der Laan et al, 2004).

IV.2 Comprobación del sitio de corte de KcsA por quimotripsina mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF

El objetivo fue comprobar qué deleción se obtenía exactamente cuando se cortaba KcsA con quimotripsina y si había variabilidad en la zona de corte o no. Para ello, se realizó una determinación por hidrólisis de aminoácidos por la técnica de espectrometría de masas, MALDI-TOF, de KcsA entero y cortado con quimotripsina (deleción esperada $\Delta 125-160$). La muestra se preparó en nuestro laboratorio y la espectrometría de masas fue amablemente realizada por el laboratorio del Dr. Francisco Gavilanes en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

En resumen, una vez que se dispone de la proteína aislada (por ejemplo, separada por PAGE-SDS), su identificación se lleva a cabo mediante el análisis de sus huellas peptídicas. Esto implica la digestión de la proteína con una endoproteasa (tripsina) de especificidad de rotura conocida, la medida de las masas de los péptidos resultantes por espectrometría de masas (MALDI-TOF) y la identificación de la proteína por ajuste de las masas peptídicas observadas frente a las masas peptídicas de KcsA generadas teóricamente (por digestión virtual de la proteína con la endoproteasa utilizada experimentalmente).

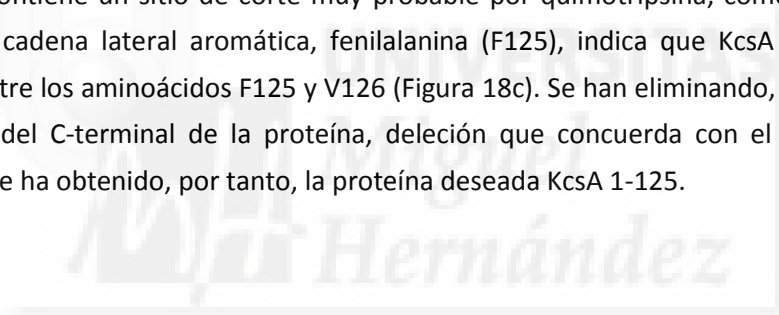
Separación y digestión en gel de las proteínas

La preparación de las muestras comenzó con el corte con quimotripsina optimizado (50:1, (w:w) durante 3 horas a 37°C) de varias muestras de KcsA purificado. Tras el corte, KcsA original y KcsA cortado se cargaron en alta concentración en un SDS-PAGE al 13,5 %, que se tiñó con azul Coomassie. Las bandas teñidas de tetrámero y de monómero se cortaron y se transfirieron a tubos eppendorf de 0,5 ml limpios y se congelaron a -20 °C. Las muestras ya preparadas se enviaron para realizar la espectrometría de masas, MALDI-TOF. Tras la recepción de los tubos que contenían las bandas del gel cortadas, se lavaron con acetonitrilo para su decoloración y se secaron al vacío. Las bandas secas se incubaron con iodoacetamida 55 mM preparada en $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 25 mM, pH 8.0 durante 15 min en la oscuridad. Tras lavados sucesivos con acetonitrilo y $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 25 mM, pH 8,0, las bandas de gel se secaron de nuevo al vacío antes de empezar la digestión con tripsina. Ésta se realizó utilizando 12.5 ng/ml de tripsina en la solución de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 25 mM, pH 8,0, añadida a las bandas excindidas secadas, cubriéndolas completamente durante 45 min. en hielo. El sobrenadante se eliminó y se añadió la solución de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ (sin tripsina) hasta cubrir las bandas. La digestión se realizó así durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, las muestras se agitaron y centrifugaron en una microcentrífuga de mesa, y tras lo cual, se realizaron ciclos de sonicación y centrifugación. Se extrajo la solución acuosa (el “crudo”) y se guardó a -20 °C para el análisis por espectrometría de masas. Las bandas se cubrieron con una solución de acetonitrilo al 50 % y TFA al 0,5 % y se sonicaron. Esto se realizó tres veces y se juntaron los sobrenadantes, que se guardaron también a -20 °C para análisis por espectrometría de masas. Normalmente, se obtuvieron mejores espectros con los extractos “crudos” que con los de la fracción de la fase orgánica.

Espectrometría de masas, MALDI-TOF

Se depositó una alícuota de 0,4 ml de la solución matriz (5 g/l de 2, 5-ácido dihidroxibenzoico en acetonitrilo acuoso al 33 % y ácido trifluoroacético al 0.1%) en una sonda de MALDI de 400 mm AnchorChip™, y se dejó secar a temperatura ambiente. Después se añadió 0,4 ml de la solución cruda extraída y de nuevo se dejó secar. Las muestras se midieron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Reflex™ IV (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Alemania) equipado con la fuente SCOUT™ en modo reflector de iones positivo usando extracción retrasada. El voltaje de aceleración de iones fue 20 kV. El equipo primero se calibró externamente empleando señales de masas protonadas de una mezcla peptídica que cubría el rango de 1000 a 3200 m/z y después cada espectro se calibró internamente usando señales seleccionadas provenientes de la autoproteólisis de la tripsina hasta alcanzar una medida de masa típica de ± 30 ppm. Las masas de péptido triptico medidas se compararon con la secuencia de KcsA y se asignaron los péptidos detectados en KcsA entero y en KcsA cortado con quimotripsina correspondientes (Figura 18).

Como resultado, comparando los péptidos detectados en KcsA entero y KcsA cortado (Figura 18a y b), se observa que el primer péptido que no se detecta en KcsA cortado es el 122-127. Dado que este segmento contiene un sitio de corte muy probable por quimotripsina, como es el C-terminal del aminoácido con cadena lateral aromática, fenilalanina (F125), indica que KcsA ha sido cortado con quimotripsina entre los aminoácidos F125 y V126 (Figura 18c). Se han eliminando, por tanto, los últimos 35 aminoácidos del C-terminal de la proteína, deleción que concuerda con el tamaño de la banda electroforética. Se ha obtenido, por tanto, la proteína deseada KcsA 1-125.



a) Péptidos detectados en KcsA entero:

12 – 27 LVKLLLGRHGSALHWR
 15 – 27 LLLGRHGSALHWR
 20 – 27 HGSALHWR
 53 – 64 GAPGAQLITYPR
 65 – 89 ALWWSVETATTVGYGDLYPVTWGR
 122–127 RGHFVR
 132–139 AAEAYTR
 143–153 ALHERFDRLER
 148–153 FDRLER
 154–160 MLDDNRR

b) Péptidos detectados en KcsA cortado:

12 – 27 LVKLLLGRHGSALHWR
 15 – 27 LLLGRHGSALHWR
 20 – 27 HGSALHWR
 53 – 64 GAPGAQLITYPR
 65 – 89 ALWWSVETATTVGYGDLYPVTWGR

c) Secuencia de aminoácidos de KcsA recombinante:

1 M1
 MRGSHHHHHHGSMP PMLSGLLARLVKLLLGRHGSALHWR AAG AATVLLVIVLLAGSYLAVLA 50
FS M2
 ERGAPGAQLITYPRALWWSVETATTVGYGDLYPVTWGR LVAVVMVAGITSFGLVTAALAT 112
 WFGREQER **RGHFVR** HSEK AAEAYTR TTRALHERFDRLERMLDDNRR 160
 ↑

Figura 18. Espectrometría de masas MALDI-TOF de KcsA entero y cortado. a y b) Péptidos detectados por espectrometría de masas en KcsA entero y KcsA cortado con quimotripsina. En verde se muestran los péptidos detectados tanto en KcsA entero como en KcsA cortado; y en violeta, los péptidos detectados sólo en KcsA entero, ausentes en KcsA cortado. c) Secuencia de aminoácidos de KcsA recombinante con los péptidos detectados por masas según el código de colores de a. En rojo se muestran los aminoácidos de la cola de histidinas. El 1 indica el primer aminoácido de los 160 de la secuencia natural de KcsA. La flecha gruesa indica el sitio de corte de KcsA cortado con quimotripsina deducido a partir de la espectrometría de masas, confirmando la deleción de 35 aminoácidos del C-terminal deseada, KcsA 1-125.

En conclusión, la determinación por hidrólisis de aminoácidos por la técnica de espectrometría de masas, MALDI-TOF, de KcsA cortado con quimotripsina es compatible con la rotura quimotriptica en el aminoácido F125, y confirma que obtuvimos la deleción del C-terminal de 35 aminoácidos deseada, KcsA 1-125.

Un dato que no desveló esta técnica es si el corte fue exclusivamente en el C-terminal de KcsA o, en cambio, si también se delecionó el N-terminal, dado que no se detectaron péptidos en esta zona de KcsA ni entero ni cortado. Para abordar esta incógnita se realizó un inmunoblot anti-His₄ que reconoce específicamente la cola de histidinas situada en el N-terminal de la proteína.

IV.3 Comprobación de la presencia del N-terminal en KcsA cortado con quimotripsina mediante inmunoblot anti-His₄

El objetivo fue comprobar si el corte de KcsA con quimotripsina se dió exclusivamente en el C-terminal, o se había producido también en el N-terminal. Como la cola de histidinas está en el N-terminal de KcsA, el anticuerpo anti-His₄ (Qiagen) nos podía servir de guía para comprobar tal fin.

Se realizó un protocolo de inmunoblot anti-His₄ standard. Se realizó una electroforesis al 13,5 %, con muestras de 5 µl de KcsA entero y cortado, ambos a 0.5 mg/ml. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se bloqueó con 3% de BSA en tampón fosfato salino, pH7,4, con Tween 20 al 0,05 % (PBS-T) durante toda la noche. Tras lavar con PBS-T, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-His₄ (stock 0.2 mg/ml) diluido 1:1000 en PBS-T durante 1h a temperatura ambiente. Tras lavados con PBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse unido a una peroxidasa de caballo (Sigma), hecho en conejo, diluido 1:2000 en PBS-T y 3% BSA, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavados con PBS-T, se llevó a cabo la detección de las proteínas por el sistema basado en luminiscencia ECL (Pharmacia).

El inmunoblot revelado confirmó que ambos, tanto KcsA entero como KcsA cortado son reconocidos por el anticuerpo anti-His₄. Se concluyó por tanto, que KcsA cortado mantiene el N-terminal intacto, siendo reconocible por el anticuerpo (Figura 19). El corte con quimotripsina se dió, por tanto, exclusivamente en el C-terminal de KcsA.

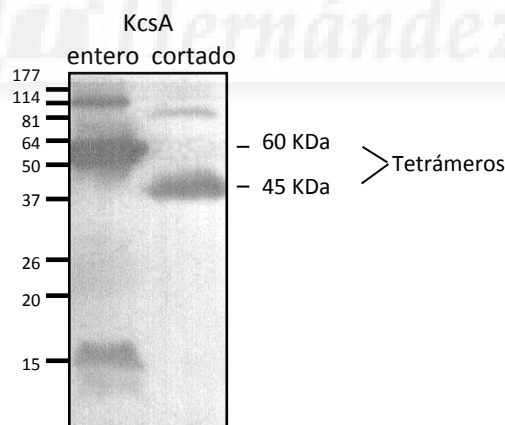


Figura 19. Inmunoblot anti-His₄ de KcsA entero y cortado con quimotripsina. El inmunoblot confirma que KcsA cortado mantiene el N-terminal intacto, siendo reconocible por el anticuerpo. El corte con quimotripsina se dió, por tanto, exclusivamente en el C-terminal de KcsA.

V *Reconstitución de KcsA en vesículas lipídicas de asolectina, LUVs*

Tanto la proteína KcsA original como sus mutantes purificados fueron eventualmente reconstituidos en vesículas lipídicas para experimentos posteriores. La optimización de la extracción de detergente y reconstitución en vesículas lipídicas se realizó con KcsA original, y el mismo método se empleó para la reconstitución de las proteínas de KcsA mutantes.

Para la reconstitución de KcsA se usó asolectina (Tipo II, Sigma) como matriz lipídica, un extracto de lecitina de soja rico en diferentes lípidos, que se ha utilizado con éxito en la reconstitución tanto de KcsA (Schrempf et al, 1995) como de otras proteínas de membrana como el receptor de acetilcolina (Poveda et al, 2002).

V.1 *Preparación de vesículas de asolectina*

Para reconstituir KcsA se prepararon stocks de vesículas de asolectina unilamelares grandes (LUVs), según el método de G. Riquelme et al. (1990), a 25 mg/ml en tampón HEPES 10 mM, pH 7, conteniendo KCl 100 mM (tampón de reconstitución).

V.2 *Optimización de la extracción de detergente y reconstitución de KcsA*

La reconstitución de KcsA por columna de Sephadex G-50 fino es óptima a L/P 500

Se optimizó el método para reconstituir KcsA en lípidos de asolectina mediante columna de Sephadex G-50 fino. Este es el método utilizado previamente por otros autores con experiencia en KcsA, como el grupo de Schrempf y el grupo de Miller (H. Schrempf et al, 1995; L. Heginbotham et al, 1997), que reconstituyen pequeñas cantidades de KcsA mediante centrifugación en columnas pequeñas de Sephadex G-50 fino (5 ml).

Para los fines de esta Tesis, el método se modificó realizándose en columnas más grandes (20 ml de lecho) para la reconstitución de mayores cantidades (volúmenes) de proteína (hasta un máximo de 2,3 ml). La mezcla de proteína-detergente-lípido, a la relación L/P deseada, se depositó en la parte superior de la columna previamente equilibrada con tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, que contenía KCl 100 mM (tampón de reconstitución) y se dejó pasar por gravedad y sin centrifugación (flujo de 2 ml/min) para permitir la formación de proteoliposomas mediante el intercambio del detergente por el lípido a través de su paso por la columna, donde el detergente queda retrasado. Se recogieron 40 alícuotas de 1 ml y se determinó el contenido lipídico midiendo la absorbancia del "scattering" lipídico a 310 nm y el contenido proteico mediante electroforesis de las fracciones con lípido.

Se optimizó la relación lípido/proteína en la reconstitución de KcsA. Para probar la relación óptima mediante éste método, KcsA purificado se reconstituyó a dos relaciones lípido/proteína: 25 y 500 (relación molar). La relación L/P = 25 es la que empleó el grupo de Perozo en la reconstitución de

KcsA con la técnica de dilución (Cortes and Perozo, 1997; Cuello et al, 1998); y la relación L/P = 500 es la relación óptima que se utiliza en nuestro laboratorio en la reconstitución del receptor de acetilcolina con el método de diálisis (Poveda et al, 2002). En ambas relaciones, el lípido se añadió previamente solubilizado en 3 mM de DDM y se mezcló, a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, con la cantidad de KcsA a reconstituir para asegurar una mezcla homogénea de proteína-detergente-lípido.

Como resultado, la relación L/P 25 fue insuficiente para reconstituir KcsA por columna de Sephadex G-50 (fino). La reconstitución a la relación L/P = 25 por columna indicó presencia de detergente en la proteína reconstituida. La alícuota que presentaba la máxima cantidad de lípido no coincidía con la alícuota que contenía el máximo de proteína (no mostrado), es decir, la proteína salía retrasada con respecto al lípido. Por tanto, el lípido utilizado a esta relación L/P no fue suficiente para desplazar a todo el detergente (DDM), de forma que la proteína seguía rodeada de detergente, y éste retrasó a la proteína en la columna de Sephadex.

En cambio, la reconstitución a la relación L/P = 500 dio mejores resultados. La absorbancia a 310 nm de las fracciones eluidas mediante Sephadex G-50 (fino) mostró que los liposomas eluyeron en las fracciones 8, 9 y 10, la mayoría en la alícuota nº 9 (Figura 20a), correspondiéndose también con la mayor concentración de proteína según el gel (Figura 20b). Así pues, se concluyó que la relación L/P 500 es suficiente para desplazar al DDM y permitir la reconstitución de KcsA en un proteoliposoma (o vesícula) de asolectina. KcsA se reconstituyó de forma óptima mediante Sephadex G-50 (fino) a L/P = 500.

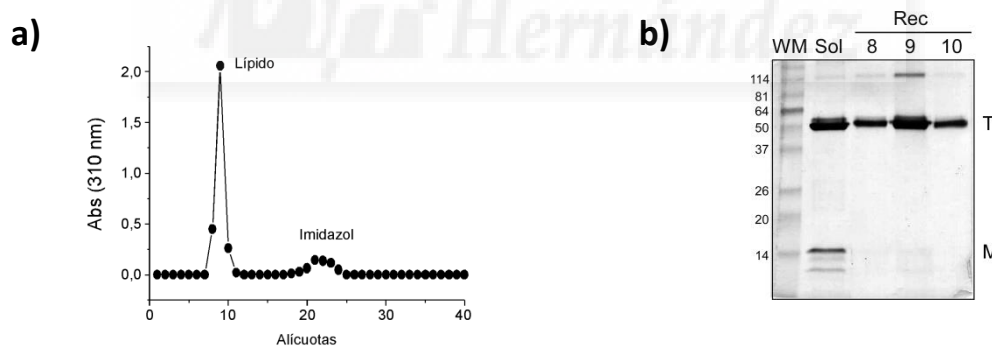


Figura 20. Reconstitución de KcsA. A) Absorbancia del “scattering” lipídico a 310 nm de las alícuotas de la reconstitución a una relación L/P 500. **B)** Chequeo de la reconstitución en SDS-PAGE al 13,5 %. WM = Patrón de pesos moleculares; Sol = KcsA solubilizada en DDM; Rec = KcsA reconstituida en asolectina.

La reconstitución de KcsA por diálisis debe tener un mínimo de L/P = 2000

Como posible método de reconstitución adicional, se exploró la reconstitución por diálisis, método tradicional utilizado en otras proteínas como el receptor de acetilcolina (Poveda et al, 2002). Mediante este método, la mezcla de detergente-lípido-proteína se coloca en bolsas de diálisis con tamaño de poro de 12 KDa (Sigma) frente al tampón de reconstitución durante tres días (dos cambios por día), tiempo durante el cual la proteína se reconstituye progresivamente en vesículas con la eliminación del detergente a través de la bolsa de diálisis.

Se comprobó qué relación L/P es la óptima para reconstituir KcsA en vesículas de asolectina mediante diálisis. Para ello se dializó la mezcla DDM-asolectina-KcsA a varias relaciones L/P, 500 y 2000, y se compararon con las mismas relaciones reconstituidas con el método optimizado de columna de Sephadex G-50 (fino). Las reconstituciones se chequearon en gradientes de sacarosa del 5 al 30 % en tampón de reconstitución. El gradiente se realizó en tubos de centrifuga SW41; sobre éste se depositaron 200 μ g de la mezcla y se centrifugó en rotor basculante SW41 durante 18 horas a 35000 rpm y 4 $^{\circ}$ C. Se recogió en 20 alícuotas de 500 μ l y se midió la absorbancia de la proteína a 280 nm. Como resultado, se obtuvieron bandas de lípido bien definidas y con elevada cantidad de proteína en todos los casos excepto en la relación L/P 500 reconstituida por diálisis (Figura 21a y b). Mientras KcsA se reconstituyó óptimamente a L/P 500 por columna, ésta no se reconstituyó bien por diálisis, debido, posiblemente, a la baja concentración micelar crítica (CMC = 0,16 mM) del DDM, dado que se forman micelas, que incluyen KcsA, con tan sólo 0,16 mM de detergente. Esto provoca que se elimine muy lentamente a través de la bolsa de diálisis, y necesite una mayor cantidad de lípido para ser desplazado eficientemente de su unión con KcsA.

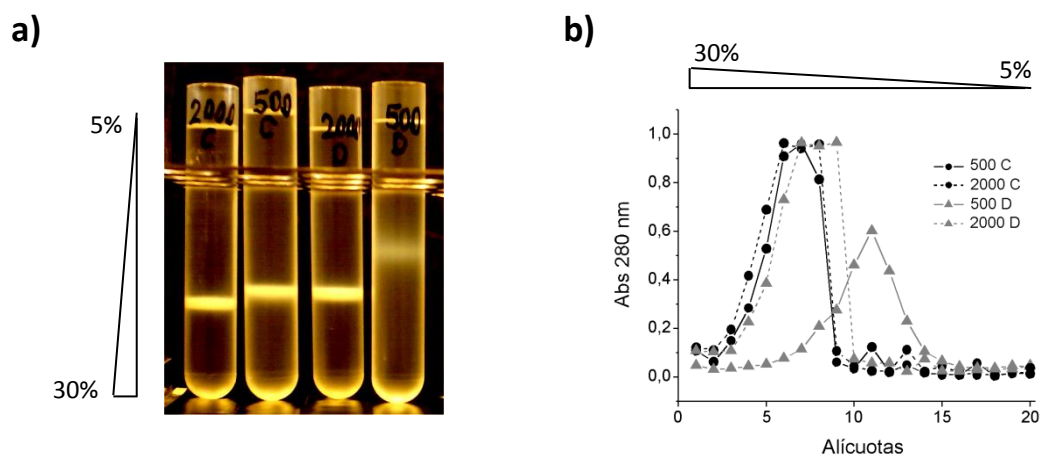


Figura 21. Gradientes de sacarosa de diferentes reconstituciones de KcsA. a) Fotos de los gradientes las reconstituciones L/P 500 y L/P 2000, por columna de sephadex G-50 (fino) (C) y por diálisis (D). **b)** Absorbancia a 280 nm de las alícuotas recogidas.

En resumen, mientras la reconstitución por columna se obtuvo de forma óptima con una relación L/P 500; la reconstitución por diálisis debe tener una relación L/P mínima de 2000, pues, como se comprobó en gradiente de sacarosa, la relación L/P de 500 por diálisis no se reconstituyó bien.

Debido a la rapidez del método de reconstitución por columna (una hora), frente a la lentitud de la diálisis (tres días), se concluyó que el método más óptimo para reconstituir KcsA en proteoliposomas de asolectina fue en columna de sephadex G-50 (fino) a una relación L/P de 500, y así se hizo en adelante.



VI Comprobación de la obtención de vesículas cerradas en la reconstitución de KcsA

Se comprobó la obtención de vesículas cerradas de KcsA reconstituido en asolectina mediante observación directa al microscopio electrónico (Figura 22). Para ello, KcsA se reconstituyó en vesículas de asolectina siguiendo el método optimizado mediante columna de sephadex G-50 (fino) a una relación L/P de 500. A continuación se congeló en nitrógeno líquido y se llevó a fotografiar al microscopio electrónico del laboratorio del Dr. Jose Luis Carrascosa de la Universidad Autónoma de Madrid utilizando un protocolo estándar para llevar a cabo la criomicroscopía.

Las vesículas fueron unilamelares grandes y multivesiculares, con pequeños puntos negros, probablemente correspondientes a los canales KcsA. Muchos de los puntos negros aparecían en grupos, como se observa en la ampliación de la Figura 22C.

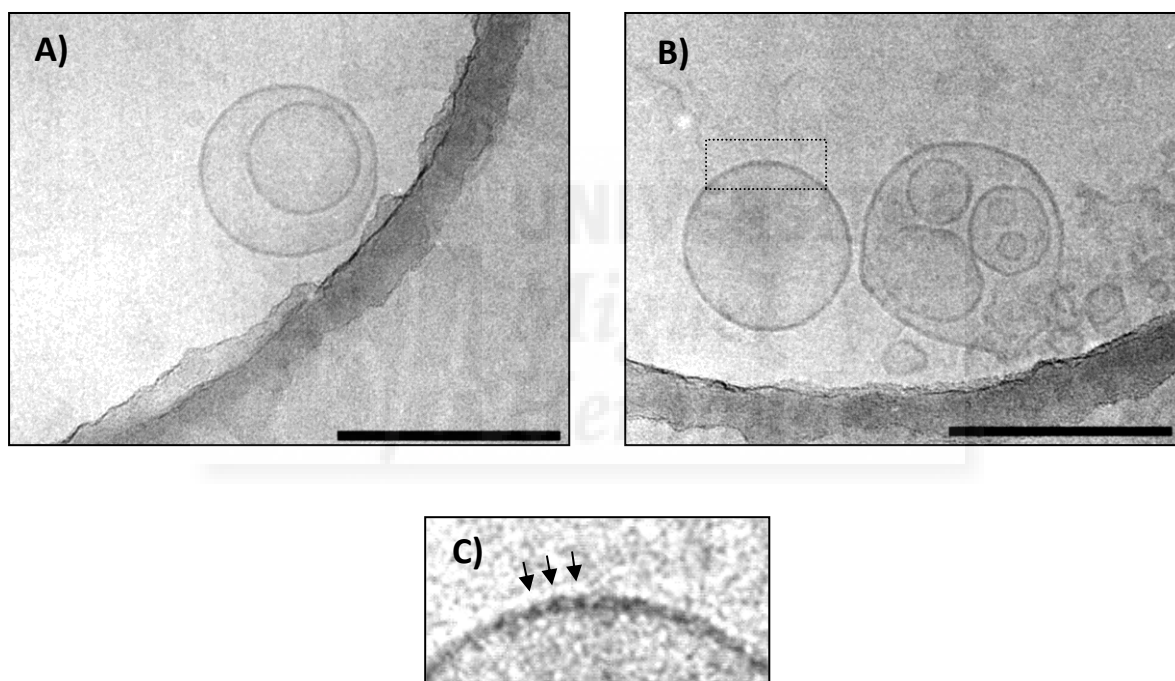


Figura 22. KcsA se reconstituye en vesículas cerradas. A) y B) Fotografías al microscopio electrónico de vesículas de asolectina que contienen KcsA reconstituido por sephadex G-50 (fino) a una relación L/P 500 (w/w). La barra corresponde a 250 nm. Las vesículas fueron unilamelares grandes y multivesiculares, con pequeños puntos negros, probablemente correspondientes a los canales KcsA. La sombra semicircular ancha que se observa en **A** y **B** corresponde al borde de la rejilla del portamuestras del microscopio electrónico. **C)** Ampliación de la membrana del recuadro en **B**, que muestra un grupo de puntos negros, probablemente correspondientes a la proteína reconstituida en la membrana lipídica.

VII Comprobación de la orientación de KcsA reconstituido en LUVs de asolectina

Un dato útil es conocer la orientación del canal KcsA cuando se reconstituye en las vesículas de asolectina. Para determinar la orientación de KcsA reconstituido en vesículas de asolectina se realizó inmunodetección del C-terminal tras proteólisis con quimotripsina.

Como se ha demostrado en esta Tesis y por otros grupos de investigación (Perozo et al, 1998), KcsA tiene la característica de tener un sitio de corte fácil por quimotripsina que elimina los 35 últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal, dando una banda característica de unos 45 KDa. Esta característica permite conocer la orientación de KcsA reconstituido en vesículas de asolectina. De forma que, si KcsA reconstituido se corta con quimotripsina en concentraciones limitantes indicará que se reconstituye orientado con el C-terminal hacia el exterior del liposoma, accesible a la quimotripsina; y si en cambio, no se corta con quimotripsina, indicará que KcsA reconstituido queda orientado con el C-terminal hacia el interior del liposoma, no accesible a la enzima. Para comprobarlo, se procedió a la proteólisis limitada de KcsA, solubilizado y reconstituido, con quimotripsina en las condiciones de proteólisis optimizadas previamente, a una relación KcsA:quimotripsina de 50:1, incubados durante 3h a 37 °C. El resultado obtenido fue que KcsA solubilizado mostraba toda la proteína tetramérica cortada de forma típica, por la accesibilidad de la quimotripsina a su sitio de corte; mientras que KcsA reconstituido mostraba una pequeña proporción del tetrámero (~5 %) sin cortar (Figura 23a). Este resultado indica que un 95% de la proteína reconstituida tenía el C-terminal accesible al corte con quimotripsina, y por tanto, orientada con el extremo C-terminal hacia el exterior de la vesícula (Figura 23b).

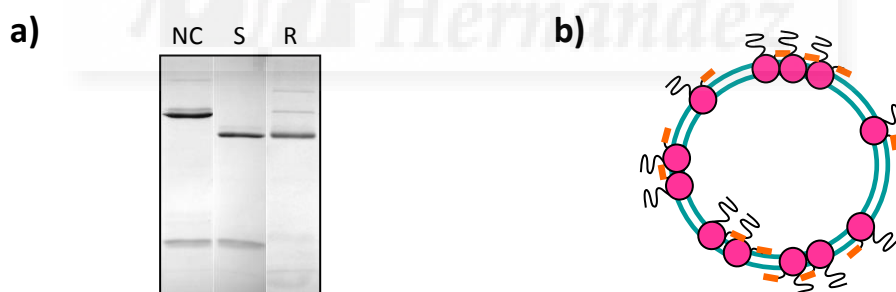


Figura 23. Orientación de KcsA reconstituido. a) SDS-PAGE al 13,5 % mostrando la proteólisis con quimotripsina de KcsA solubilizado y reconstituido en vesículas de asolectina. Calle NC = KcsA no cortado; Calle S = KcsA cortado solubilizado; Calle R = KcsA cortado reconstituido. b) Representación de KcsA reconstituido en un liposoma de asolectina con los extremos N- y C-terminal hacia fuera del liposoma. ● = indica la porción transmembrana de KcsA; — = indica la cola de histidinas de KcsA.

VIII Incorporación de KcsA y sus mutantes en liposomas gigantes de asolectina

Se prepararon liposomas multilamelares gigantes de asolectina, de un tamaño similar a una célula (de 20 a 100 μm de diámetro), que contenían KcsA o el mutante correspondiente, ideales para experimentos de electrofisiología y microscopía confocal. Los liposomas gigantes se prepararon sometiendo una mezcla de KcsA reconstituído en vesículas de asolectina (o el mutante correspondiente; de 25 a 100 μg de proteína), junto con vesículas unilamelares grandes (LUV) de asolectina (25 mg), a un ciclo de deshidratación parcial / rehidratación según el método de G. Riquelme et al (1990), como se esquematiza en la Figura 24. La solución de deshidratación usada fue tampón HEPES-K 10 mM, pH 7, conteniendo etilenglicol 5 %, y la solución de rehidratación fue tampón HEPES-K 10 mM, pH 7.

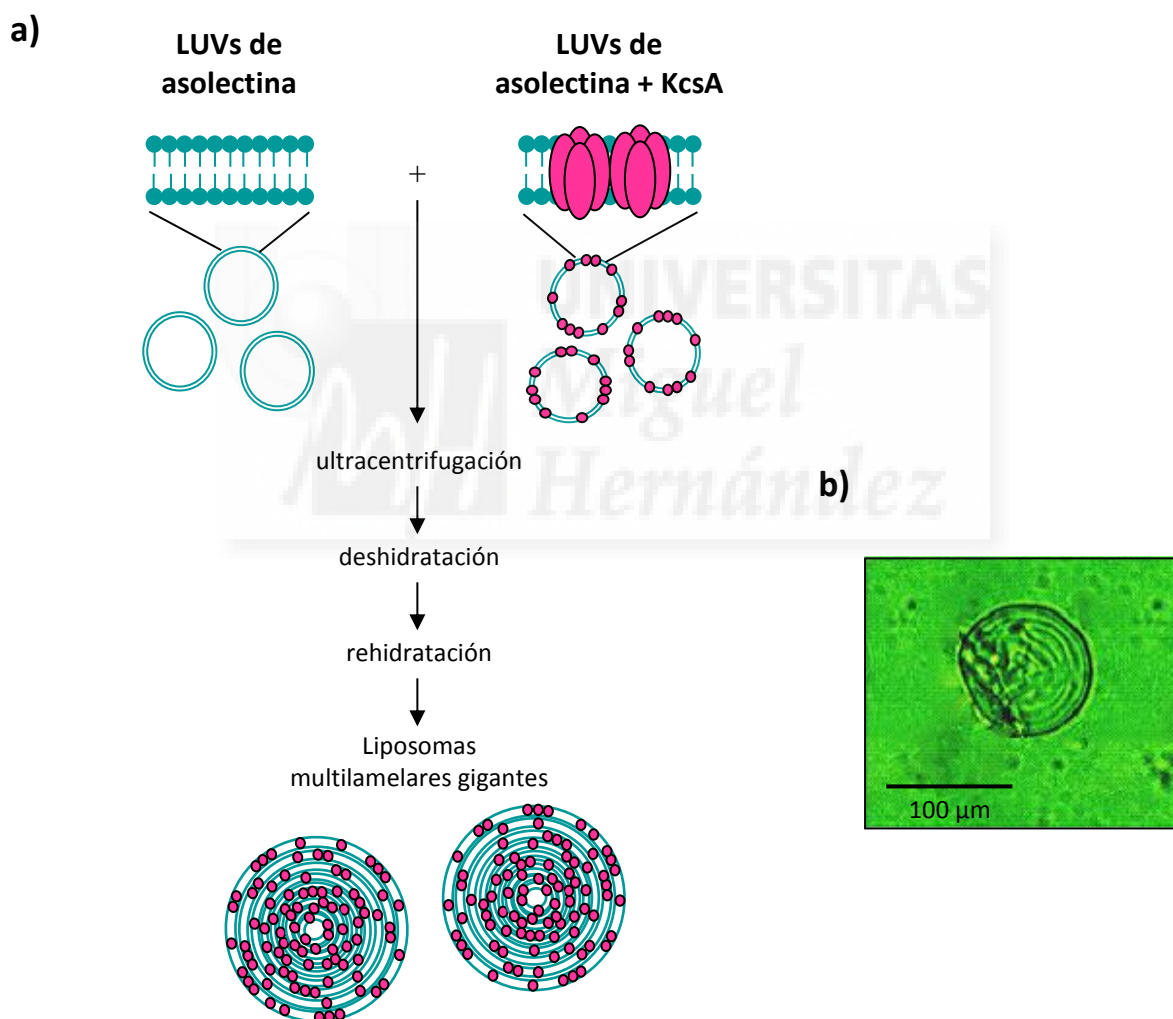


Figura 24. Formación de liposomas multilamelares gigantes de asolectina. a) Esquema del proceso de formación de liposomas multilamelares gigantes de asolectina conteniendo KcsA. Los liposomas gigantes resultantes tuvieron un tamaño de 20 a 100 μm de diámetro, como el que se adjunta en la microfotografía (b).

IX Registros electrofisiológicos de la actividad de KcsA mediante *Patch-Clamp*IX.1 Sistema de registro de la actividad de KcsA en liposomas gigantes de asolectina mediante *patch-clamp* de parche escindido en configuración "inside-out"

Una vez preparada la proteína en liposomas gigantes de asolectina se procedió al registro de su actividad electrofisiológica mediante *patch-clamp* de parche escindido en configuración "inside-out" (Figura 25).

Para ello, se depositaron alícuotas de 3-6 μl de liposomas gigantes de asolectina que contenían KcsA en discos de Petri de 3.5 cm, y se mezclaron, normalmente, con 2 ml de tampón MES 10 mM, pH 4, 100 mM KCl en el baño (solución del baño) para el registro electrofisiológico. Se formaron giga sellos succionando levemente en la superficie de los liposomas gigantes con microelectrodos (micropipetas que contenían electrodos) de borosilicato de punta de 1 μm de diámetro y 7-10 $\text{M}\Omega$ de resistencia en abierto. El microelectrodo estaba relleno, normalmente, con tampón HEPES 10 mM, pH 7, 100 mM KCl (solución de la pipeta). Después del sellado, el parche escindido se formó mediante la retirada de la pipeta de la superficie del liposoma.

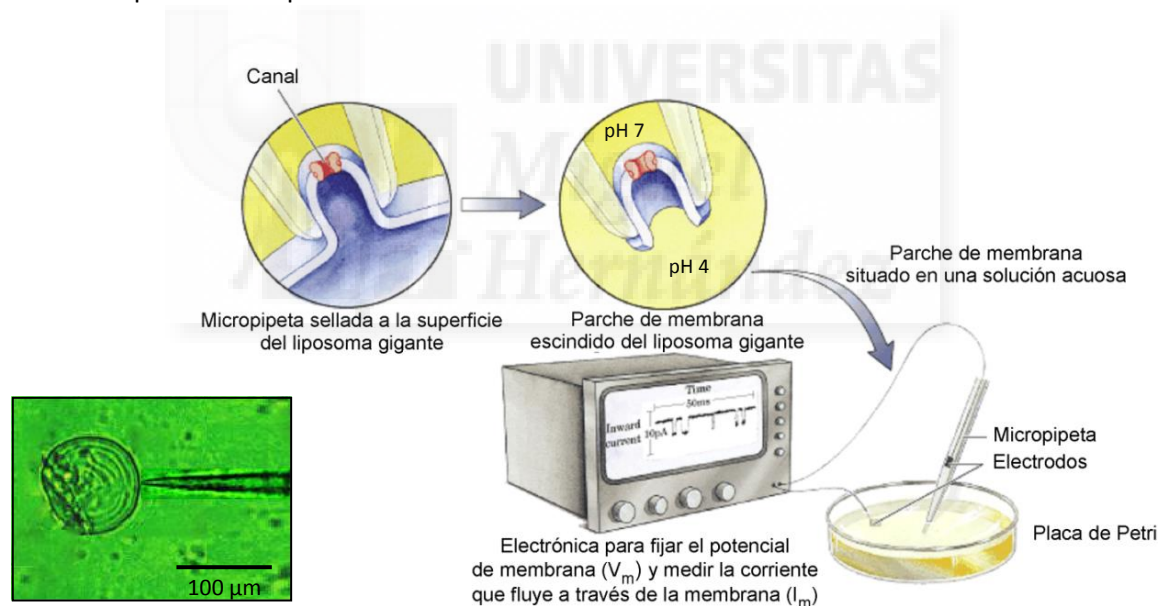


Figura 25. Esquema del sistema de registro de la actividad de KcsA en liposomas gigantes mediante *patch-clamp* de parche escindido en configuración "inside-out". La actividad del canal se determina midiendo el flujo de iones a través del mismo, usando la técnica de *patch-clamp*. Se presiona una micropipeta muy fina contra la superficie celular, y la presión negativa en la pipeta se usa para formar un sello de presión entre la pipeta y la membrana. Cuando la pipeta es retirada de la célula, arranca un pequeño trozo ("patch") de membrana (que puede contener uno o varios canales iónicos). Cuando la pipeta y el trozo adherido se sitúan en una solución acuosa, se puede medir la actividad del canal en función de la corriente eléctrica que fluye entre los contenidos de la pipeta y la solución acuosa. En la práctica, se crea un circuito que "fija" ("clamps") el potencial transmembrana a un valor dado y mide la corriente que debe fluir para mantener este voltaje. Con detectores de corriente muy sensibles, se puede medir la corriente que fluye a través de un canal iónico individual, que es, típicamente, de unos pocos picoamperios. La traza que muestra la corriente en función del tiempo (en ms) revela la rapidez a la cual se abre y se cierra el canal, la frecuencia de apertura y el tiempo que permanece abierto. "Fijando" el V_m a diferentes valores se consigue la determinación del efecto del potencial de membrana sobre estos parámetros de la función del canal. Las soluciones utilizadas normalmente en esta Tesis Doctoral para el registro de la actividad de KcsA fueron MES 10 mM, pH 4, 100 mM KCl en el baño y Hepes 10 mM, pH 7, 100 mM KCl en la pipeta. (Tomado de Lehninger, 5^o Ed., 2008)

Se realizaron registros de patch-clamp “inside-out” standard (O.P., Hamill et al, 1981) con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, EEUU) en España, y con un amplificador EPC-9 (Heka Electronic, Lambrecht/Pfalzt, Alemania) en Chile y en España, a una ganancia de 50 mV/pA.

El potencial de comando se aplicó al interior de la pipeta de patch, y el baño actuaba de tierra virtual, cuyo electrodo de referencia fue un alambre de Ag-AgCl conectado al baño a través de un puente de agar.

$$V = V_{\text{baño}} - V_{\text{pipeta}}$$

El potencial de unión se compensó cuando fue necesario.

IX.2 Protocolos de adquisición de datos

De forma rutinaria, la actividad de los canales se registró en los parches de membrana escindidos mediante la aplicación de protocolos de adquisición de datos definidos en rampas de voltaje, pulsos cortos a distintos voltajes o mediante la aplicación de un voltaje fijo continuo (Figura 26). El protocolo de rampa de voltaje consistió en la aplicación de un barrido de los voltajes comprendidos entre -200 mV y +200 mV durante 3 segundos (133.3 mV/s), y volviendo el voltaje a 0 mV tras la aplicación de la rampa, registrado a una frecuencia de 5 kHz (200 μ s). El protocolo de pulsos consistió en la aplicación de 9 pulsos de voltaje constante a intervalos de 50 mV, entre -200 mV y +200 mV, de 2 segundos de duración cada uno, y volviendo el voltaje a 0 mV entre cada pulso de voltaje, registrado a una frecuencia de 8 kHz (125 μ s). El protocolo de voltaje continuo consistió en la aplicación de un voltaje fijo durante 30 segundos, 1 minuto o 2 minutos, registrado a una frecuencia de 10 kHz (100 μ s).

Tras la adquisición de datos, normalmente los registros se filtraron a 1 kHz (1000 μ s) con un filtro 8-pole Bessel (Frequency Devices, EEUU) y los datos se analizaron con el software del pClamp9 (Axon Instruments, USA). Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente.

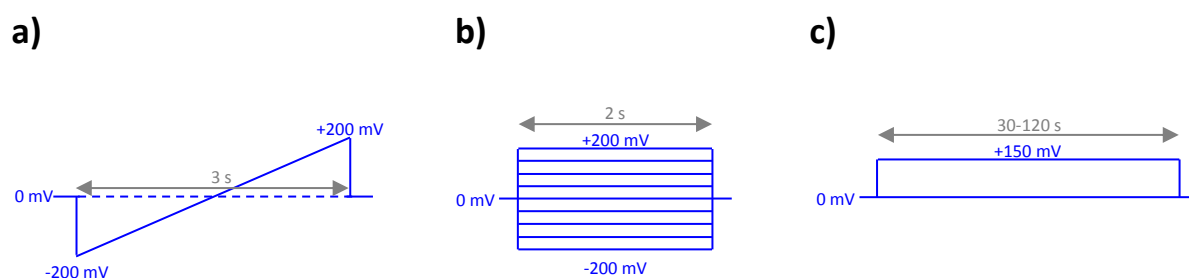


Figura 26. Protocolos de adquisición de datos de patch-clamp utilizados para KcsA en parche de membrana escindido. a) Esquema del protocolo de rampa de voltaje. **b)** Esquema del protocolo de pulsos de voltaje. **c)** Esquema del protocolo de voltaje continuo.

IX.3 Optimización de la concentración de KcsA en los liposomas gigantes para el registro de su actividad

Para optimizar la concentración de KcsA a utilizar en los liposomas gigantes para su registro de actividad mediante patch-clamp de parche escindido en configuración "inside-out", se prepararon liposomas gigantes de asolectina con diferentes cantidades de proteína: 25, 50 o 100 μg de KcsA reconstituido, por el método de deshidratación parcial / rehidratación (G. Riquelme et al, 1990, ver apartado 1.9) y se registró su actividad bajo idénticas condiciones experimentales (pH 4 en la solución del baño y pH 7 en la pipeta, ver Apdo. 0.10.1).

Los registros de KcsA mostraron patrones de actividad de canal iónico cualitativamente similares, es decir, el tipo de actividad de KcsA no varió con las diferentes cantidades de proteína utilizada, pero sí mostró diferencias cuantitativas, afectándose la saturación de actividad y la probabilidad de encontrar o no un sello silente, encontrándose un mayor número de eventos conforme se incrementó la cantidad de proteína. Con 100 μg (n=23 sellos) sólo se encontraron 2 sellos silentes (9%) y los sellos activos tenían exceso de actividad, encontrando un número de canales tan elevado que hacía difícil distinguir aperturas de canal único para su análisis, indicando que el liposoma estaba saturado de proteína. Con 25 y 50 μg (n=35 y n=150 sellos, respectivamente) se encontró una mayor proporción de sellos silentes (31% y 38%, respectivamente). Los sellos activos no tenían exceso de actividad y permitían distinguir fácilmente las aperturas de canal único para su análisis, indicando que no había exceso de proteína en estos liposomas. Así, se concluyó que la cantidad óptima de KcsA para su registro de actividad en liposomas gigantes mediante patch-clamp de parche escindido en configuración "inside-out" fue de 50 μg . Por ello, en adelante se analizaron los sellos procedentes de liposomas gigantes preparados con 50 μg de KcsA, y todos los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral corresponderán a este tipo de preparaciones.

Los experimentos fueron hechos en diferentes laboratorios (en el laboratorio de la Dra. Gloria Riquelme en la Universidad de Chile, en el laboratorio del Dr. Franciso Sala en el Instituto de Neurociencias de Alicante y en nuestro laboratorio en el IBMC), utilizando diferentes purificaciones de KcsA y reconstituciones en liposomas gigantes y siempre se obtuvo el mismo resultado. Se obtuvieron diferentes patrones de actividad, bajo idénticas condiciones experimentales, independientemente del momento y lugar donde se hicieron, así como de la producción de KcsA y su reconstitución en liposomas gigantes. Así mismo, los diferentes patrones de actividad fueron a menudo obtenidos en diferentes parches de la misma preparación de liposomas gigantes.

Como control, se comprobó periódicamente la ausencia de actividad de canal iónico en un número suficientemente alto de parches escindidos de liposomas gigantes de asolectina sin KcsA. Las preparaciones de liposomas de asolectina sin KcsA que mostraban dificultades para obtener sellos de elevada resistencia o que, ocasionalmente, mostraron registros con línea base ruidosa e irregular, provocada normalmente por restos de detergente, fueron descartadas.

IX.4 Optimización de la composición de lípidos para la formación de liposomas gigantes y el registro de su actividad.

Se hicieron diferentes mezclas lipídicas (lípidos de Avanti Polar Lipids) para comprobar la capacidad de formar liposomas gigantes y de resistir la formación de sellos para el registro de actividad mediante patch-clamp de parche excindido. Como conclusión se obtuvo que:

1-para formar liposomas gigantes se necesita poner un lípido aniónico, como mínimo a una proporción mayor del 1% (relación molar), como por ejemplo: PA, PG, PS.

2-PC sólo o combinaciones con PE impiden la formación de liposomas gigantes.

3-la adición de colesterol (por ejemplo el 25%) ayuda a la formación de sellos.

Así, algunos ejemplos de mezclas buenas para liposomas gigantes son: asolectina, PA, PG, PA:PC, PG:PC, PA:PC:col, PG:PC:col, siempre con lípido aniónico (PA o PG) en una proporción mayor del 1%.





RESUMEN DE RESULTADOS/ SUMMARY OF RESULTS





Modulación de las propiedades funcionales del canal de potasio de *Streptomyces lividans*, KcsA

El trabajo de la presente Tesis Doctoral comenzó con la recepción en nuestro laboratorio del gen *kcsA*, de *Streptomyces lividans*, amablemente cedido por el grupo del Dr. Antonio Ferrer. Se puso a punto la metodología de la expresión, purificación, reconstitución y registro electrofisiológico de KcsA. Los registros de la actividad de KcsA se realizaron mediante patch-clamp en parche escindido de liposomas gigantes que contenían el canal de potasio KcsA purificado. La caracterización funcional de KcsA se llevó a cabo en los equipos de electrofisiología de los laboratorios de la Dra. Gloria Riquelme en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile, el laboratorio del Dr. Francisco Sala en el Instituto de Neurociencias de Alicante y, posteriormente tras adquirir un equipo de registro electrofisiológico, en nuestro laboratorio en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la UMH.

Así, se estudió el papel del C-terminal en la tetramerización del canal, se caracterizó su actividad funcional, su modulación por diferentes agentes como el pH, lípidos o péptidos, y se estudió la posibilidad de inactivación rápida en KcsA por aplicación del péptido inactivante de *Shaker*, ShB. Los resultados principales obtenidos publicados en revistas científicas de alto impacto internacional o aceptados para su publicación, se resumen a continuación:

1- Se descubrió que el segmento 120-124, ERRGH, del C-terminal de KcsA es necesario para la tetramerización del canal (Molina et al, 2004).

2- Se observó que la actividad de KcsA cambia profundamente en función de la agrupación y el acoplamiento funcional de los canales, dando explicación a la controversia en la caracterización funcional previa del canal llevado a cabo por otros grupos de investigación (Molina et al, 2006; Giudici et al, 2013).

3- Se descubrió que los lípidos aniónicos modulan la actividad de KcsA y que dicha modulación se produce a través de cambios en la agrupación y/o el acoplamiento funcional de los canales (Molina et al, enviado).

4- Se realizaron modelos de interacción lípido-proteína y proteína-proteína entre canales de KcsA que nos permitieron proponer una hipótesis que explica la actividad de tipo LOP, de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales de KcsA. Se sugiere que el desacoplamiento funcional podría estar asociado a la inactivación de tipo C de los canales (Molina et al, enviado).

5- Se demostró que KcsA se inactiva por el péptido inactivante procedente del canal de potasio eucariota *Shaker*, ShB, enfatizando la homología existente entre ambos canales. Se observó que la inactivación de tipo N también está asociada al desacoplamiento funcional de los canales, y mediante RMN se hallaron los aminoácidos del péptido que interaccionan con el canal, contribuyendo a dilucidar el epítipo de unión a su diana farmacológica (Molina et al, 2008). Se descubrió un péptido activante de canales de potasio (pendiente de patente).

Modulating the functional properties of the potassium channel from *Streptomyces lividans*, KcsA

The work of this PhD Thesis began with the reception of the *kcsA* gene of *Streptomyces lividans* in our laboratory, kindly provided by Dr. Antonio Ferrer group. We carried out the optimization of the methodology of the expression, purification, reconstitution and electrophysiological recording of KcsA. These recordings were made by using the patch-clamp methodology in excised membrane patches of giant liposomes containing purified potassium channel KcsA. Then, the functional characterization of KcsA was performed on electrophysiology equipment from the laboratory of Dr. Gloria Riquelme at the Institute of Biomedical Sciences, University of Chile; from the laboratory of Dr. Francisco Sala at the Institute of Neuroscience of Alicante; and from our laboratory at the Institute of Molecular and Cell Biology at the University Miguel Hernandez in Elche.

We studied the role of their C-terminal on channel tetramerization, we characterized the functional activity of KcsA, their modulation by pH, lipids or peptides, and the fast inactivation mechanism. The main results obtained published in international high impact scientific journals or accepted for publication are following:

1- It was found that amino acids 120-124, ERRGH, of the C-terminus of KcsA are involved in channel tetramerization (Molina et al, 2004).

2- It was reported the clustering and functional coupling of KcsA channels as a striking way to modulate the functional properties of KcsA channels (Molina et al, 2006; Giudici et al, 2013).

3- It was discovered that anionic lipids modulate the activity of KcsA and that this modulation occurs through changes in clustering and / or functional coupling of the channels (Molina et al, send to publish).

4- Models of lipid-protein and protein-protein interaction between KcsA channels were made. These models allowed us to propose a hypothesis to explain the LOP and HOP activity, and the functional coupling between KcsA channels (Molina et al, send to publish).

5- It was demonstrated that the potassium channel KcsA is inactivated by the ball peptide from the eukaryotic potassium channel *Shaker*, ShB, emphasizing the homology between the two channels. It was observed that inactivation is associated with functional uncoupling of the channels. And by NMR, the amino acids of the peptide that interact with the channel were found, contributing to elucidate the epitope of binding to target (Molina et al, 2008). An activating peptide of potassium channels (patent pending) was discovered.

RESULTADOS





PUBLICACIÓN 1



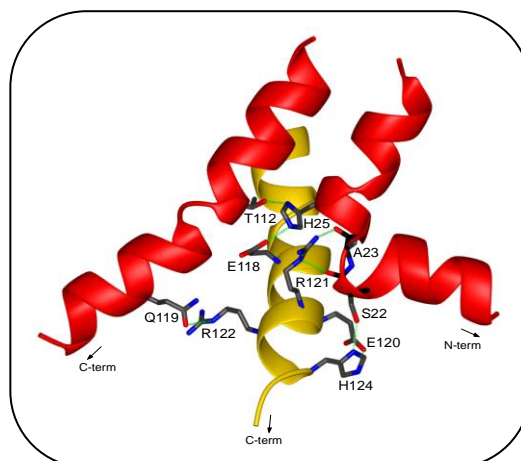


1.1 INFLUENCIA DEL DOMINIO C-TERMINAL E INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA EN LA TETRAMERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DEL CANAL DE POTASIO, KCSA

Molina, M. L., Encinar, J. A., Barrera, F. N., Fernández-Ballester, G., Riquelme, G., and González-Ros, J. M. (Biochemistry, 2004)

RESUMEN

KcsA es un canal de potasio procariota formado por el ensamblaje de cuatro subunidades idénticas alrededor de un poro acuoso central. A pesar de conocerse la estructura en alta resolución de rayos X de la porción transmembrana de KcsA [Doyle, DA, Morais, CJ, Pfuetzner, RA, Kuo, A., Gulbis, JM Cohen, SL, Chait, BT, y MacKinnon, R. (1998) Science 280, 69-77], la identificación de los determinantes moleculares que participan en la tetramerización de las subunidades está por determinar. Aquí, se han utilizado mutantes del canal delecionados en su C-terminal, KcsA $\Delta 125-160$ y $\Delta 120-160$, así como KcsA 1-125 obtenido por corte con quimotripsina de KcsA 1-160, de longitud completa, para evaluar el papel del C-terminal en la estabilidad y ensamblaje tetramérico del canal. Hemos encontrado que la falta del dominio citoplásmico C-terminal de KcsA, y más críticamente la secuencia 120-124, impide el ensamblaje tetramérico de las subunidades del canal en un sistema de expresión heteróloga de E. coli. El modelado molecular de KcsA predice que, de hecho, tal secuencia proporciona sitios de interacción entre subunidades por enlaces de hidrógeno a aminoácidos de los segmentos N-y C-terminales de subunidades adyacentes. Sin embargo, una vez que el tetrámero de KcsA está ensamblado, su remarcable estabilidad a la disociación de las subunidades frente a detergentes o frente al calor no está influenciada por si el dominio C-terminal continúa formando parte de la proteína o no. Por último y más interesante, se observa que, incluso en ausencia del dominio C-terminal implicado en tetramerización, la reconstitución en lípidos de membrana promueve muy eficientemente la tetramerización in vitro de KcsA, un evento que es probablemente mediado por interacciones hidrofóbicas adecuadas en los dominios intramembrana de la proteína.





Influence of C-Terminal Protein Domains and Protein–Lipid Interactions on Tetramerization and Stability of the Potassium Channel KcsA[†]

M. L. Molina,[‡] J. A. Encinar,[‡] F. N. Barrera,[‡] G. Fernández-Ballester,[‡] G. Riquelme,[§] and J. M. González-Ros^{*,‡}

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain, and Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70005, Santiago 7, Chile

Received May 31, 2004; Revised Manuscript Received August 31, 2004

ABSTRACT: KcsA is a prokaryotic potassium channel formed by the assembly of four identical subunits around a central aqueous pore. Although the high-resolution X-ray structure of the transmembrane portion of KcsA is known [Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* 280, 69–77], the identification of the molecular determinant(s) involved in promoting subunit tetramerization remains to be determined. Here, C-terminal deletion channel mutants, KcsA Δ 125–160 and Δ 120–160, as well as 1–125 KcsA obtained from chymotrypsin cleavage of full-length 1–160 KcsA, have been used to evaluate the role of the C-terminal segment on the stability and tetrameric assembly of the channel protein. We found that the lack of the cytoplasmic C-terminal domain of KcsA, and most critically the 120–124 sequence stretch, impairs tetrameric assembly of channel subunits in a heterologous *E. coli* expression system. Molecular modeling of KcsA predicts that, indeed, such sequence stretch provides intersubunit interaction sites by hydrogen bonding to amino acid residues in N- and C-terminal segments of adjacent subunits. However, once the KcsA tetramer is assembled, its remarkable in vitro stability to detergent or to heat-induced dissociation into subunits is not greatly influenced by whether the entire C-terminal domain continues being part of the protein. Finally and most interestingly, it is observed that, even in the absence of the C-terminal domain involved in tetramerization, reconstitution into membrane lipids promotes in vitro KcsA tetramerization very efficiently, an event which is likely mediated by allowing proper hydrophobic interactions involving intramembrane protein domains.

Potassium channels are highly complex membrane proteins widely distributed in different cell types of practically all living organisms, where they contribute to the control of potassium flow, cell volume, release of hormones and neurotransmitters, resting potential, excitability, and behavior (1). Back in 1995, a rather simple member of the potassium channel family, the so-called KcsA,¹ was identified in *Streptomyces lividans* (2). The ease of heterologous expression of KcsA in an *Escherichia coli* system, its resistance to a variety of detergents, and its purification in large quantities as His tag derivatives have allowed remarkable achievements in this field such as its crystallization and structural determination at high resolution using X-ray diffraction methods (3). KcsA can also be reconstituted into lipid bilayers, allowing for its functional characterization as a voltage- and

pH-dependent potassium channel (2, 4–8). Thus, the possibility of securing both high-resolution structural and functional data on this molecule makes KcsA an obliged reference model in ion channel studies.

KcsA is a homotetramer in which each subunit is made up of 160 amino acids (Figure 1) defining two transmembrane segments connected by a pore region that contains an ion selectivity filter unmistakably homologous to the more complex eukaryotic potassium channels. The transmembrane segment M2, nearest to the C-terminal, contributes to the lining of the pore, while the one closest to the N-terminal, M1, is exposed to the membrane bilayer (3). Additionally, the N- and C-termini are included, respectively, in two relatively large cytoplasmic domains, rich in charged or polar amino acid residues. These latter domains were not resolved in the crystal structure, which accounted only for the membrane-inserted 23–119 amino acids in the KcsA sequence (3). Nevertheless, electron spin resonance studies provided evidence that these protein domains form a fenestrated “hanging basket”-like structure underneath the membrane (6), through the openings of which ions must pass prior to their arrival to the transmembrane channel pore.

In an in vitro transcription and translation *E. coli* system, KcsA monomers have been reported to be targeted cotranslationally via the signal recognition particle pathway to the internal bacterial membrane (9), where the assembly of the

[†] Partly supported by a grant from the Spanish DGI BFI 2002-03410. M.L.M. and F.N.B. are recipients of predoctoral fellowships from the Generalitat Valenciana and Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain, respectively.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: + 34 96 6658757. Fax: + 34 96 6658758. E-mail: gonzalez.ros@umh.es.

[‡] Universidad Miguel Hernández.

[§] Universidad de Chile.

¹ Abbreviations: KcsA, potassium channel from *Streptomyces lividans*; DDM, dodecyl β -D-maltoside; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate; T1, N-terminal or first tetramerization domain from the eukaryotic voltage-activated *Shaker* potassium channel.

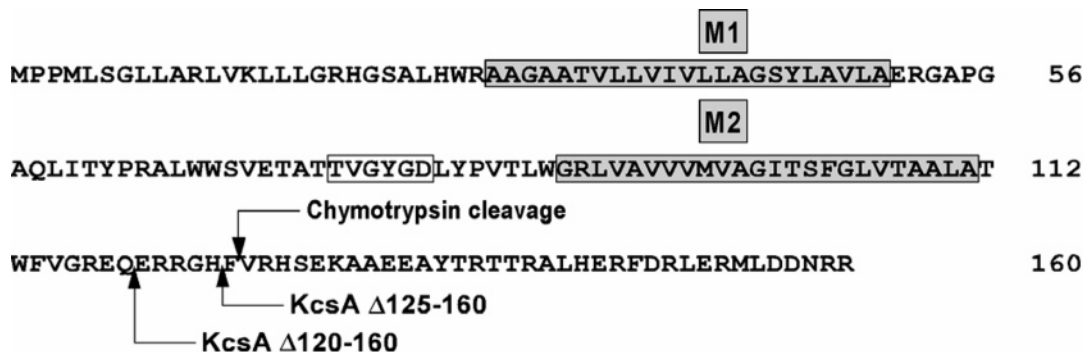


FIGURE 1: Amino acid sequence of the KcsA potassium channel from *S. lividans* (SWISS-PROT accession number Q54397). The boxes indicate the transmembrane segments M1 and M2 and the characteristic selectivity filter (TVGYGD). The arrows indicate the chymotrypsin cleavage site yielding 1–125 KcsA and the resulting C-termini in the KcsA Δ125–160 and Δ120–160 deletions. A hexahistidine tag (sequence MRGSHHHHHHGS) was bound to the methionine N-terminus in all cases.

membrane-inserted monomers into highly stable tetramers proceeds efficiently and rapidly, through a process influenced by the membrane proton-motive force (10). Nonetheless, the molecular determinant(s) involved in promoting subunit tetramerization remains to be identified. Using a heterologous *E. coli* expression system, we now report that KcsA deletion mutants in which part of the cytoplasmic C-terminal is lacking assemble poorly into tetramers. However, we also found that in those C-terminal deletions unable to assemble as tetramers, the expressed monomeric subunits tetramerize very efficiently upon reconstitution into artificial lipid vesicles. This latter observation lends support to a role for the lipid environment in contributing to the assembly of oligomeric membrane proteins and reinforces the idea that membrane lipids and protein–lipid interactions could be important determinants in membrane protein folding (11).

MATERIALS AND METHODS

Constructs. The wild-type KcsA construct was a gift from Drs. Marco Caprini and Antonio Ferrer-Montiel. It contained the *kcsA* gene of *S. lividans* cloned in frame into the pQE30 vector (Qiagen), which provided ampicillin resistance and an N-terminal hexahistidine tag. The KcsA Δ125–160 and Δ120–160 constructs were generated from the wild-type construct by reverse PCR using *Pfu* DNA polymerase (Fermentas), sense primer 5′-CGG TGA GGA TCC ATC CGC ATG CGA GCT CGG TAC CCC for both deletions, and antisense primers 5′-GCG GAT GGA TCC TCA GTG GCC CCG GCG CTC TTG TTC and 5′-GCG GAT GGA TCC TCA TGG TTC CCG GCC GAC GAA CCA, respectively, for the KcsA Δ125–160 and Δ120–160 deletions. These primers include the restriction sequence for *Bam*HI (5′-GGA TCC) to allow for the elimination of the desired C-terminals. PCR products were precipitated by standard phenol/chloroform, digested with *Bam*HI (Fermentas), purified, and ligated overnight by T4 DNA ligase (Roche Diagnostics). *E. coli* XL1-blue strain cells were transformed and plated on LB agar containing ampicillin (50 μg/mL). Screening of 12 colonies was carried out for each ligation by extracting the plasmid and digesting it with *Bam*HI to check if the deletions had been introduced successfully. Also, the entire plasmid from positive colonies was digested with *Pvu*II (Fermentas), whose restriction sequence is present in the constructs at a single position, and run in a 10% PAGE in Tris–acetate buffer to check for the correct size of the

deletions. The constructs were also checked by dideoxynucleotide sequencing.

Protein Expression and Purification. A modification of published procedures (2, 12) was used here. Kanamycin-resistant *E. coli* M15 (pRep4) cells were transformed with the above constructs following standard heat-shock procedures and plated overnight on LB agar containing ampicillin (50 μg/mL) and kanamycin (25 μg/mL). A single colony was picked up and grown overnight in 100 mL of LB medium supplemented with antibiotics. This culture was diluted into 1 L of 2xYT medium supplemented with antibiotics and grown at 30 °C to exponential phase ($OD_{600nm} = 0.6–0.8$). Protein expression was induced by 0.5 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside for 2 h. Cells were pelleted, washed with 1% NaCl, resuspended in 50 mL of lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 0.45 M sucrose, 8 mM EDTA, 0.4 mg/mL lysozyme, and 0.75 mM PMSF), and kept on ice for 1 h. The mixture was sonicated on an ice bath using a Branson probe-type apparatus and centrifuged for 1 h at 100000g. Membrane proteins in this crude membrane pellet were solubilized in 20 mL of 20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM imidazole, 0.75 mM PMSF, and 10 mM *n*-dodecyl β-D-maltoside (DDM; Calbiochem) for 1 h at room temperature. After centrifugation of insoluble remains (1 h at 100000g), the supernatant was incubated overnight with 3.5 mL of Ni²⁺-NTA agarose gel beads (Qiagen), placed into a column, and washed with 20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM imidazole, and 1 mM DDM, until the absorbance at 280 nm was less than 0.01. The gel-bound protein was eluted using the previous buffer containing 1 M imidazole. Protein aliquots were mixed with an equal volume of electrophoresis sample buffer (20 mM Tris, pH 6.8, 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue, and 4% SDS) and run in 13.5% PAGE in the presence of 0.1% SDS (13). Alternatively, the sample was dialyzed in buffer without imidazole and the protein concentration determined by the DC-Protein assay (Bio-Rad), relative to a bovine serum albumin standard. Yields were 2–4 mg of DDM-solubilized purified protein/L of culture for the wild-type KcsA construct and 0.9–1.0 and 0.5–0.6 mg/L, respectively, for the KcsA Δ125–160 and Δ120–160 deletions.

Chymotrypsin Hydrolysis. The entire 1–160 KcsA was converted into 1–125 KcsA by treatment with chymotrypsin type II (Sigma) for 3 h at 37 °C, using a protein subunit:

enzyme ratio of 50:1 (by weight). The reaction was stopped by addition of 5 mM PMSF. Specific removal of the 126–160 protein segment was demonstrated by MALDI tryptic-peptide mass fingerprinting in excised electrophoresis bands from entire 1–160 and hydrolyzed 1–125 KcsA preparations (14, 15).

Reconstitution of Proteins into Asolectin Lipid Vesicles. Large unilamellar vesicles of asolectin (soybean lipids, type II-S, Sigma) were prepared (16) at 25 mg/mL in 10 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KCl (reconstitution buffer) and stored in liquid N₂.

Purified DDM-solubilized protein was mixed with the above asolectin vesicles previously resolubilized in 5 mM DDM, at a lipid:protein subunit molar ratio of 2000:1, for 2 h. Reconstituted liposomes were formed by removing the detergent by gel filtration on Sephadex G-50 (fine, 15–20 mL bed volume), previously swollen overnight in buffer without detergent (7). The detergent-solubilized lipid/protein mixture (2 mL) was loaded on top of the column, and the reconstituted liposomes were eluted in the void volume at 2 mL/min. The protein-containing reconstituted fractions were pooled and centrifuged for 30 min at 300000g. The pellet was resuspended into 1 mL of reconstitution buffer, divided into 100 μ L aliquots, and stored in liquid N₂.

Thermal Stability of KcsA. Routinely, aliquots of DDM-solubilized or asolectin-reconstituted KcsA samples were mixed with an equal volume of SDS-containing electrophoresis sample buffer (see above), incubated for 20 min at selected temperatures, cooled on ice for approximately 10 min, and examined by SDS-PAGE. After Coomassie Brilliant Blue staining, the gels were scanned and the intensities of the bands measured by densitometry.

Molecular Modeling. A full-length KcsA structural model was obtained with the commercial program Insight II (Biosym/MSI) using the α -carbon trace (PDB entry 1F6G) from Cortes et al. (6) as the template. The crystallographic structure determined for 23–119 KcsA (PDB entry 1BL8) was then superimposed and transplanted to the model to get the correct dihedral angles and side chain rotamers within the transmembrane portion of the protein (residues L24 to V115). The orientation and optimization of the side chains corresponding to the cytoplasmic N- and C-termini was carried out in three steps: First, those residues making van der Waals clashes were selected and fitted with “quick and dirty” algorithms. Second, the model was energy minimized (100 steps of steepest descent and 100 of conjugate gradient, cutoff of 10 Å for nonbonded interactions) with the GROMOS 43A1 force field, implemented in Swiss PDB viewer v3.7 (17), to relax the backbone and side chains. Third, final side chain orientations were found with the computer-designed algorithm PERLA (described in detail at <http://proteindesign.embl.de>) as described previously (18–20). The model was tested by PROCHECK (21), showing a Ramachandran plot with 82.9% of the residues in the most favored regions and 17.1% in additional allowed regions.

RESULTS

Following purification from DDM-solubilized bacterial lysates, the N-terminal His tag derivative of full-length 1–160 KcsA is obtained primarily as an SDS-resistant tetramer, as seen by conventional SDS-PAGE of unboiled

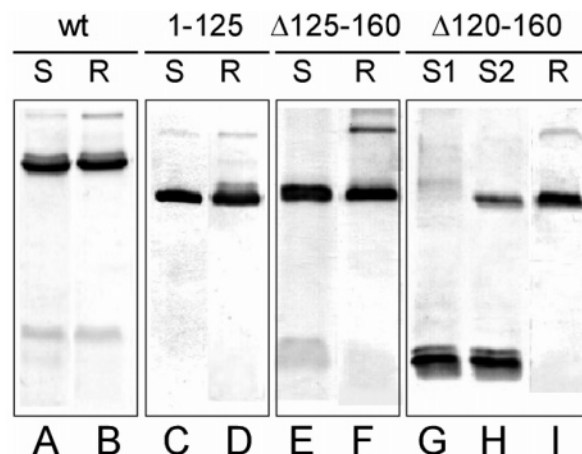


FIGURE 2: Representative SDS-PAGE profile of nonheated aliquots of wild-type 1–160 KcsA (lanes A and B) and 1–125 KcsA (lanes C and D) and the deletion products KcsA Δ 125–160 (lanes E and F) and KcsA Δ 120–160 (lanes G–I). “S” lanes correspond to the DDM-solubilized and purified proteins (lanes A, C, E, G, and H), while “R” lanes correspond to samples reconstituted into asolectin lipid vesicles (lanes B, D, F, and I). Lanes G and H (also labeled as S1 and S2) correspond to separate pools of different chromatographic fractions from the purified KcsA Δ 120–160 deletion (the one in lane G being almost exclusively monomeric) obtained by eluting the Ni²⁺ affinity gel with an imidazole gradient. Lane I, which is almost exclusively tetrameric, corresponds to reconstitution into asolectin lipid vesicles of all chromatographic pools of the solubilized protein (as in G and H) mixed together.

samples (Figure 2, lanes A and B) (4, 22). Western blots show strong reactivity of this protein band against commercial anti-His-tag monoclonal antibodies, thus confirming it as the expression product of the KcsA construction (not shown). Routinely, this major tetrameric species is accompanied by monomeric KcsA as a minor component, and in sufficiently loaded gels, higher molecular weight, SDS-resistant KcsA multimers can also be observed.

The KcsA tetramer is also remarkably resistant to heat (10, 12, 22–24). Figure 3A shows that indeed dissociation by heat of DDM-solubilized tetramers into monomers, when dissolved in SDS-containing electrophoresis buffer prior to undergoing the heating routine (see the Materials and Methods), shows a midpoint temperature of approximately 76 °C under our experimental conditions (Figure 4A). Such a midpoint temperature for dissociation under those conditions is increased by approximately 10 °C if the purified KcsA is reconstituted into asolectin lipids prior to dissolving it into SDS-containing electrophoresis sample buffer and submitting it to the above heating routine (Figures 3B and 4A). Moreover, heating intact reconstituted samples in the absence of SDS, and then dissolving them into SDS-containing electrophoresis sample buffer for the SDS-PAGE analysis, shows that the midpoint temperature for the disappearance of KcsA tetramers (which under these conditions results primarily in SDS-insoluble, high molecular weight aggregates) occurs at temperatures exceeding 100 °C (not shown). This suggests that the presence of lipids either when codissolved in the SDS solution during heating or, even more noticeably, when organized as intact KcsA reconstituted vesicles confers a higher thermal stability to the tetrameric protein. Such an increased thermal stability, however, does not affect the tetramer-to-monomer ratio in the wild-type KcsA population, which remains high and fairly constant (roughly 80% tetrameric KcsA) both in the DDM-solubilized

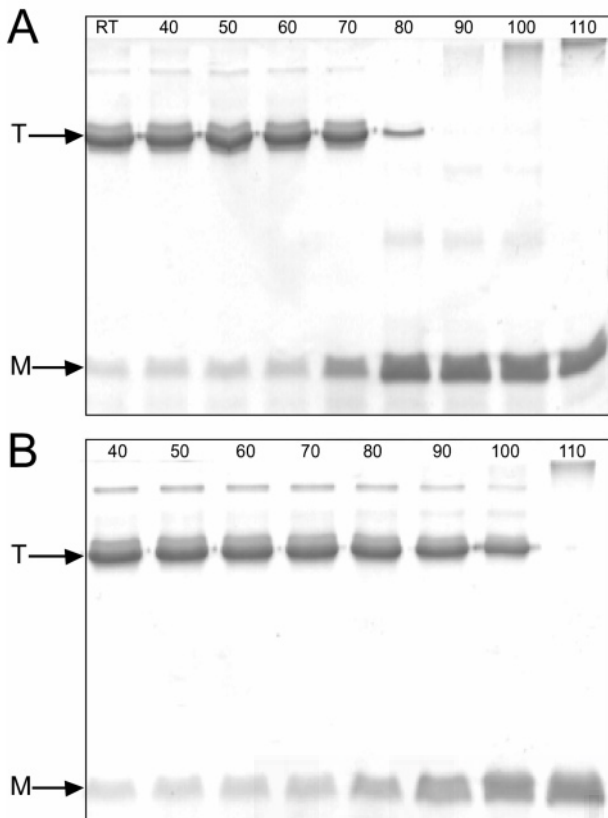


FIGURE 3: Representative electrophoretic gels used to study the stability of the different tetrameric KcsA proteins to detergent- and heat-induced dissociation. In this case, the behavior of tetrameric, full-length 1–160 KcsA is shown to illustrate the experimental approach. Panels A and B are representative SDS–PAGE profiles of the dissociation into monomers of tetrameric KcsA both in a DDM-solubilized form (A) or reconstituted into asolectin lipid vesicles (B). In either case, the samples were processed at the indicated temperatures ($^{\circ}\text{C}$, shown above the different lanes), as described in the Materials and Methods. RT stands for room temperature, and M and T stand for KcsA monomer and tetramer, respectively.

and in the asolectin-reconstituted samples (Figure 5A). Similar effects of lipids on KcsA stability have been previously attributed to the presence of anionic lipids, mainly phosphatidylglycerol, which is reported (i) to interact preferentially with the protein channel (24), (ii) to be required for channel function as measured in terms of increased rubidium fluxes (7, 25), and (iii) to copurify with KcsA when isolated from the *E. coli* expression system (25).

The entire 1–160 KcsA can be enzymatically converted into 1–125 KcsA by proteolytic treatment with chymotrypsin (Figure 2, lanes C and D) (3). Interestingly, it is observed that the minor monomer population present in the full-length KcsA preparations disappears almost completely during the chymotrypsin hydrolysis, suggesting that the unassembled monomer has additional accessible sites for chymotrypsin cleavage, which are not accessible in the assembled KcsA tetramer (26). Because of this, the estimation of tetramer-to-monomer ratios in these preparations is meaningless and has not been included in Figure 5.

SDS–PAGE analysis of the dissociation into monomers of 1–125 KcsA tetramers cleaved with chymotrypsin in all of its four subunits shows that the SDS and heat resistance characteristic of full-length KcsA are essentially retained in the DDM-solubilized 1–125 KcsA proteolytic derivative

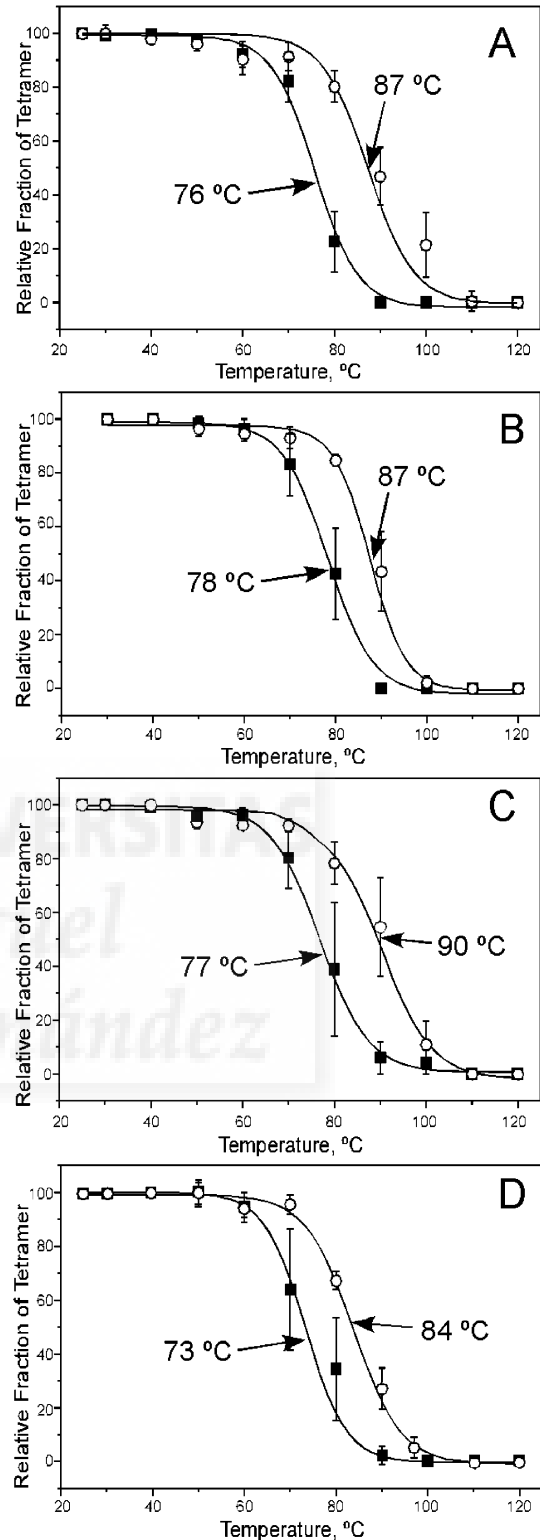


FIGURE 4: Stability of the different KcsA preparations to detergent- and heat-induced dissociation. The results show the fraction of tetramer remaining at the different temperatures in DDM-solubilized (■) or in asolectin-reconstituted (○) KcsA samples, as determined from densitometry scans of SDS gels such as that shown in Figure 3. Arbitrarily, we assigned a relative value of 100 to the intensity of the tetramer band seen at room temperature in each sample. The results for wild-type 1–160 KcsA (A) and 1–125 KcsA (B) and the KcsA $\Delta 125$ –160 (C) and $\Delta 120$ –160 (D) deletions are shown. Numbers within the panels indicate the estimated midpoint temperatures for tetramer dissociation ($^{\circ}\text{C}$). The number of observations (number of different gels processed) ranged between 2 and 6 for the different samples.

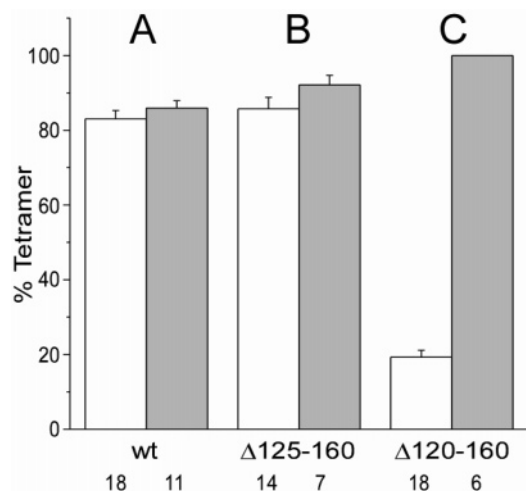


FIGURE 5: Percent of tetramer over the tetramer-plus-monomer population observed by SDS-PAGE analysis in nonheated samples of full-length 1–160 KcsA (A) or in the KcsA Δ 125–160 (B) and Δ 120–160 (C) deletions. Open bars correspond to DDM-solubilized and purified proteins, while gray bars correspond to the same samples but reconstituted into asolectin lipid vesicles. Results are given as mean \pm standard error, and the numbers below each bar are the number of experimental observations.

(Figure 4B) (9), which also shows the increased stability mentioned above upon reconstitution into asolectin lipid vesicles (Figure 4B). This suggests that, once the tetramer is assembled, proteolytic removal of the 126–160 protein segment does not destabilize the proteolyzed KcsA tetramer to undergo SDS- or heat-induced dissociation into subunits.

KcsA deletions lacking large portions of the protein's C-terminal can also be obtained by genetic engineering of the cDNA heterologously expressed in the *E. coli* system. It should be noted here that, just as the full-length or the chymotrypsin-cleaved KcsA (2, 4, 7, 8, 27), the C-terminal deletions used in this work, i.e., KcsA Δ 125–160 and Δ 120–160, give rise to functionally responsive potassium channels upon reconstitution into an artificial membrane (23).

A first difference we noticed regarding the expression of the above KcsA deletions relates to the yield obtained in terms of DDM-soluble purified protein, which decreases significantly compared to that of full-length KcsA preparations (see the Materials and Methods for yield estimates). Different from full-length KcsA, a significant portion of the proteins expressed in both deletions is recovered as DDM-insoluble material (likely to be part of the inclusion bodies) that goes into the pellet discarded from centrifugation of the cell lysates prior to the affinity chromatography step. Such pellets of DDM-insoluble material, however, are soluble in SDS and can still be analyzed by SDS-PAGE, which shows that they are composed almost exclusively of KcsA monomers (not shown).

In addition to the lower yield in terms of DDM-soluble protein, which occurs in both deletions, SDS-PAGE analysis reveals that the tetrameric protein is still predominant in the purified KcsA Δ 125–160 deletion (Figure 2, lanes E and F), but not in the shorter KcsA Δ 120–160 deletion (Figure 2, lanes G–I), in which tetramers are only a minor species and, consequently, the tetramer-to-monomer ratio decreases dramatically (Figure 5B,C). Interestingly, such a decreased tetramer population in the KcsA Δ 120–160 deletion is not due to a major loss in tetramer stability. Indeed, SDS-PAGE

analysis of the heat resistance to dissociation of the deletion tetramers (Figure 4C,D) indicates that, regardless of the differences in the relative abundance of tetrameric protein in the KcsA Δ 125–160 and Δ 120–160 deletions, the midpoint temperatures for their dissociation into subunits are still fairly high and comparable to or slightly lower than those exhibited by full-length KcsA. On the basis of the above observations, it seems reasonable to conclude that the 120–124 ERRGH sequence stretch, which is lacking in the KcsA Δ 120–160 deletion, is involved in determining whether monomeric KcsA subunits would associate as tetramers in the *E. coli* expression system used in these studies. However, once the tetramer is assembled, the presence of a longer or a shorter C-terminal has only a limited influence on the overall stability of the protein.

Molecular modeling of full-length KcsA further supports our proposal for the putative involvement of the 120–124 sequence stretch on tetramerization of KcsA subunits. Figure 6 shows that the model predicts the existence of *intersubunit* interaction sites at the region of interest, in the vicinity of the cytosolic channel pore. It is observed that the interactions between residues 120–124 and the N- and C-terminal segments of the adjacent monomer are mainly electrostatic: R121 forms two hydrogen bonds with the N-terminal polypeptide backbone (carbonyl groups of A23 and S22 in the adjacent subunit), R122 hydrogen bonds to Q119 also in the adjacent subunit, and finally H124 hydrogen bonds to both E120 in the same subunit and S22 in the adjacent one. The nearby E118 is predicted to interact with H25, which in turn forms a hydrogen bond with T112. Thus, every 120–124 stretch in each monomer could form up to 4–5 hydrogen bonds with the adjacent monomer, reinforcing the notion that these residues might play a role as a molecular determinant in the oligomerization process.

On the other hand, studies of reconstitution of the deletion proteins into lipid vesicles indicate that the need for the presence of the 120–124 sequence stretch to allow KcsA subunits to assemble as tetramers is not such a critical requirement in the environment provided to the protein in the reconstituted vesicles, into which such an assembly process is clearly favored. Indeed, reconstitution of the deletion proteins into asolectin lipid vesicles shows that, opposite the observations on the DDM-solubilized, purified proteins, tetramers become again the predominant molecular species in all the reconstituted deletion samples (Figure 5B,C). This is again most noticeable in the KcsA Δ 120–160 deletion (Figure 5C), which goes from being predominantly monomeric in the DDM-solubilized, purified preparation to almost exclusively tetrameric in the reconstituted samples (Figure 2, lanes G–I). This suggests that, besides protein–protein interactions, protein–lipid interactions could play an important role in promoting oligomerization and assembly of preformed membrane protein subunits. This phenomenon seems reminiscent of that mediated by the so-called intramembrane association domains in tetramerization of eukaryotic channels, which can also be achieved in deletion mutants lacking their “priming” T1 tetramerization domain (28). Whatever the case might be, once the KcsA deletion tetramers are assembled, either as a minor species in the DDM-solubilized expression products or as the major species in the reconstituted vesicles, their detergent and heat resistances to dissociation into subunits (Figure 4) are similar

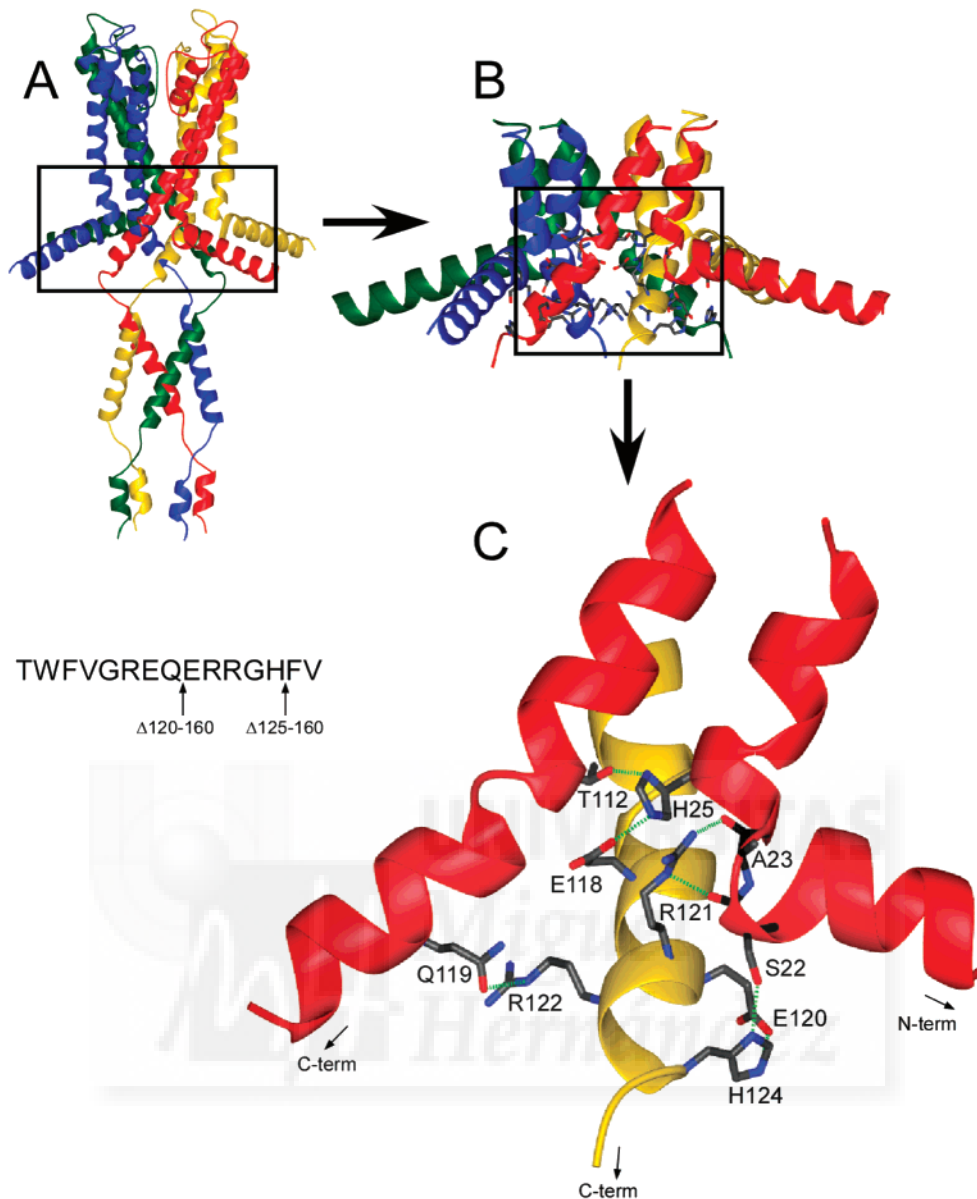


FIGURE 6: Full-length KcsA model (A) used to illustrate the putative interactions anchoring adjacent monomers in the closed state of the protein channel (see the Materials and Methods). Panel B focus on the cytosolic mouth of the channel, while panel C zooms in on an even closer view of the 120–124 sequence stretch in one of the subunits (yellow ribbon) interacting with the contiguous monomer (red ribbon). Only the main residues involved and the predicted hydrogen bonds (green, discontinuous line) are shown.

and only slightly lower than those of the full-length tetrameric channel (23), suggesting once again that the stability of the assembled tetramer does not depend to a great extent upon the presence of an intact C-terminal as a protein constituent.

DISCUSSION

Oligomerization of compatible subunits to form functional ion channels is a complex event of molecular recognition resulting from the successful concurrence of many elemental steps including membrane targeting, folding, posttranslational modification, and assembly. The occurrence and the order in which these processes take place may differ in each case, but it is assumed that the nascent polypeptide chains contain specific sequences to determine their overall processing and cell surface expression. The physiological relevance of this is obvious, and in voltage-dependent potassium channels in particular, it has been shown that deletions, as well as

mutations of sequences involved in trafficking to the plasma membrane, lead to impaired channel function and relate to genetic diseases (see ref 29 and references therein).

In this paper we report on two main observations related to KcsA tetramerization. First, we noticed that going from the C-terminal deletion KcsA $\Delta 125-160$ to the KcsA $\Delta 120-160$ greatly impairs the ability of the protein to assemble as a tetramer in the *E. coli* heterologous expression system. This suggests a possible role for the ERRGH 120–124 sequence as a putative “tetramerization” domain. Second, it is observed that, even in the absence of such an apparently critical sequence stretch, reconstitution into lipid vesicles of the predominantly monomeric KcsA $\Delta 120-160$ deletion results in the highly efficient formation of functionally responsive tetramers. Compared to the wild-type protein, such deletion tetramers exhibit a similar or slightly diminished stability to heat- and detergent-induced dissociation. Taking the two observations together, it seems that hydro-

phobic interaction between the transmembrane protein segments is the most important factor in holding the tetramer together, but under conditions less favorable than those provided by reconstitution into lipid vesicles to facilitate subunit recognition and assembly, the ERRGH 120–124 sequence becomes a key element for efficient tetramerization.

In the eukaryotic voltage-activated *Shaker* potassium channel, tetramerization is mediated by the so-called T1 or first tetramerization domains (30). T1 domains supervise proper tetrameric assembly of compatible channel subunits and correspond to a large N-terminal cytoplasmic protein stretch (31, 32), which by itself readily forms tetrameric structures. Zerangue and co-workers (33) propose that tetramerization takes place in a multistep process in which rapid T1 tetramerization occurs first, and then it brings transmembrane domains of T1-compatible channel subunits into close proximity to allow full tetramerization of the channel. According to this proposal, T1 domains act *on the kinetics of the assembly process* by priming the slower concentration-dependent process of tetramerization between transmembrane segments of T1-compatible channel subunits (33). This kinetic mechanism is supported by the observation that tetrameric assembly of *Shaker* channels lacking their T1 domains occurs poorly at “normal” (low) protein concentration, but becomes more efficient in expression systems yielding a higher concentration of channel subunits.

In principle, the above notions seem consistent with our findings on the tetrameric assembly of KcsA, except that it is the C-terminal segment of KcsA that appears to play the role of the N-terminal, *Shaker* T1 domain. Such a possibility is not unprecedented since it is known that other potassium channels different from *Shaker* have their C-terminals involved in tetramerization. For instance, in the EAG (“ether-a-gogo”) family, which like *Shaker* belongs to the so-called 6TMIP (six transmembrane domains, one pore region) potassium channels, the deletion of a short domain near the C-terminus impairs tetramerization (34). Kir (inwardly rectifying) potassium channels, which like KcsA belong to the 2TMIP-type channels, also have tetramerization domains at their C-terminals (35).

Regardless of their location at the N- or C-terminal, a key feature of putative tetramerization domains should be to mediate intersubunit interactions so that compatible subunits may recognize each other and be properly oriented for the subsequent occurrence of hydrophobic interactions between transmembrane regions of the protein, which are major determinants in holding the oligomer together. Such priming intersubunit interactions seem to be attained differently in different channels. For instance, in the N-terminal, T1 domains of *Shaker* (33), as well as in the C-terminal tetramerization domains of EAG channels, intersubunit contacts are based on coiled-coil structures (34), while no coiled coils have been detected in the large cytoplasmic C-terminal of a prokaryotic KirBac1.1 channel (36), which has been structurally determined at high resolution and forms intersubunit β -structures. In KcsA and according to our molecular modeling, it seems likely that multiple hydrogen bonding involving the 120–124 residues and N- and C-terminal regions of adjacent subunits could be a priming event leading to tetramerization. Site-directed mutagenesis experiments are currently in progress in an attempt to provide further evidence for this hypothesis.

On the other hand, it has already been mentioned that, during KcsA tetramer formation, the full-length KcsA monomer first inserts into the target membrane and then into the membrane where tetramerization occurs (10). Therefore, since membrane targeting, monomer insertion, and tetramerization are linked, sequential processes, it is also conceivable that rather than being strictly involved in tetramerization, putative tetramerization domains might facilitate membrane targeting and/or folding of nascent monomeric components. In this regard, it has been reported that in a eukaryotic *in vitro* translation and translocation system, the C-terminal of KcsA affects the efficiency at which the M2 transmembrane segment spans the endoplasmic reticulum membrane and achieves its final structure (37). Thus, an alternative possibility would be that the 120–124 ERRGH sequence stretch is influencing monomer folding rather than monomer tetramerization in strict terms. This should lead the improperly folded monomers to form insoluble inclusion bodies, which is the usual way prokaryotes discard misfolded expression products, and would explain our lower yields in terms of DDM-soluble protein, as well as the increased amount of DDM-insoluble, monomeric KcsA seen in our two deletions.

Our second major observation is that, in the absence of the putative tetramerization domain, reconstitution into lipid vesicles of the purified KcsA Δ 120–160 deletion protein in a predominantly monomeric form secures tetramerization very efficiently. The high efficiency of this phenomenon is unprecedented and reinforces the emerging concept that, in addition to contributing to the stability or the conformation of oligomeric membrane proteins, protein–lipid interactions may be important in promoting oligomerization of such proteins and in allowing intramembrane domain interactions to determine a correct oligomeric assembly (38). In particular for KcsA, it has been shown that, as long as the monomers are previously membrane-inserted, tetramers can be assembled in pure lipid bilayers as target membranes in an *in vitro* transcription and translation system (9), this process being more efficient in the presence of negatively charged phosphatidylglycerol (24). Also, the *in vitro* refolding into tetramers of previously trifluoroethanol-unfolded KcsA monomers has been found to occur only when in the presence of lipid vesicles, but in this case with a low (20–30%) efficiency and without any specific lipid requirement (25). The driving forces in this “lipid-facilitated” tetramerization of KcsA should be equivalent to those promoting the well-known oligomerization of compatible, synthetic transmembrane segments of oligomeric membrane proteins (39), which obviously occurs in the absence of any cytoplasmic tetramerization domain.

In conclusion, we found that the lack of the cytoplasmic C-terminal domain of KcsA and, most critically, the 120–124 sequence stretch prevents tetramerization of monomeric channel subunits in an *E. coli* expression system. We also observed that, once the KcsA tetramer is assembled, its *in vitro* stability does not depend to a large extent on whether the putative tetramerization domain continues being part of the protein, but is further increased by the presence of lipids. Finally and most interestingly, we also found that, in the absence of such a critical C-terminal domain, reconstitution into membrane lipids facilitates very efficiently tetramerization of KcsA subunits, which is likely mediated by allowing proper interactions among intramembrane protein sites in the hydrophobic reconstitution medium.

ACKNOWLEDGMENT

We thank our colleagues Dr. Marco Caprini and Dr. Antonio Ferrer-Montiel, from the Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, for kindly providing the *kcsA* construct. We also thank Dr. Francisco Gavilanes at the Universidad Complutense de Madrid for his help with the mass spectrometry analysis and Dr. Luis Serrano at the European Molecular Biology Laboratory in Heidelberg for the use of the PERLA program. Mrs. Eva Martínez provided excellent technical help throughout this work.

REFERENCES

- Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes, *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 91–123.
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*, *EMBO J.* 14, 5170–5178.
- Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science* 280, 69–77.
- Heginbotham, L., Odessey, E., and Miller, C. (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel, *Biochemistry* 36, 10335–10342.
- Cuello, L. G., Romero, J. G., Cortes, D. M., and Perozo, E. (1998) pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel, *Biochemistry* 37, 3229–3236.
- Cortes, D. M., Cuello, L. G., and Perozo, E. (2001) Molecular architecture of full-length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating, *J. Gen. Physiol.* 117, 165–180.
- Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel, *J. Gen. Physiol.* 111, 741–749.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel, *J. Gen. Physiol.* 118, 303–314.
- van Dalen, A., van der Laan, M., Driessen, A. J., Killian, J. A., and de Kruijff, B. (2002) Components required for membrane assembly of newly synthesized K⁺ channel KcsA, *FEBS Lett.* 511, 51–58.
- van Dalen, A., Schrempf, H., Killian, J. A., and de Kruijff, B. (2000) Efficient membrane assembly of the KcsA potassium channel in *Escherichia coli* requires the protonmotive force, *EMBO Rep.* 1, 340–346.
- Booth, P. J. and Curran, A. R. (1999) Membrane protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 115–121.
- Split, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M., and Schrempf, H. (2000) Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans*, *FEBS Lett.* 472, 83–87.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685.
- Houthaeve, T., Gausepohl, H., Mann, M., and Ashman, K. (1995) Automation of micro-preparation and enzymatic cleavage of gel electrophoretically separated proteins, *FEBS Lett.* 376, 91–94.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Riquelme, G., Lopez, E., Garcia-Segura, L. M., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1990) Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels, *Biochemistry* 29, 11215–11222.
- Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis* 18, 2714–2723.
- Fisinger, S., Serrano, L., and Lacroix, E. (2001) Computational estimation of specific side chain interaction energies in alpha helices, *Protein Sci.* 10, 809–818.
- Ventura, S., Vega, M. C., Lacroix, E., Angrand, I., Spagnolo, L., and Serrano, L. (2002) Conformational strain in the hydrophobic core and its implications for protein folding and design, *Nat. Struct. Biol.* 9, 485–493.
- Reina, J., Lacroix, E., Hobson, S. D., Fernandez-Ballester, G., Rybin, V., Schwab, M. S., et al. (2002) Computer-aided design of a PDZ domain to recognize new target sequences, *Nat. Struct. Biol.* 9, 621–627.
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, *J. Biomol. NMR* 8, 477–486.
- Cortes, D. M. and Perozo, E. (1997) Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K⁺ channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability, *Biochemistry* 36, 10343–10352.
- Perozo, E., Cortes, D. M., and Cuello, L. G. (1999) Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating, *Science* 285, 73–78.
- van Dalen, A., Hegger, S., Killian, J. A., and de Kruijff, B. (2002) Influence of lipids on membrane assembly and stability of the potassium channel KcsA, *FEBS Lett.* 525, 33–38.
- Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel, *Biochemistry* 41, 10771–10777.
- van den Brink-van der Laan, E., Chupin, V., Killian, J. A., and de Kruijff, B. (2004) Stability of KcsA tetramer depends on membrane lateral pressure, *Biochemistry* 43, 4240–4250.
- Meuser, D., Split, H., Wagner, R., and Schrempf, H. (1999) Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*, *FEBS Lett.* 462, 447–452.
- Tu, L., Santarelli, V., Sheng, Z., Skach, W., Pain, D., and Deutsch, C. (1996) Voltage-gated K⁺ channels contain multiple intersubunit association sites, *J. Biol. Chem.* 271, 18904–18911.
- Li, D., Takimoto, K., and Levitan, E. S. (2000) Surface expression of Kv1 channels is governed by a C-terminal motif, *J. Biol. Chem.* 275, 11597–11602.
- Kreusch, A., Pfaffinger, P. J., Stevens, C. F., and Choe, S. (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel, *Nature* 392, 945–948.
- Li, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel, *Science* 257, 1225–1230.
- Shen, N. V., Chen, X., Boyer, M. M., and Pfaffinger, P. J. (1993) Deletion analysis of K⁺ channel assembly, *Neuron* 11, 67–76.
- Zerangue, N., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2000) An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3591–3595.
- Jenke, M., Sanchez, A., Monje, F., Stuhmer, W., Weseloh, R. M., and Pardo, L. A. (2003) C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels, *EMBO J.* 22, 395–403.
- Tinker, A., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1996) Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels, *Cell* 87, 857–868.
- Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A. (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state, *Science* 300, 1922–1926.
- Umigai, N., Sato, Y., Mizutani, A., Utsumi, T., Sakaguchi, M., and Uozumi, N. (2003) Topogenesis of two transmembrane type K⁺ channels, *Kir 2.1 and KcsA*, *J. Biol. Chem.* 278, 40373–40384.
- Popot, J. L., and Engelman, D. M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution, *Annu. Rev. Biochem.* 69, 881–922.
- Shai, Y. (2001) Molecular recognition within the membrane milieu: implications for the structure and function of membrane proteins, *J. Membr. Biol.* 182, 91–104.

BI048889+

1.3 Trabajo adicional

La línea de investigación desarrollada en esta publicación, centrada en el estudio de la oligomerización de KcsA, se continuó desarrollando tras la publicación del artículo correspondiente. Así, estudios de mutagénesis posteriores comprobaron la implicación de esta región en la tetramerización de KcsA y la bondad del modelo propuesto en Molina et al (2004). Además, se determinó el papel del N- y del C-terminal en la agrupación y el acoplamiento funcional de los canales, propiedad de KcsA que se caracteriza en la Publicación 2. Estos resultados, pendientes de su publicación, se resumen en el apartado de Avances Relevantes.





PUBLICACIÓN 2



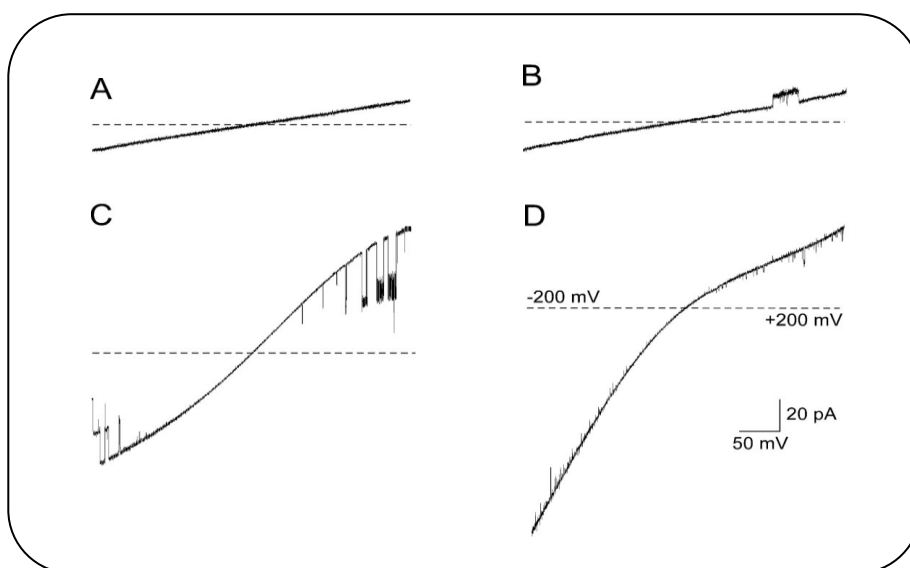


2.1 CLUSTERING Y GATING ACOPLADO MODULAN LA ACTIVIDAD DE KcsA, UN CANAL DE POTASIO MODELO

Molina, M.L., Barrera, F.N., Fernández, A.M., Poveda, J.A., Renart, M.L., Encinar, J.A., Riquelme, G, and González-Ros, J.M. (JBC, 2006)

RESUMEN

Diferentes patrones de actividad de los canales han sido detectados mediante patch clamp de parches de membrana escindidos de liposomas gigantes reconstituidos que contienen KcsA purificado, un canal de potasio de origen procariota. El patrón más frecuente tiene una característica baja probabilidad de apertura del canal (patrones LOP) y exhibe muchas otras características publicadas para KcsA reconstituida en bicapas lipídicas planas, incluyendo una moderada dependencia de voltaje, el bloqueo por Na^+ , y una estricta dependencia de pH ácido para la apertura del canal. El evento de gating predominante en este patrón de baja probabilidad de apertura corresponde al acoplamiento positivo de dos canales KcsA. Sin embargo, también han sido detectados otros patrones de actividad, que se caracterizan por una alta probabilidad de apertura del canal (patrones HOP), el acoplamiento positivo de principalmente cinco canales, y cambios profundos en otras características de KcsA, incluyendo una diferente voltaje dependencia, la apertura de los canales a pH neutro, y la ausencia de bloqueo por Na^+ . La diversidad funcional anterior se corresponde con el ensamblaje supramolecular heterogéneo de KcsA en grupos (o clusters). La agrupación de KcsA depende de la concentración de proteínas y se produce en solución de detergente y más marcadamente en membranas reconstituidas, incluyendo liposomas gigantes, donde algunos de los grupos (o clusters) son lo suficientemente grandes (hasta varias micras) para ser observados por microscopía confocal. Al igual que en las respuestas de expansión conformacional alostéricas observadas en la agrupación de receptores (Bray, D. and Duke, T. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 53–73), nuestro principio es que la agrupación física de canales de KcsA está detrás del múltiple acoplamiento de canales observado y de las diversas respuestas funcionales.





Clustering and Coupled Gating Modulate the Activity in KcsA, a Potassium Channel Model*

Received for publication, January 12, 2006, and in revised form, April 27, 2006 Published, JBC Papers in Press, May 2, 2006, DOI 10.1074/jbc.M600342200

Maria L. Molina^{†1}, Francisco N. Barrera^{‡2}, Asia M. Fernández[‡], Jose A. Poveda[‡], Maria L. Renart^{‡2}, Jose A. Encinar[‡], Gloria Riquelme[§], and Jose M. González-Ros^{‡3}

From the [†]Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain and the [§]Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70005, Santiago 7, Chile

Different patterns of channel activity have been detected by patch clamping excised membrane patches from reconstituted giant liposomes containing purified KcsA, a potassium channel from prokaryotes. The more frequent pattern has a characteristic low channel opening probability and exhibits many other features reported for KcsA reconstituted into planar lipid bilayers, including a moderate voltage dependence, blockade by Na⁺, and a strict dependence on acidic pH for channel opening. The predominant gating event in this low channel opening probability pattern corresponds to the positive coupling of two KcsA channels. However, other activity patterns have been detected as well, which are characterized by a high channel opening probability (HOP patterns), positive coupling of mostly five concerted channels, and profound changes in other KcsA features, including a different voltage dependence, channel opening at neutral pH, and lack of Na⁺ blockade. The above functional diversity occurs correlatively to the heterogeneous supramolecular assembly of KcsA into clusters. Clustering of KcsA depends on protein concentration and occurs both in detergent solution and more markedly in reconstituted membranes, including giant liposomes, where some of the clusters are large enough (up to micrometer size) to be observed by confocal microscopy. As in the allosteric conformational spread responses observed in receptor clustering (Bray, D. and Duke, T. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 53–73) our tenet is that physical clustering of KcsA channels is behind the observed multiple coupled gating and diverse functional responses.

During the last decades, the use of high resolution electrophysiological techniques to study ion channels has provided a large amount of information on functional aspects of these important membrane proteins. Such a detailed information on channel function, however, has not been accompanied by structural knowledge until recently, when several structurally simpler homologues of mammalian ion channels found in extremophile bacteria or *Archaea* and remarkably resistant to harsh experimental conditions, have been purified, crystallized and their structure solved at high resolution by x-ray diffraction methods

(1–4). A K⁺ channel from the soil bacteria *Streptomyces lividans* named KcsA⁴ (1), a homotetramer made up of identical 160-amino acid subunits, was the first of such structures to be solved (5, 6), and, although the x-ray structure corresponds to a closed channel conformation, it has contributed much to our current understanding of ion selectivity and permeation. Ironically, there was little or no functional information on KcsA by the time its structure was solved, and then several groups undertook the task of characterizing its single channel properties, which has been surrounded by controversy. For instance, Schrempf's group, discoverers of KcsA in *S. lividans*, reported a strong dependence of channel opening on acidic pH, multiple conductance states with opening probabilities near 0.5, and unusual permeabilities to Na⁺, Li⁺, Ca²⁺, or Mg²⁺, along with K⁺ (7–9). In contrast, Miller's group (10, 11) using purified KcsA reconstituted into planar lipid bilayers found a single conductance state with a much lower opening probability, as well as orthodox ion selectivity and other properties to validate KcsA as a *bona fide* K⁺ channel and as a faithful structural model for these molecules. The above discrepancies were never fully explained but, still, it became generally accepted that KcsA behaves as a moderately voltage-dependent, K⁺-selective channel with a characteristic low opening probability and the peculiar property of opening only in response to very acidic pH conditions at the intracellular side of the membrane. More recently, however, it was found that KcsA opens also at neutral pH when subjected to an outward K⁺ gradient (12). Furthermore, it has been proposed that a more "physiological" version of KcsA might correspond to a supramolecular conductive complex in which the channel would co-assemble with polyhydroxybutyrate and inorganic polyphosphates (13), which are abundant reservoir materials in many prokaryotes.

In this report we have used excised membrane patches from reconstituted giant liposomes containing purified KcsA. Through the analysis of a large number of patch clamp recordings we found a clearly diverse functional behavior for the KcsA channel. The more frequent pattern of activity corresponds to the low opening probability and acidic pH-dependent channel referred above, but other activity patterns have been detected as well, which are characterized by a high channel opening probability at both acidic and neutral pH. As an additional salient feature, the latter recordings show frequent coupled gating involving multiple channels. These observations are unprecedented, and we interpret them based on the additional finding that heterogeneous "cluster"-like supramolecular assemblies of KcsA are formed, into which the channels adopt different, integrated behaviors.

* This work was supported in part by the Spanish Dirección General de Investigación (Grant BFU2005-00749), the Agencia Valenciana de Ciencia y Tecnología (Grant 03/056), and the Chilean FONDECYT (Grant 1040546). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Had a predoctoral fellowship from the Generalitat Valenciana.

² Supported by predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain.

³ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain. Tel.: 34-96-665-8757; Fax: 34-96-665-8758; E-mail: gonzalez.ros@umh.es.

⁴ The abbreviations used are: KcsA, potassium channel from *S. lividans*; DDM, dodecyl β -D-maltoside; LOP pattern, low channel opening probability pattern of KcsA; HOP pattern, high channel opening probability pattern of KcsA; FRET, fluorescence resonance energy transfer; Alexa 546, Alexa fluor[®] 546 C5 maleimide; Alexa 647, Alexa fluor[®] 647 C2 maleimide; NBD-DMPE, *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; PBS, phosphate-buffered saline.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructs and Mutants—The wild-type KcsA construct contained the *kcsA* gene of *S. lividans* cloned in-frame into the pQE30 vector (Qiagen), which provided ampicillin resistance and a N-terminal hexahistidine tag (14). The KcsA S22C mutant was obtained (QuikChange site-directed mutagenesis kit, Stratagene) by generating PCR fragments using pairs of complementary mutant primers, sense primer 5'-CTC GGG CGC CAC GGC TGT GCG CTG CAC TGG and antisense primer 5'-CCA GTG CAG CGC ACA GCC GTG GCG CCC GAG. The KcsA S22C mutant sequence was verified by dideoxy-nucleotide sequencing.

Protein Expression and Purification—Expression of the wild-type KcsA protein and the KcsA S22C mutant in *Escherichia coli* M15 (pRep4) cells, and its purification by affinity chromatography on a nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column, was carried out as reported previously (14). The purified protein consisted primarily of the characteristic SDS-resistant tetramer, which is accompanied by monomeric KcsA as a minor component and in sufficiently loaded SDS-PAGE gels, by higher molecular weight, SDS-resistant KcsA multimers. All the above KcsA species were immunoreactive against commercial anti-His tag monoclonal antibodies (see the inset to Fig. 8A).

The expression yields and the SDS-PAGE profile of the KcsA S22C mutant were very similar to those exhibited by the wild-type KcsA. The protein concentration was determined by the DC-Protein colorimetric assay (Bio-Rad), relative to a bovine serum albumin standard. When expressed in molar terms, the protein concentration refers to KcsA tetramers. 1–125 KcsA was prepared by chymotrypsin hydrolysis of wild-type KcsA as described earlier (14).

Reconstitution of Proteins into Asolectin Lipid Vesicles and Preparation of Giant Liposomes—Batches of large unilamellar vesicles of asolectin (soybean lipids, type II-S, Sigma) were prepared at 25 mg/ml as described earlier (15) in 10 mM Hepes, pH 7.0, 100 mM KCl (reconstitution buffer) and stored in liquid N₂. The purified DDM-solubilized protein (wild-type KcsA, 1–125 KcsA, or fluorescently labeled KcsA S22C derivatives, depending on the different experiments) was mixed with the above asolectin vesicles previously resolubilized in 3 mM DDM. Reconstituted liposomes were formed by removing the detergent by gel filtration (14). The protein-containing reconstituted vesicles eluted in the void volume and were pooled, centrifuged 30 min at 300,000 × *g*, resuspended at 1 mg of protein/ml in reconstitution buffer, divided into aliquots, and stored in liquid N₂.

Multilamellar giant liposomes (up to 50–100 μm in diameter) were prepared by submitting a mixture of the reconstituted vesicles (usually containing 50 μg of protein) and asolectin lipid vesicles (25 mg of total lipids) to a cycle of partial dehydration/rehydration (15), with the exception that the dehydration solution used here was 10 mM Hepes (potassium salt) buffer, pH 7, containing 5% ethylene glycol and the rehydration solution was 10 mM Hepes (potassium salt) buffer, pH 7. As a control, each of the different batches of asolectin vesicles was also used to prepare protein-free giant liposomes. Those liposome batches, posing difficulties to obtain high resistance seals (see below) or showing erratic baselines in the patch clamp recordings because of remaining detergent or other reasons, were discarded.

Electrophysiological Recordings—For patch clamp measurements of channel activity, aliquots (3–6 μl) of giant liposomes were deposited onto 3.5-cm Petri dishes and mixed with 2 ml of the buffer of choice for electrical recording (bath solution; usually 10 mM Mes buffer, pH 4, containing 100 mM KCl). Giga seals were formed on giant liposomes

with borosilicate microelectrodes (Sutter Instruments) of 7–10 megohms open resistances, filled with 10 mM Hepes buffer, pH 7, 100 mM KCl (pipette solution). After sealing, excised inside-out patches were obtained by withdrawing the pipette from the liposome surface. Standard patch clamp recordings (16) were obtained using either Axopatch 200A (Axon Instruments, Union City, CA) or EPC-9 (Heka Electronic, Lambrecht/Pfalz, Germany) patch clamp amplifiers, at a gain of 50 mV/pA. The holding potential was applied to the interior of the patch pipette, and the bath was maintained at virtual ground ($V = V_{\text{bath}} - V_{\text{pipette}}$). An Ag-AgCl wire was used as the reference electrode through an agar bridge, and the junction potential was compensated when necessary. Routinely, the membrane patches were subjected to a protocol of pulses and/or voltage ramps. The protocol of pulses went from –200 to +200 mV, at 50-mV intervals, and 2 s of recording at each individual voltage was used, holding the patch back to 0 mV between the different voltage steps. The voltage ramps went from –200 to +200 mV, during a 3-s scan. All measurements were made at room temperature. Recordings were filtered at 1 kHz, and the data were analyzed off-line with the pClamp9 software (Axon Instruments).

Recordings from giant liposomes prepared from either 50 or 100 μg of wild-type KcsA protein and registered under identical experimental conditions (pH 4 at the bath and pH 7 at the pipette solutions) exhibited qualitatively similar patterns of ion channel activity but differed in complexity (a larger number of events as the amount of protein increased) and in the percent of silent patches, which went from only 9% ($n = 23$) when using 100 μg of protein, to ~38% ($n = 150$) for 50 μg of protein, respectively. Thus, for practical purposes, we studied in more detail the giant liposomes made from 50 μg of protein, which became our “standard” experimental condition.

SDS-PAGE and Western Immunoblotting—For SDS-PAGE analysis, the protein-containing samples were mixed with an equal volume of electrophoresis buffer sample (20 mM Tris, pH 6.8, 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue, and 4% SDS) and applied to a 13.5% acrylamide gel in the presence of 0.1% SDS (17). After electrophoresis, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. Blots were incubated with 3% (w/v) bovine serum albumin in PBS-T (phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 0.05% Tween 20). The His-tagged KcsA was detected with a mouse monoclonal anti-Tetra-His antibody (1:1000 dilution, Qiagen) in PBS-T. After washing, the immunoblots were incubated with a secondary horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:1000, Sigma) in PBS-T. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescent ECL detection reagent (Amersham Biosciences).

Analytical Ultracentrifugation—Sedimentation velocity experiments were conducted in a Beckman Optima XL-I ultracentrifuge (Beckman Coulter) with an An50Ti eight-hole rotor and double-sector Epon-charcoal centerpieces. DDM-solubilized KcsA samples at protein concentrations ranging 0.5–10 μM in 20 mM Hepes buffer, pH 7.0, containing 100 mM KCl and 5 mM DDM, were centrifuged at 40,000 rpm, 20 °C, and the absorbance at 280 nm was followed. Differential sedimentation coefficient distributions, $c(s)$, were calculated by least-squares boundary modeling of sedimentation velocity data by using the program SEDFIT (18, 19).

Fluorescence Labeling of KcsA—Aliquots of the sulfhydryl-containing mutant KcsA S22C at 7 μM in 20 mM Hepes, pH 7, 100 mM KCl and 5 mM DDM were treated for 1 h in the dark with a 10-fold molar excess of Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride to keep the sulfhydryl groups in a reduced form. The maleimide Alexa probes (Alexa Fluor® 546 C5-maleimide or Alexa Fluor® 647 C2-maleimide; Molecular Probes) were dissolved in buffer and added in a

10-fold molar excess to the reduced KcsA samples. After 2-h incubation at 4 °C, an excess of 2-mercaptoethanol was added to react with the excess free probe. Finally, the fluorescently labeled KcsA was separated from the free fluorophores by gel filtration on Sephadex G-50 (medium), which also eliminates the minor population of monomeric KcsA present in the purified KcsA preparations. Monitoring of the absorbance at either 546 or 647 nm was used to define the elution profile, while the protein was detected by SDS-PAGE of the different fractions. Routinely, yields ranging 20 to 30% labeling of the available sulfhydryls were obtained.

Fluorescence Anisotropy Measurements—Stock solutions of Alexa 546-labeled KcsA in 10 mM Hepes buffer, pH 7.0, 100 mM KCl, and 5 mM DDM were subjected to successive dilutions with the same buffer to attain different protein concentrations. Steady-state fluorescence anisotropy $\langle r \rangle$ was determined at 25 °C in an SLM-8000C spectrofluorometer equipped with Glan-Thompson polarizers in the “L” format, by measuring the vertical (I_{VV}) and horizontal (I_{VH}) components of the fluorescence emission with excitation polarized vertically, as defined by (20),

$$\langle r \rangle = (I_{VV} - G^*I_{VH}) / (I_{VV} + 2^*G^*I_{VH}) \quad (\text{Eq. 1})$$

where the G factor ($G = I_{HV}/I_{HH}$) corrects for the transmission bias introduced by the detection system. Excitation and emission wavelengths were 525 and 574 nm, respectively. The protein and DDM concentration were low enough to prevent scattering artifacts that could result in an artificial depolarization of the fluorescence. Similar measurements carried out using Alexa 647-labeled KcsA yielded essentially identical results.

Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements—Alexa 546- and Alexa 647-labeled KcsA were used as the donor-acceptor pair for FRET measurements both in detergent solution (10 mM Hepes buffer, pH 7, 100 mM KCl, 5 mM DDM) and in reconstituted asolectin lipid vesicles. For the latter, the reconstituted vesicles were prepared at a fixed asolectin lipid to total protein weight ratio of 10:1 in 10 mM Hepes buffer, pH 7, 100 mM KCl. Because the donor concentration ($\sim 6 \mu\text{g}$ of protein/ml) was not identical in the different samples, particularly in the reconstituted vesicles, FRET efficiency (E) was not calculated through the usual method of quenching of donor steady-state emission. Instead, two other approaches were used. In the first approach, E was determined by measuring the increase in fluorescence of the acceptor due to energy transfer and comparing this to the residual donor emission (21). For this, steady-state emission scans of the samples at different donor to acceptor ratios were recorded in an SLM-8000C spectrofluorometer at an excitation wavelength of 525 nm and at emission wavelengths from 540 to 750 nm at 1-nm intervals, and corrected for background and instrument response. The acceptor emission coming from its direct excitation at 525 nm was negligible in the reconstituted samples but not in detergent solution, where such contribution was always subtracted. Afterward, the spectra were normalized to the donor maximum at 574 nm where there is no acceptor fluorescence. Then, the donor spectrum was subtracted from each of the donors plus acceptor spectra, and the integrated areas of the resulting curves were calculated (I_{AD}). The area under the donor spectrum was also calculated (I_D), and then E results from,

$$E = (I_{AD}/q_A) / (I_D/q_D + I_{AD}/q_A) \quad (\text{Eq. 2})$$

where q_A (0.80) and q_D (0.85 (22)) are the experimentally determined quantum yields of the acceptor and donor, respectively.

The second approach estimates the transfer efficiency in samples

with different donor concentration from measurements of the donor fluorescence decay at different donor to acceptor ratios. Fluorescence decays were measured in a fluorescence lifetime instrument (Photon Technology International Inc.) using a proprietary stroboscopic detection technique (23, 24). The system used a GL-330 pulsed nitrogen laser pumping a GL-302 high resolution dye laser. The dye laser output at 525 nm was fitted to the sample compartment via fiber optics. The emission wavelength was 574 nm. Fluorescence decays were analyzed using a non-linear least-squares regression method. The average decay times, which are proportional to the steady-state intensities, were calculated from the results of multiexponential fits by using the expression,

$$\langle \tau \rangle = (\sum a_i \tau_i) / (\sum a_i) \quad (\text{Eq. 3})$$

where a_i and τ_i represent the pre-exponential factors and the lifetimes, respectively. From these, E was calculated using the expression (20),

$$E = 1 - \tau_{DA} / \tau_D \quad (\text{Eq. 4})$$

where τ_{DA} and τ_D are the average fluorescence lifetimes of the donor in the presence and in the absence of acceptor, respectively.

Finally, the theoretical contribution to FRET arising purely from the random distribution of labeled KcsA donors and acceptors within the two-dimensional membrane bilayer was estimated according to Capeta *et al.* (25). Such calculations take into account three parameters, β_w , β_1 , and B . β_w , the interplanar spacing between donors and acceptors, was fixed to zero, because both probes are located at cysteine 22 in different KcsA molecules. β_1 is the ratio R_1/R_0 , where R_1 , the exclusion distance, represents the minimal distance between two probes, and R_0 is the Förster's distance. R_1 was fixed as twice the protein radius (51.9 Å in the KcsA crystal structure), whereas R_0 was 68 Å as calculated from the spectral overlap and the donor quantum yield. B , the relative enrichment factor for the acceptor in the proximities of the donor was fixed to 1.05, which assumes a random distribution of donors and acceptors in the bilayer. A similar theoretical curve was also obtained by applying other models such as that from Wolber and Hudson (26).

Confocal Fluorescence Microscopy—Aliquots (3–6 μl) of giant liposomes containing fluorescently labeled KcsA were deposited on a coverslip mounted on a custom-made chamber and mixed with 1 ml of 10 mM Hepes buffer, pH 7.0, 100 mM KCl. The samples were visualized without any further treatment by using an LSM 5 Pascal confocal laser scanning microscope (Axiovert 200M, Carl Zeiss) and a Plan-Neofluar 40 \times /1.3 objective. Giant liposomes containing Alexa 546-labeled KcsA were excited with the 543 nm line of an argon laser, and the emitted light was filtered through a 560–615 nm band pass filter. For giant liposomes containing Alexa 647-labeled KcsA, the 633 nm line of a He-Ne laser was used for excitation, whereas the emitted light was filtered through a 650 nm long pass filter. For FRET images, giant liposomes containing both Alexa 546- and Alexa 647-labeled KcsA, usually at a 1:1 donor/acceptor ratio, were excited at the above 543 nm emission line of the argon laser and the emission was filtered through the 650 nm long pass filter. These conditions do not require any spectral bleed-through correction.

Giant liposomes containing the fluorescently labeled phospholipid NBD-DMPE, added (0.05%) to the asolectin lipids during reconstitution, were visualized by exciting the NBD-DMPE probe with the 488 nm emission line of the argon laser and using a 505–560 nm band pass emission filter.

Functional Diversity and Clustering in KcsA

RESULTS

Diverse Functional Behavior of KcsA: Low and High Channel Opening Probability Patterns—Unless stated otherwise, excised membrane patches from giant liposomes prepared from 50 μg of purified KcsA and 25 mg of asolectin lipids (see “Experimental Procedures”) were always used in these experiments. The recording bath solution was 10 mM Mes buffer, pH 4, containing 100 mM KCl, whereas the pipette solution was 10 mM Hepes buffer, pH 7, 100 mM KCl. Despite the identical experimental conditions, different types of activity were distinguished in these patches ($n = 93$) and classified as “low” or “high” channel opening probability patterns based on the probability of finding channel opening events in the recordings (Fig. 1). These experiments used a large number of different batches of both purified KcsA and asolectin lipids to prepare the giant liposomes. However, we found no dependence with either the moment in which the experiments were carried out or with the different batches used. Moreover, the different activity patterns illustrated in Fig. 1 were often observed in different patches from the same preparation of giant liposomes.

Fig. 1 shows typical voltage ramps from protein-free patches used as a control (Fig. 1A), as well as from different KcsA-containing patches representative of the different opening probability patterns observed. Fig. 1B shows a few openings in the form of bursts of activity, but the channels are closed most of the time, which are well known reported features of KcsA (10, 11). Accordingly, we named this pattern “low channel opening probability” or LOP pattern, seen in 55% of the recordings ($n = 51$). On the contrary, Fig. 1 (C and D) shows examples of activity patterns in which the most salient feature is that the channels are opened most of the time. These patches were named as “high channel opening probability” or HOP patterns and were observed in 45% of the cases ($n = 42$), including some instances in which somewhat intermediate behaviors between those depicted in Fig. 1 (C and D) were detected in the recordings. The predominant HOP pattern corresponds to that in Fig. 1C ($n = 26$), in which similar current is conducted at either positive or negative potentials, following an almost symmetrical sigmoid-like voltage dependence. Characteristically, channel closings are observed at extreme voltages and variable flickering may sometimes be present at any of the voltages studied. Fig. 1D shows a different HOP pattern encountered with a lower incidence ($n = 10$) in which more current is conducted at negative than at positive voltages, thus showing an inward rectifier behavior. These latter recordings do not show a predominance of channel closings at the extreme values in the voltage ramps, while variable flickering (from moderate to very intense) may also be present. This variability observed when KcsA is reconstituted into giant liposomes was not explicitly reported in the earlier characterization of KcsA in planar lipid bilayers, but it seems reminiscent of that referred more recently (27) using the latter reconstituted system.

Regardless of the pattern exhibited, additional experiments carried out under asymmetrical KCl concentrations (400 and 100 mM KCl in the bath and pipette solutions, respectively, under otherwise identical conditions) yielded very similar reversal potentials, which were near that corresponding to potassium under these gradient conditions (not shown).

Curiously, a small population of patches ($n = 6$) was also found in which the main feature was that the number of open channels increased progressively in a “ladder”-like manner during the time course of the recordings as the protocol of pulses was applied repetitively. This latter behavior is discussed below under “Results.”

Analysis of the LOP Pattern—In agreement with previous reports, channel opening in this activity pattern requires acidic pH (8–11, 28). Fig. 2A shows that these excised membrane patches do not exhibit



FIGURE 1. Diverse functional behavior of KcsA. Typical voltage ramps obtained under identical experimental conditions by patch clamping excised inside-out patches from reconstituted giant liposomes prepared in the absence (A) or in the presence of the purified KcsA channel. B, slightly predominant low channel opening probability (LOP) pattern; C and D, high channel opening probability (HOP) patterns exhibiting either symmetrical sigmoid-like voltage dependence (C) or inward rectifier-like behavior (D).

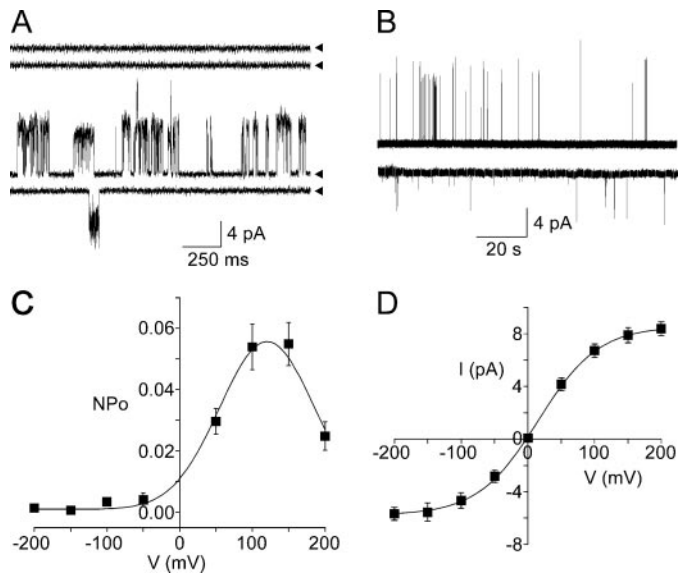


FIGURE 2. Main features of the LOP pattern of KcsA. *A*, acidic pH dependence of channel opening. The *upper traces* illustrate the lack of channel activity when 100 mM KCl symmetrical solutions at pH 7 were used at both sides of the patch at ± 150 mV. The *bottom traces* were obtained by changing the bath solution to pH 4. In this and all similar figures, closed channel states are indicated by *arrowheads*. *B*, representative long recordings of channel activity at ± 150 mV to illustrate the characteristic rapid gating in the form of bursts of activity within long-lived silent periods. Unless indicated otherwise, the pH values of the bath and pipette solutions in this and all following figures were 4 and 7, respectively (see "Experimental Procedures"). *C*, voltage dependence of the channel opening probability (NP_o) calculated as the fraction of time during which the channels are opened in recordings ranging from 30 s to 2 min in length ($n = 6$). *D*, open channel current *versus* voltage curve, obtained by averaging the current amplitudes from several different patches ($n = 9$). The results shown in *C* and *D* and in all other similar figures are the mean \pm S.E.

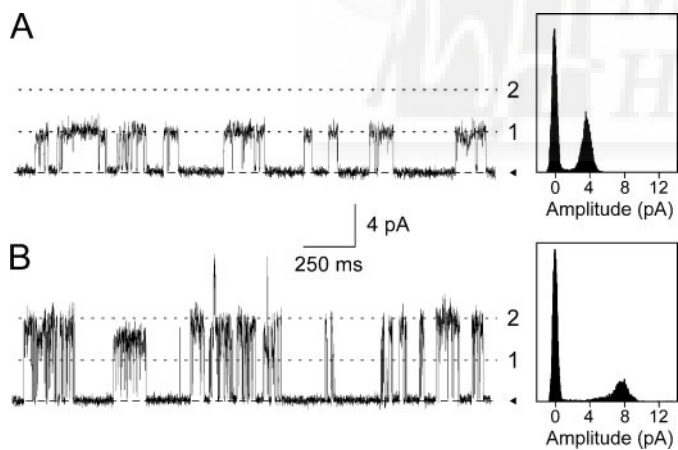


FIGURE 3. Coupled gating of KcsA channels in the LOP pattern. *A*, a recording containing only the minimal 4-pA single channel currents seen at $+150$ mV; *B*, a recording obtained under identical conditions but containing predominant 8-pA currents resulting from coupling of two KcsA channels. The amplitude histograms of each of the above recordings are shown to the *right*. The latter 8-pA currents were the predominant events in most recordings of KcsA taken in LOP patterns. The *dashed lines* in the two recordings (labeled '1' and '2') are indicative of the 4- and 8-pA current levels.

channel opening events when symmetrical solutions at pH 7 were maintained in the bath and pipette sides of the patch. On the contrary, changing the bath solution to pH 4 causes channel opening activity (Fig. 2*A*, *lower traces*), regardless of whether the pipette solution was maintained at pH 4 or 7. These pH-dependent changes in gating behavior are produced immediately upon perfusion of the bath solution and are also fully reversible. Finally, changing the pipette solution to pH 4, while leaving the bath solution at pH 7, results in only occasional channel openings (not shown). All the above indicates that the acidic pH-sensing sites in

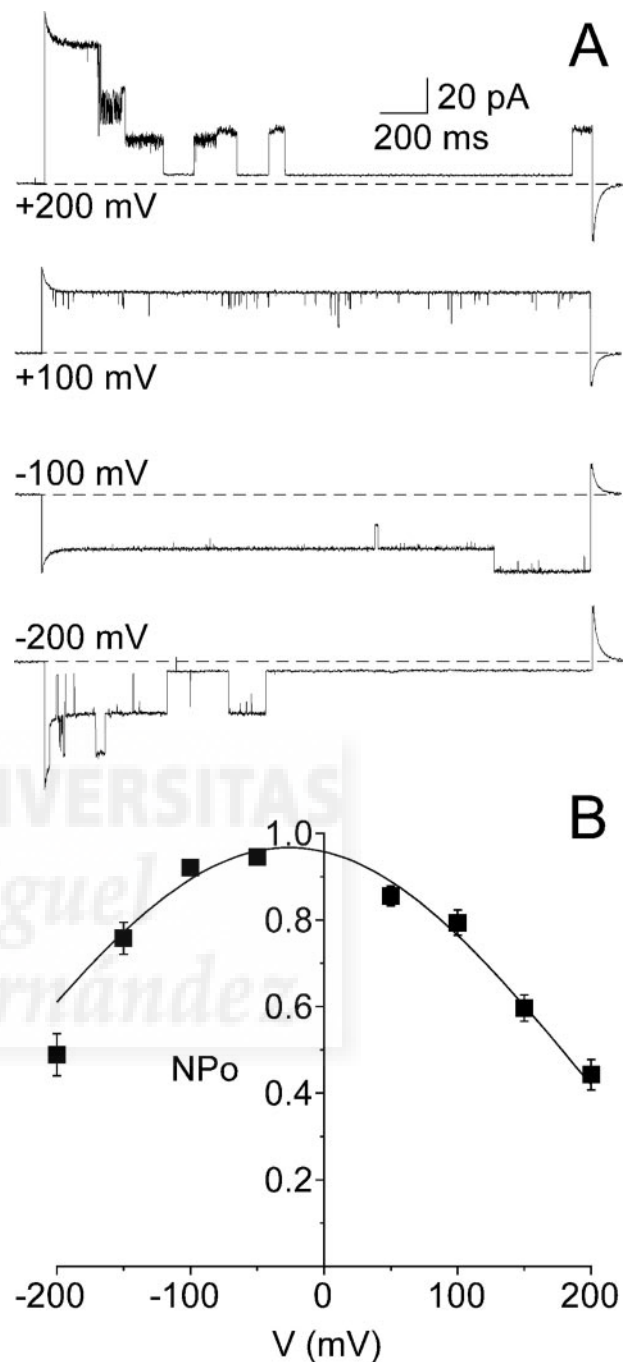


FIGURE 4. Main features of a HOP pattern of KcsA, such as that shown in Fig. 1*C*. *A*, shows representative channel currents taken at ± 100 mV, where the channels are opened during most of the recording, or at ± 200 mV in which channel closings are more likely to occur. Due to the difficulties in identifying the closed state in some of these recordings, the *dashed lines* indicate the zero current levels. *B*, shows the voltage dependence of the open channel probability (NP_o) calculated as the fraction of time during which the channels are opened in recordings such as those shown in *A* ($n = 6$), which exceeded 0.9 near 0 mV and decreased at the extreme voltages used in these studies.

our excised patches are mostly exposed to the bath solution. Using point mutations in the KcsA structure, it was elegantly demonstrated that the characteristic pH sensitivity of this channel was confined to its intracellular portion (10), thus, it should be concluded that our excised patches are "inside-out," with the cytoplasmic portion of KcsA oriented toward the bath side.

Fig. 2*B* shows representative recordings of channel activity at two different holding potentials. The recordings typically show rapid gating

Functional Diversity and Clustering in KcsA

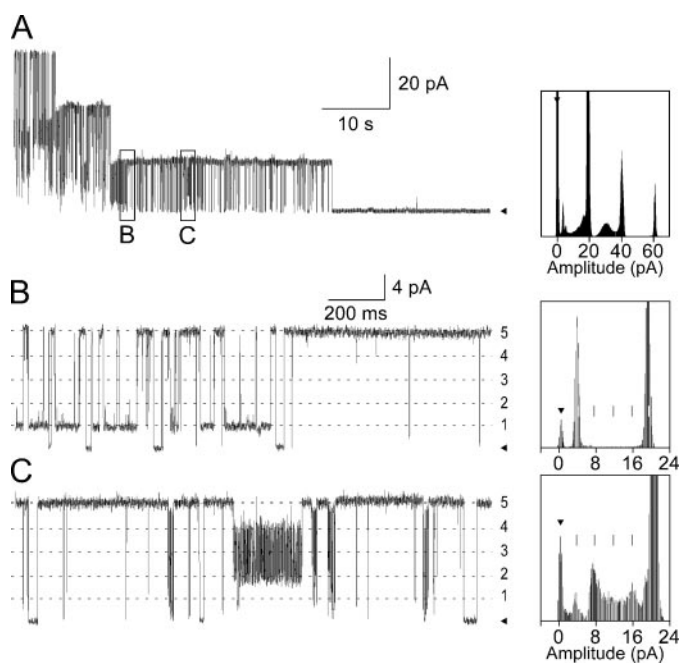


FIGURE 5. Coupled gating of KcsA channels in HOP patterns. *A*, a representative recording taken at +150 mV illustrating three successive closings of 20-pA current levels in a HOP pattern similar to that shown in Fig. 1C. *B* and *C*, some regions of the above recording in more detail, in which, in addition to the main 20-pA current level, openings and closings of a smaller 4-pA current could also be observed, along with other currents whose intensities are integer multiples of the smaller 4-pA currents. The main gating event, however, corresponds to the 20-pA currents, which seemingly result from the positive coupling of five of the smaller 4-pA current levels. The amplitude histograms of each of the above recordings are shown to the right. Dashed lines in *B* and *C* (flanked by numbers '1' through '5') are solely to indicate the 4-, 8-, 12-, 16-, and 20-pA current levels.

in bursts of activity within long-lived silent periods. Channel openings are somewhat variable in amplitude, particularly at positive voltages, and quite noisy, mostly at negative voltages. These recordings were used to calculate the open channel probability (Fig. 2C), as the fraction of time during which the channels are opened. Such values were lower than 0.06 ($n = 6$), which is in fair accordance with reports by others (29) and exhibited a bell-shaped voltage dependence with a maximum at $\sim +120$ mV. The regions of these recordings showing bursts of activity were also used to study the voltage dependence of channel current. Fig. 2D shows the channel I/V relationship obtained by averaging the current amplitudes at each of the different potentials from several different patches ($n = 9$). An estimated mean slope conductance of 75.5 ± 3.0 pS was obtained. Also, it was observed that KcsA showed open channel rectification with mean chord conductances at +200 and -200 mV of 41.8 ± 1.2 pS and 28.4 ± 1.2 pS, respectively. These conductance values are comparable to those reported previously for KcsA reconstituted into planar lipid bilayers (8, 10, 11, 28, 30).

The routine averaging of the current size measurements used for the I/V plots, however, might be misleading, as a closer examination of individual patches reveals that single channel-like openings of clearly different sizes are present in the recordings. Fig. 3 illustrates such variability in recordings taken at +150 mV in which either 4-pA (Fig. 3A) or 8-pA (Fig. 3B) currents, can be observed as the almost exclusive gating events in each case. The latter 8-pA currents were predominant in most of the patches recorded and in fact, I/V plots obtained from selected recordings showing almost exclusively such currents yielded conductance values very similar to those determined from the "average" measurements from above. Regardless of their frequency of appearance, both the 4- and 8-pA closing and opening events have a single channel-like appearance as far as instrumental resolution distinguishes. This, along

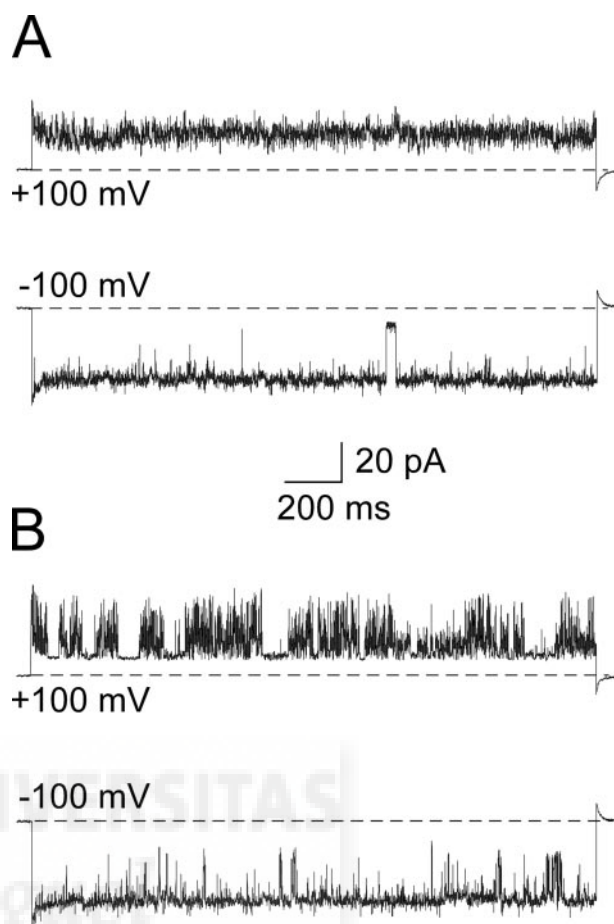


FIGURE 6. Channel opening of KcsA in HOP patterns does not depend on acidic pH. *A*, shows recordings of channel activity taken at ± 100 mV using the usual solutions at pH 4 in the bath and pH 7 in the pipette. *B*, shows recordings taken under identical conditions except that the pH in the bath solution was also 7. The dashed lines indicate the zero current levels.

with the fact that the larger currents have twice the amplitude of the smaller ones suggests the possibility that, rather than variability in the channel currents, we might be dealing with a phenomenon of coupled gating involving two identical channels acting synchronously. To test this possibility, we proceeded as reported in Kenyon and Bauer (31) by analyzing the amplitude distributions in recordings having 0 (closed states), 4- and 8-pA events to calculate the so-called "coupling parameter," which in all cases yielded values higher than zero, indicating that indeed the openings of the two single channels involved occur cooperatively and are positively coupled. Moreover, we also encountered other recordings in which currents of either 12- or 16-pA currents were detected at +150 mV in the absence of the above 4- or 8-pA currents (not shown) during short but significant periods of time. This suggests that coupling could occasionally go beyond the association of two KcsA channels providing an explanation to the apparently controversial finding of several subconductance states reported earlier (7, 8, 30), in which the possibility of coupled gating as a source of diversity was not considered. Other previously reported channel properties of KcsA, including its selectivity for K^+ or its typical blockade by Na^+ added to the bath solution, mainly at positive voltages, were also found in our experimental system and will not be described here.

Analysis of the HOP Pattern—HOP patterns can be readily distinguished from the LOP patterns from above, because under identical experimental conditions, the channels now remain open most of the time and much more current is conducted through these patches (Fig. 1,

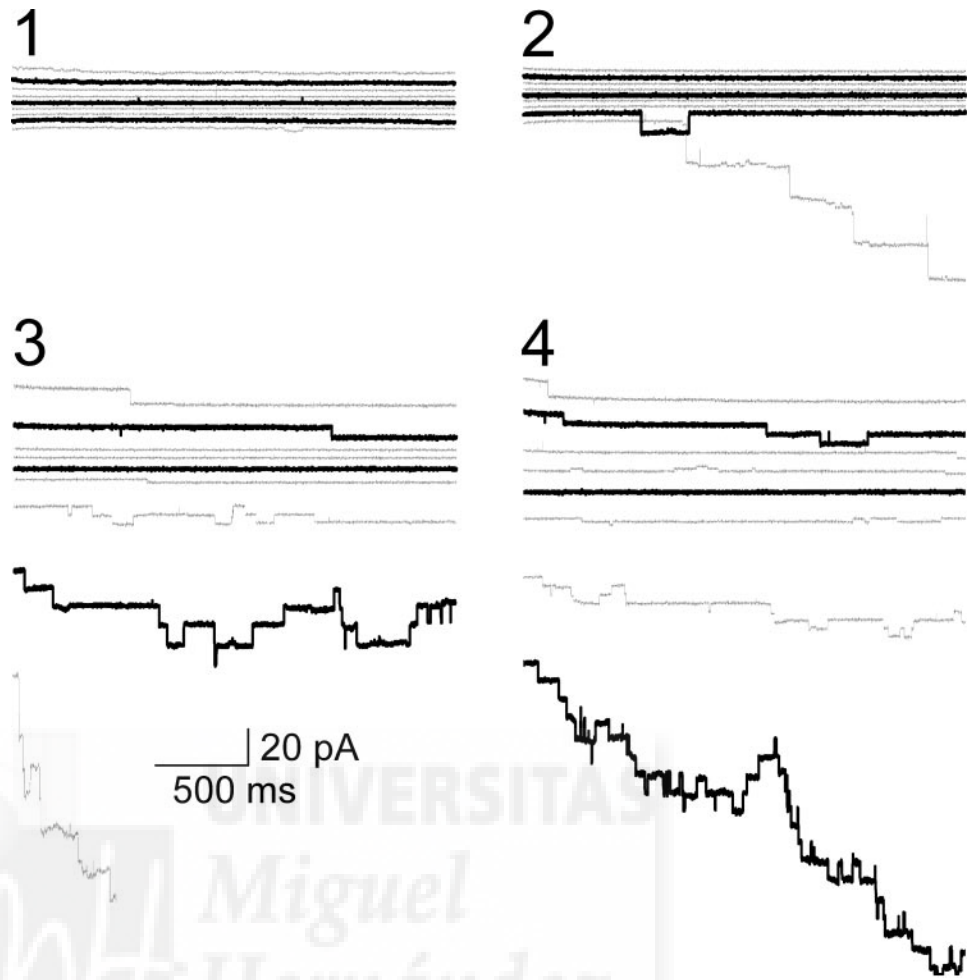


FIGURE 7. Occasional ladder-like openings exhibited by a small number of patches from KcsA giant liposomes. The number of open channels increases during the time course of the recording as the protocol of pulses is applied repetitively. Number 1 refers to the first sequence of pulses, while 2, 3, and 4 refer to successive pulse sequences applied to the patch at 10- to 20-s intervals. The recordings corresponding to +150, 0, and -150 mV in the successive sequences of pulses have been highlighted in a *thicker trace*.

C and D). Fig. 4A shows the currents observed at different voltages in the most frequently found HOP pattern, such as that in Fig. 1C. Estimates of the open channel probability yielded values as high as 0.9 within the +100 to -100 mV range, with a maximum near 0 mV and decreasing both at extreme negative or positive voltages (Fig. 4B). These extreme voltages, which allow for more clear recordings of both channel openings and closings were used to analyze the gating properties of these HOP patterns. Fig. 5A shows in detail a representative long recording taken at +150 mV in which three main current levels were observed, each of ~20 pA (equivalent to 133 pS at this voltage), closing successively to finally reach the zero current level. A closer view of the lower 20-pA current level (Fig. 5, B and C) reveals that, indeed, 20-pA currents were the most frequently observed events and, as far as instrumental resolution permits, appeared mostly as large, single channel-like openings or closings, going all the way from the closed state to the 20-pA current level or *vice versa*. These large 20-pA currents, however, were accompanied by much less frequent, smaller current levels of ~4, 8, 12, and 16 pA, *i.e.* integer multiples of the smaller 4-pA currents. Disregarding the differences in the open channel probability, this is reminiscent of the coupled gating observed in the LOP pattern from above, except that in HOP patterns the coupling seemingly involves up to five 4-pA currents to give rise to the main 20-pA “single” channel events. Unfortunately, the high number of channels involved in this latter putative coupling process prevents the determination of the coupling parameter as done in the LOP patterns from above. The apparent coupling observed in HOP patterns, however, may occasionally be incomplete as shown in Fig. 5B, in which the lower 0- to 4-pA current level remains

open for some time, as if temporarily excluded from coupling with the other four current levels. Additionally, intense variable flickering, spanning several current levels such as those shown also in Fig. 5C, was observed intercalated between regions of coupled gating, as if the ensemble of unitary currents went through periods of variable stability.

In addition to the differences in open channel probability and its voltage dependence, as well as in the degree of the apparent coupled gating, there were other striking differences between HOP and LOP patterns. For instance, channel activity in HOP patterns does not depend on acidic pH anymore and is present at either pH 4 or pH 7 in the bath solution, although the gating features are different (Fig. 6). Also and most remarkably, HOP patterns are not blocked by Na⁺, which in fact becomes a conducting species (data not shown). Blockade by Na⁺ is considered a hallmark of potassium channels, although in KcsA in particular, a significant Na⁺ conduction has been reported previously in the reconstituted planar bilayer system at extreme voltages, in which a “punch-through” mechanism was invoked (32), or in protoplast-liposome vesicle preparations from *Streptomyces* micelia, where a permeability ratio P_{K}^{+}/P_{Na}^{+} of only three was estimated (7). The above observations on the different pH sensitivity and Na⁺ blockade between HOP and LOP patterns strongly indicate that some of the previously reported properties of KcsA may change quite dramatically when in an HOP pattern.

Ladder-like Openings: From No Activity to Building a HOP Pattern—We referred above to a minor population of patches (only 6 out of a total of 93 active patches) in which the main feature is that the number of open channels increases during the time course of the recording as the protocol

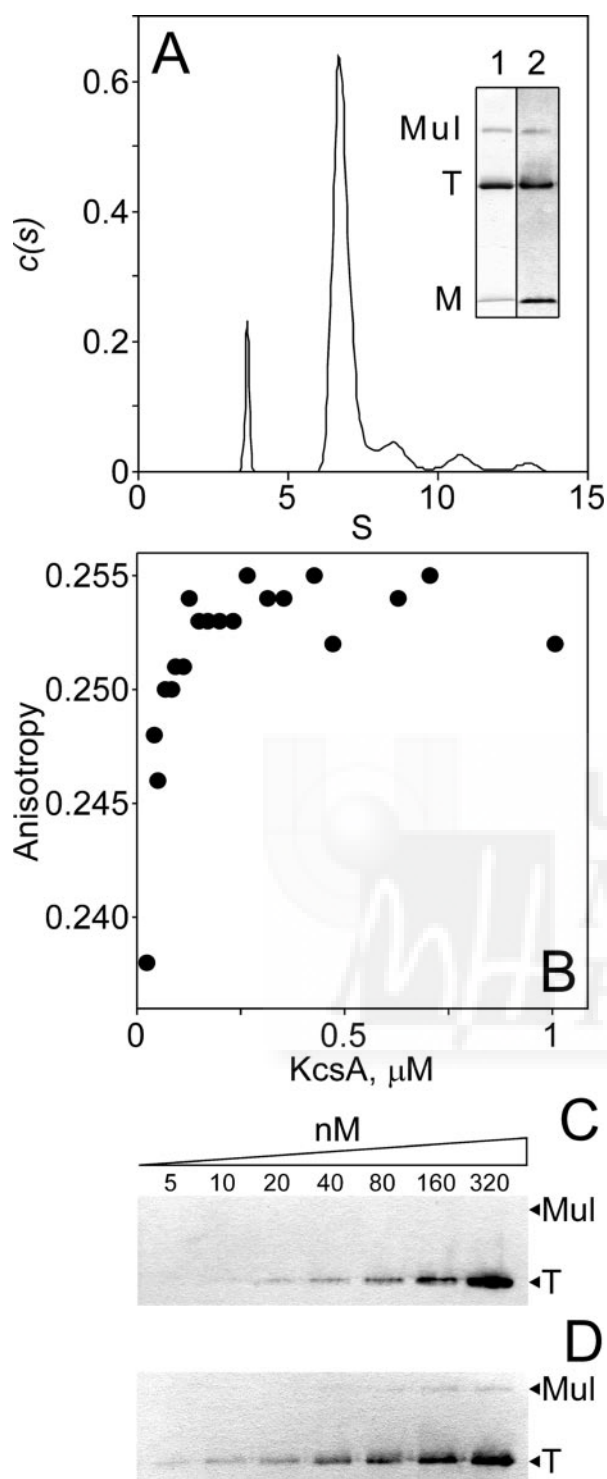


FIGURE 8. Supramolecular assembly of KcsA in detergent solution. *A*, apparent sedimentation coefficient distribution derived from sedimentation velocity profiles of detergent-solubilized KcsA (5 μM in terms of KcsA tetramers). Such distribution remained fairly constant within the protein concentration range studied (0.5–10 μM). The *inset* shows typical SDS-PAGE (*lane 1*) and Western anti-His tag immunoblot (*lane 2*) profiles for the purified KcsA preparations used in these studies. *M*, *T*, and *Mul* stand for monomeric, tetrameric, and multimeric KcsA, respectively. *B*, protein concentration dependence of the steady-state fluorescence anisotropy of detergent-solubilized, Alexa 546-labeled KcsA at 25 °C, in a lower protein concentration range (0.025–1 μM). The anisotropy for the free Alexa probe was 0.069. *C*, Western blots from detergent-solubilized KcsA samples to illustrate that tetrameric KcsA remains as the predominant species even under these conditions of low protein concentration, but multimeric KcsA species can hardly be seen. Such multimeric KcsA species in the Western blots, however, can be readily observed at these protein concentrations when reconstituted KcsA samples, instead of detergent-solubilized KcsA, are used in the experiments (*D*).

of pulses is applied repetitively. Fig. 7 shows recordings from one of such patches in which the first group of pulses (numbered '1' in Fig. 7) results in essentially no activity at any of the voltages studied. Subsequent recordings (numbered '2' to '4') taken immediately afterward, however, show that channel openings begin to appear quite conspicuously on top of one another in a ladder-like manner, first at -200 mV, but also at most other voltages in subsequent groups of pulses. Estimation of the size of the current "steps" in the ladder-like ensemble allows distinguishing that, in three out of the six patches showing this behavior, currents corresponding to the unitary current level seen in the LOP or HOP patterns from above, enter or leave the ladder mostly one by one, whereas in the remaining three patches such as that shown in Fig. 7, entering or leaving of pairs of such current levels was observed. Therefore, the same elemental current events seen in the LOP or HOP patterns from above seem also responsible for building up these unusual ladder-like patterns. Eventually, these patches either broke up or become an inward-rectifier type HOP pattern similar to that depicted in Fig. 1*D*, but more importantly, the observation of this ladder-like behavior suggests that the KcsA channels contained in these patches, which are initially inactive, are subjected to a dynamic process that somehow makes them interact with each other in response to the voltage pulses and to acquire a much higher open channel probability.

Evidence for KcsA Clustering—Previous reports on ryanodine (33) or dihydropyridine receptors (34) correlated functional coupling with physical clustering of the channels by evidencing the appearance of a higher sedimentation coefficient species by centrifugation of detergent-solubilized preparations of the channel protein. Here, we carried out analytical ultracentrifugation sedimentation velocity studies in DDM-solubilized KcsA samples at protein concentrations ranging 0.5 to 10 μM . The results show that, regardless of the protein concentration, there is a major sedimenting species of 6.7 S which, depending on the different KcsA preparations, accounted for 80–90% of the total protein (Fig. 8*A*). According to the Svedberg equation (35) and assuming a spherical shape and a 0.73 cm^3/g partial specific volume, the above sedimentation coefficient corresponds to an apparent molecular mass of 110 kDa. This fits fairly well to the theoretical molecular mass of 76 kDa for the KcsA tetramer (160 amino acids per monomer in the native protein, plus 12 additional N-terminal amino acids containing the poly-histidine tag) bound to a reasonable number of DDM molecules. Such putative tetrameric species is accompanied by a lighter species, whose sedimentation coefficient yields an apparent molecular weight similar to that expected from the KcsA monomer, 19 kDa, and by up to three heavier species with average sedimentation coefficients of 9.6, 12.4, and 15.0 S (corresponding to ~ 190 , 280, and 370 kDa, respectively), which altogether accounted for ~ 10 –15% of the total protein in these samples. These observations are somewhat reminiscent of those made using SDS-PAGE (14) in which, in addition to a major band of tetrameric KcsA (the major form in which the purified KcsA runs in SDS-PAGE from non-boiled samples), there is an accompanying band corresponding to KcsA monomer and additional bands heavier than the tetramer, which are more apparent upon reconstitution of the purified KcsA into lipid vesicles and whose molecular weights correspond to the SDS-resistant association into multimers of two or more KcsA tetramers, respectively (see *inset* to Fig. 8*A*).

The possible protein concentration dependence of multimer formation could not be illustrated accurately by analytical centrifugation because of the low 280-nm absorbance in the lower protein concentration range. For this reason, we turned out to use more sensitive fluorescence measurements to study this low protein concentration range. For these experiments, a cysteine-substituted mutant at a strategic site in the KcsA sequence (KcsA S22C) was reacted with sulfhydryl-reactive

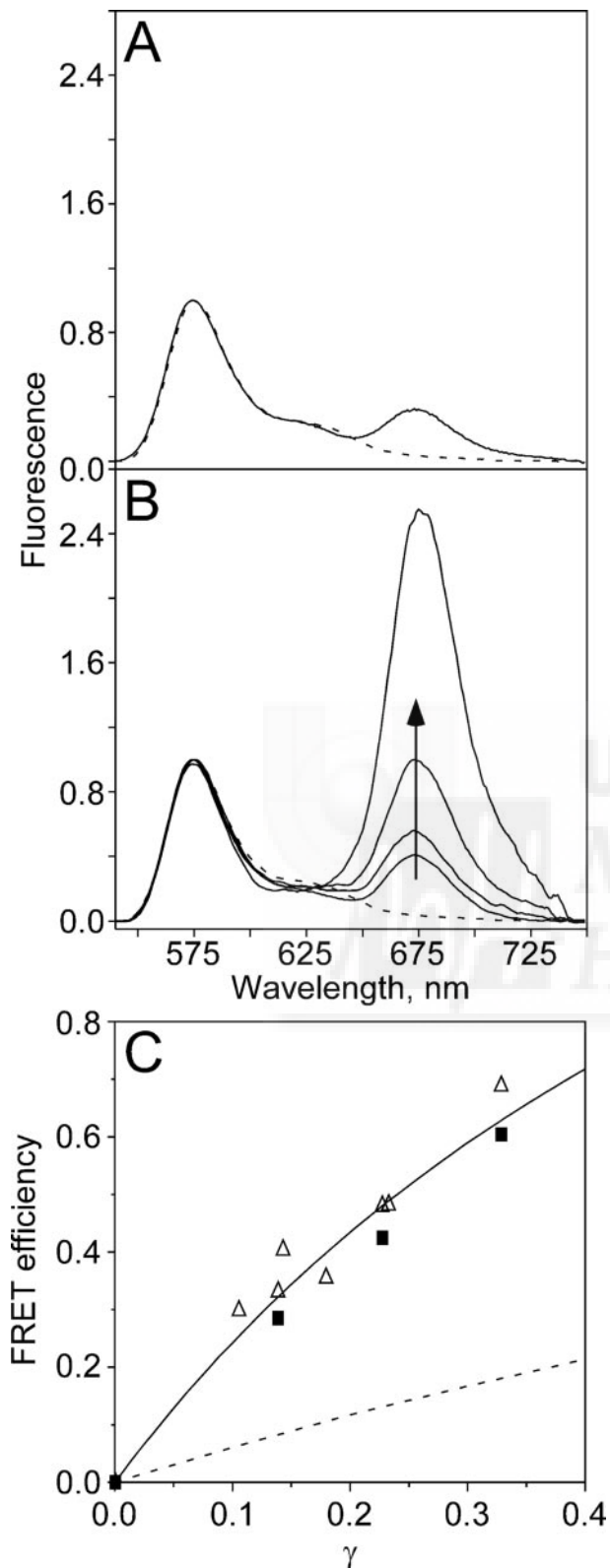


FIGURE 9. FRET measurements from Alexa 546- and Alexa 647-labeled KcsA as donor and acceptor pair, respectively. *A*, illustrates the results obtained with detergent-solubilized samples (labeled proteins in 10 mM Hepes, pH 7, 100 mM KCl, 5 mM DDM) at a donor to acceptor ratio of 1:0 and 1:2.1 (*discontinuous* and *continuous* lines, respectively). *B*, results obtained in reconstituted vesicles containing the labeled proteins at varying donor to acceptor ratios (1:0, 1:0.4, 1:0.6, 1:1.7, and 1:10). The *arrow* indicates how the acceptor emission at 675 nm increases as the acceptor is increased with respect to the donor. *C*, estimates of FRET efficiency in reconstituted vesicles determined from either steady-state emission spectra (*opened triangles*) or from donor lifetime mea-

fluorophores (Alexa 546 or 647 maleimide derivatives) to attain fluorescently labeled protein. Fig. 8*B* shows fluorescence anisotropy measurements obtained from the Alexa 546-labeled KcsA. At protein concentrations higher than 0.25 μM , the anisotropy values remain constant and fairly high, as expected from a limited rotational mobility of the relatively large protein species seen in solution. However, at lower concentrations there is a clear concentration dependence of the fluorescence anisotropy, which suggests that the assembly of the larger species from the predominant KcsA tetramers occurs within that concentration range. Such an assembly can be partly reversed by simple dilution of the samples to lower protein concentrations, as shown in Fig. 8. The anisotropy data receive apparent support from simple SDS-PAGE/Western blots (Fig. 8*C*), which indicate that, in detergent-solubilized samples, bands of KcsA multimers can hardly be seen at such low concentrations unless heavily overexposed, whereas they are more easily detected in reconstituted samples containing an identical amount of protein.

The fluorescently labeled Alexa 546 and Alexa 647 KcsA derivatives were also used as donor-acceptor pairs for FRET experiments in detergent solution and in reconstituted vesicles made under identical conditions to those used to prepare the giant liposomes for patch clamp measurements. The R_0 (distance at which there is a 50% efficiency of transfer) was calculated from the spectral overlap as $\sim 68 \text{ \AA}$, which seems a sensible distance to monitor supramolecular assembly of KcsA tetramers. Fig. 9 shows that, upon excitation of the donor, there is an increase in acceptor emission as the acceptor:donor ratio is increased, consistent with the occurrence of energy transfer. Such process, however, is less efficient in the detergent-solubilized samples (Fig. 9*A*) than in the reconstituted vesicles (Fig. 9, *B* and *C*), suggesting that reconstitution of the tetrameric KcsA into lipids favors its supramolecular assembly into clusters.

Giant liposomes were also prepared from the reconstituted vesicles containing the fluorescently labeled KcsA in an attempt to visualize the clusters by confocal microscopy. The experimental conditions used in the preparation of such giant liposomes were essentially identical to those used for the recording of KcsA activity by patch clamp techniques. Fig. 10*A* illustrates that the fluorescently labeled protein is distributed heterogeneously in the giant liposomes, defining large (up to micrometer size) highly fluorescent array-like protein complexes on a more homogeneous background containing small fluorescent spots and punctuations of different size throughout. The observed heterogeneity in the distribution of the labeled protein truly responds to the specific association of KcsA molecules, because the distribution of an additional fluorescent phospholipid probe, contained simultaneously in the giant liposomes (Fig. 10*B*), shows that the lipid is distributed much more homogeneously. Thus, the above observations strongly suggest that extensive, heterogeneous clustering of KcsA occurs upon reconstitution into the giant liposomes.

Giant liposomes containing both donor- and acceptor-labeled KcsA at different ratios are also amenable for "*in situ*" FRET measurements by exciting at the appropriate donor excitation wavelength and recording acceptor emission in the confocal microscope (Fig. 11). In agreement with the FRET measurements in the fluorometer cuvette from above, these *in situ* measurements show FRET in the individual giant liposomes between closely arranged donor- and acceptor-labeled KcsA.

measurements (*closed squares*) (see "Experimental Procedures"). The *curve* in the *continuous* line is provided to as a visual guide, whereas the *discontinuous* trace corresponds to the expected theoretical contribution to the FRET signal arising from the random distribution of donor and acceptor molecules in the two-dimensional lipid bilayer. The parameter γ in the *abscissa* measures the acceptor surface density and is equal to the number of acceptor molecules contained within a disk of radius, R_0 , the Förster distance (25).

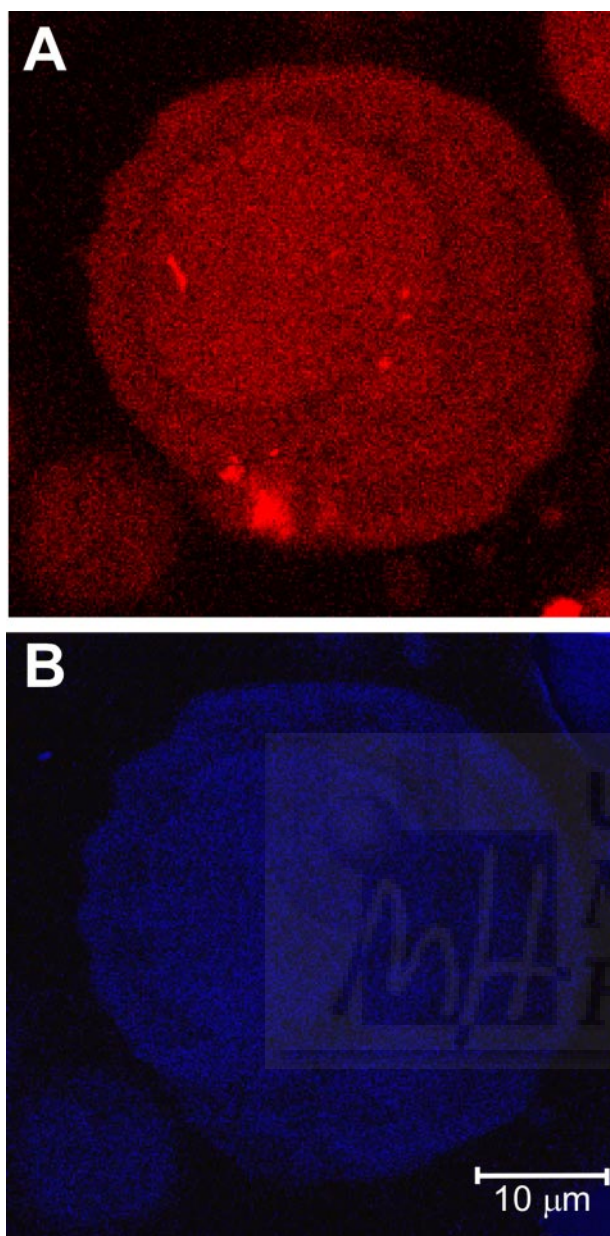


FIGURE 10. A, fluorescence microscopy images of KcsA clusters in a confocal cross-section of a giant liposome containing Alexa 546-labeled KcsA. Large and highly fluorescent array-like protein complexes of variable sizes are seen over a more homogeneous protein fluorescence background. In contrast to the marked heterogeneity in the distribution of the KcsA protein from above, B shows that the fluorescence of a phospholipid probe (NBD-DMPE) recorded in the same liposome is distributed much more homogeneously.

Moreover, these observations suggests that the larger KcsA clusters are heterogeneous, because they contain regions where energy transfer occurs, along with adjacent regions within the same cluster, which exhibit fluorescence from only the donor- or the acceptor-labeled protein.

DISCUSSION

The more we learn on the different ion channel families, the more we realize that their functional responses are sometimes exquisitely dependent on molecular interactions among themselves or with other cellular components, whose regulatory roles could not be always anticipated from the *in vitro* characterization of the purified channel proteins. Physical clustering of ion channels into closely packed assemblies

is among the possible consequences of such intermolecular interactions, and because it is often accompanied by coupled channel gating (33, 36–42) it seems a sensible strategy to secure an optimal ion channel-mediated signaling in response to the appropriate stimuli.

Herein we report that the purified, tetrameric KcsA assembles into clusters of different size. In detergent solution, supramolecular clustering occurs to some extent affecting 10–15% of the total protein. Clustering in detergent solution has been demonstrated by analytical ultracentrifugation, fluorescence anisotropy of the covalently labeled protein, and fluorescence resonance energy transfer using a donor-acceptor pair of KcsA-bound probes. The analytical ultracentrifugation studies show that the KcsA multimers are conformed as discrete sedimenting species with defined stoichiometries, thus excluding the possibility of a nonspecific protein aggregation process. Additionally, the fluorescence anisotropy studies indicate that, even at fairly low protein concentrations, the detergent-solubilized KcsA is subjected to a partly reversible, concentration-dependent equilibrium between cluster-assembled and unassembled forms. Likewise, the efficiency of fluorescence energy transfer between donor- and acceptor-labeled KcsA, which is lower in detergent solution when compared with that seen upon reconstitution of the labeled proteins into lipid vesicles, indicates that the assembly process is clearly favored in the latter conditions. Moreover, confocal microscopy experiments in the reconstituted giant liposomes allow for the visualization of heterogeneous KcsA clusters, some of which reach micrometer size. Additional retrospective evidence to support the clustering of KcsA comes from SDS-PAGE analysis of the purified protein as prepared by most groups working in this field: Bands of molecular weight higher than that corresponding to the characteristic tetramer of four identical subunits (the usual way in which the SDS-resistant KcsA runs in SDS gels) are present both in detergent-solubilized preparations and even more markedly, in reconstituted membranes (14), attesting to the stability (SDS resistance) of some of the building blocks in the clustered forms.

All the above indicates that the tetrameric KcsA has an intrinsic tendency to assemble *in vitro* into heterogeneous supramolecular assemblies or clusters, particularly when reconstituted into membranes. This implies that when a membrane patch is excised from the reconstituted giant liposome for patch clamp recording purposes, there is a finite probability that it would contain KcsA organized in the form of different supramolecular entities, from the more complex large protein arrays to the individual tetrameric protein. According to the observations made in the clustering of receptors (43), clustered assemblies provide the means to convert conformational changes from a single origin into intermolecular allosteric behavior. Indeed, some of the best characterized cases of ion channel clustering, such as ryanodine receptors (33, 37, 38), serotonin 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors (40), Kir 4.1 (36), or Kv 2.1 (39) potassium channels, or cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels (41, 42), show that channel activity is dependent on clustering. Therefore, assuming that this would also be the case for KcsA, different channel activity patterns should be expected in the patch clamp recordings arising from the different supramolecular entities present in the giant liposomes. The experimental observation seemingly complies with such an expectation, because different channel activity patterns are in fact detected. The LOP pattern is the most frequently observed and likely represents the simplest mode of assembly of KcsA, because only single channel openings or, more often, gating of two positively coupled channels are detected as the predominant events. The features of the LOP pattern, *i.e.* an acidic pH- and voltage-dependent gating, moderate selectivity for potassium, blockade by sodium, and a very low channel opening probability, essentially coincide with those reported previously for KcsA reconstituted in planar lipid bilay-

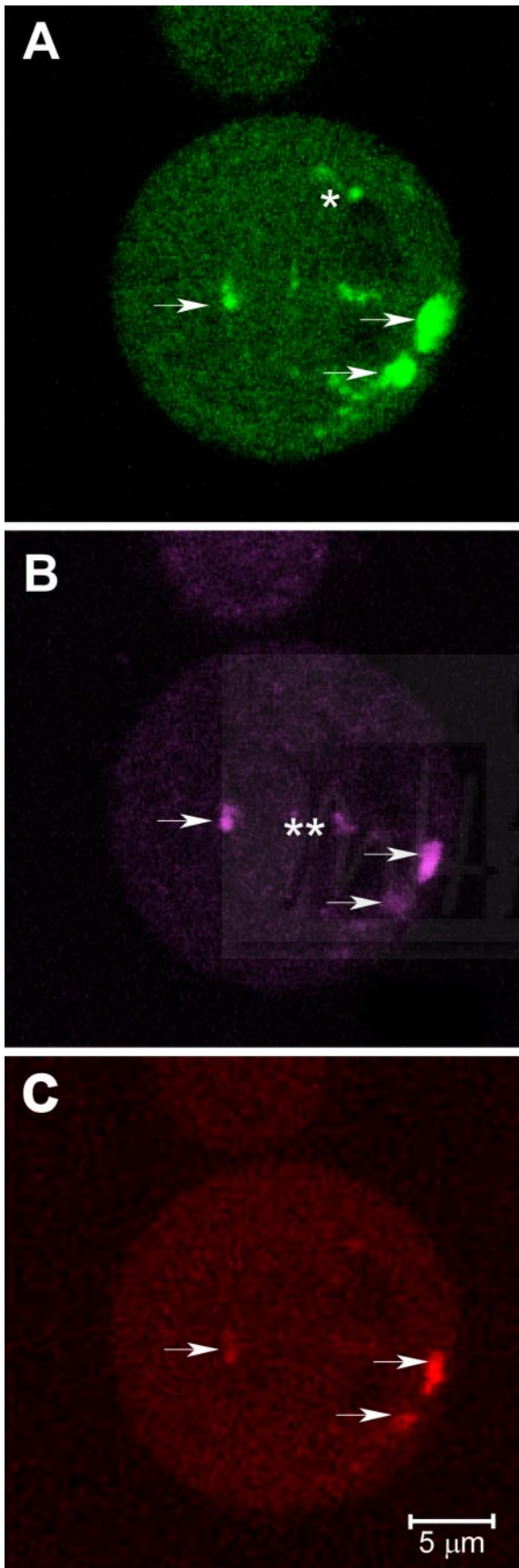


FIGURE 11. **FRET imaging of KcsA clusters.** Giant liposomes containing both Alexa 546- and Alexa 647-labeled KcsA were used in these experiments. Alexa 546 direct emission and FRET fluorescence were recorded simultaneously using the two available channels

ers (8, 10, 11, 28). Such an apparent equivalence seems consistent with the present findings, because the concentration of protein that became incorporated into planar bilayers is usually very low, and therefore, the protein concentration dependence of the clustering equilibrium as reported here should be displaced to favor the less complex forms of assembly of KcsA. It should be emphasized, however, that the predominant gating event found in our LOP patterns corresponds to the positive coupling of two KcsA channels and that the estimated conductance is practically identical to that reported as the single channel conductance in planar lipid bilayers (see *e.g.* Ref. 11). Thus, it seems likely that similar coupling phenomena might serve to explain previous results (and subsequent discrepancies) on complex, multiple conductance levels reported occasionally for KcsA (7, 8, 28, 30).

HOP patterns have been detected in different forms and, besides their characteristic high channel opening probability, they all have in common frequent events of multiple coupled gating, mostly involving five single channels acting synchronously, and channel opening both at neutral and acidic pH. As to the former, regardless of how many channels might be involved in the concerted multiple openings seen in the HOP patterns, the minimal currents detected seem identical in size to that seen in the LOP pattern, suggesting that the same “building blocks” are used in all possible KcsA assemblies, regardless of their complexity and behavior. Moreover, because the existing reports on channel clustering show that it is often accompanied by coupled gating and increased activity, we interpret our multiple coupled gating and increased channel opening probability in the HOP patterns as a direct consequence of the clustering process. Indeed, the ladder-like HOP patterns (Fig. 7) show how the number of open channels in a given patch increases dramatically during the time course of the recording, likely as a consequence of clustering of the existing channels within the patch. Interestingly, a recent report on clustering of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (44) shows that a conformational change to the *open channel state* is required prior to its assembly into clusters. We do not know whether this would also be the case for KcsA but, certainly, a similar mechanism should be invoked to explain the much increased activity. Indeed, this possibility seems supported by a recent report (45) in which dimers of KcsA tetramers are formed in detergent solution when at pH 5, which favors open channel forms of KcsA, but not at pH 7.

As to the change in pH sensitivity, our observations in the HOP patterns are not completely unprecedented, because the opening of KcsA at neutral pH was found in KcsA when simply subjected to a transmembrane ionic gradient (12). More strikingly, KcsA in the HOP patterns seems to have lost the ability to be blocked by Na^+ , which is exhibited only by LOP patterns. Such an apparently controversial finding, however, might be related to existing reports on an altered ionic selectivity and other properties of KcsA reconstituted in different conditions (7, 8, 13) or when subjected to extreme voltages in planar bilayers (32).

The above unexpected changes in the known properties of KcsA when in a HOP pattern might arise from modification or direct involvement of their corresponding molecular determinants in the protein-protein interactions and/or conformational rearrangements involved in the clustering process. For instance, it is known that inward rectification in Kir channels (46) is partly determined by the relative proximity between acidic amino acid res-

for simultaneous data acquisition, while direct emission of the Alexa 647-labeled protein was taken immediately afterward. A–C, respectively, show images of Alexa 546 (donor) fluorescence, Alexa 647 (acceptor) fluorescence, and the donor to acceptor FRET. The arrows indicate the presence of clusters containing both Alexa 546- (A) and Alexa 647-labeled KcsA (B), in which FRET indeed occurs (C). On the contrary, the *single asterisk* in A indicates KcsA clusters exhibiting only donor fluorescence; whereas the *double asterisk* in B indicates clusters exhibiting only acceptor fluorescence. As expected from the lack of either donor- or acceptor-labeled protein within those clusters (C), no FRET occurs at the *single or double asterisk regions* in the giant liposomes.

idues at strategic sites near the cytoplasmic channel mouth. Such an example provides a nice correlation between a channel feature (inward rectification) and the topology of specific residues, but, because KcsA too has acidic side chains (Glu-118 and Glu-120) near the inner channel mouth whose relative positioning might be affected during clustering, it also provides a plausible hypothesis to explain the inward rectification observed in some of the HOP patterns reported here.

Concentration-dependent clustering in protein solutions and colloids has been attributed to a combination of short range attractive and long range electrostatic repulsive forces (47). In KcsA, both the C- and N-terminal regions in the protein sequence are rich in charged amino acid side chains, and therefore, they appear as potential candidates to act as molecular determinants for cluster formation and integrated behavior. In this respect, preliminary experiments using 1–125 KcsA obtained from chymotrypsin cleavage of full-length 1–160 KcsA show clustering and HOP patterns undistinguishable from those of the wild-type protein, *i.e.* indicating that the large 126- to 160-amino acid C-terminal portion of the protein is not involved in these processes (not shown). The possible roles of the N-terminal or the transmembrane segments of the protein in these processes are presently still under investigation, and additional work is needed to reach more definitive conclusions on this issue.

The finding that KcsA, one of the structurally simplest ion channels known to date, shows such a complex clustering and coupled gating behavior “*in vitro*” is surprising. We do not know enough about the biology of *Streptomyces* to be able to say whether these phenomena would also happen “*in vivo*” and serve any physiological purpose. However, the molecular crowding expected *in vivo*, along with the protein concentration dependence observed in the *in vitro* process, makes it likely that clustering would also occur in the bacterial membrane. Nevertheless, it should be noted that our *in vitro* observations probably correspond to deregulated clustering processes, because the putative anchoring molecules needed *in vivo*, if any, would not be present in our purified, recombinant KcsA preparations. In KcsA in particular, polyphosphates and polyhydroxybutyrate, which are abundant reservoir materials in prokaryotic cells, have been reported to interact with KcsA to form conductive complexes (13, 48). Therefore, these or similar compounds, such as prokaryotic alternatives to PDZ-domains or other anchoring proteins observed in the clustering of other channels (33, 41, 42, 49), might provide a clue as to where to start looking for potential cluster-inducing or cluster-stabilizing molecules. Thus far, however, it seems reasonable to assume that KcsA clustering, coupled gating, and channel opening at neutral pH with high probability, may be more biologically meaningful than the currently established view of KcsA opening only at very acidic intracellular pH and with very low probability.

Acknowledgments—We are indebted to our colleagues Dr. Roberto Gallego (Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández) and Dr. Andrés Morales (Departamento de Fisiología, Universidad de Alicante) for critical reading of the manuscript. We also thank Dr. F. Sala and Dr. S. Sala (Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández) and Dr. Germán Rivas and Dr. Carlos Alfonso (Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid) for their help with the patch clamp and the analytical ultracentrifugation experiments, respectively. Eva Martínez provided excellent technical help throughout.

REFERENCES

1. Booth, I. R., Edwards, M. D., and Miller, S. (2003) *Biochemistry* **42**, 10045–10053
2. MacKinnon, R. (2003) *FEBS Lett.* **555**, 62–65
3. Doyle, D. A. (2004) *Mol. Membr. Biol.* **21**, 221–225
4. Armstrong, C. M. (2003) *Sci. STKE* **2003**, RE10

5. Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69–77
6. Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001) *Nature* **414**, 43–48
7. Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) *EMBO J.* **14**, 5170–5178
8. Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., and Schrempf, H. (1999) *FEBS Lett.* **462**, 447–452
9. Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M., and Schrempf, H. (2000) *FEBS Lett.* **472**, 83–87
10. Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) *J. Gen. Physiol.* **114**, 551–560
11. LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) *J. Gen. Physiol.* **118**, 303–314
12. Zakharian, E., and Reusch, R. N. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 429–436
13. Zakharian, E., and Reusch, R. N. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1059–1065
14. Molina, M. L., Encinar, J. A., Barrera, F. N., Fernandez-Ballester, G., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2004) *Biochemistry* **43**, 14924–14931
15. Riquelme, G., Lopez, E., Garcia-Segura, L. M., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1990) *Biochemistry* **29**, 11215–11222
16. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) *Pflügers Arch.* **391**, 85–100
17. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
18. Schuck, P. (2000) *Biophys. J.* **78**, 1606–1619
19. Gonzalez, J. M., Velez, M., Jimenez, M., Alfonso, C., Schuck, P., Mingorance, J., Vicente, M., Minton, A. P., and Rivas, G. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1895–1900
20. Lackowicz, J. R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, pp. 291–391, Plenum Press, New York
21. Selvin, P. R. (2002) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 275–302
22. Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M. K., Millard, P. J., Mao, F., Leung, W. Y., and Haugland, R. P. (1999) *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1179–1188
23. James, D. R., Siemiarczuk, A., and Ware, W. R. (1992) *Rev. Sci. Instrum.* **63**, 1710–1716
24. Liu, R., Siemiarczuk, A., and Sharom, F. J. (2000) *Biochemistry* **39**, 14927–14938
25. Capeta, R. C., Poveda, J. A., and Loura, L. M. (2006) *J. Fluoresc.* **16**, 161–172
26. Wolber, P. K., and Hudson, B. S. (1979) *Biophys. J.* **28**, 197–210
27. Choi, H., and Heginbotham, L. (2004) *Biophys. J.* **86**, 2137–2144
28. Cuello, L. G., Romero, J. G., Cortes, D. M., and Perozo, E. (1998) *Biochemistry* **37**, 3229–3236
29. Irizarry, S. N., Kutluay, E., Drews, G., Hart, S. J., and Heginbotham, L. (2002) *Biochemistry* **41**, 13653–13662
30. Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., and Schrempf, H. (2001) *Eur. Biophys. J.* **30**, 385–391
31. Kenyon, J. L., and Bauer, R. J. (2000) *J. Neurosci. Methods* **96**, 105–111
32. Nimigeon, C. M., and Miller, C. (2002) *J. Gen. Physiol.* **120**, 323–335
33. Marx, S. O., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Henrikson, C., Ondrias, K., and Marks, A. R. (2001) *Circ. Res.* **88**, 1151–1158
34. Wolf, M., Eberhart, A., Glossmann, H., Striessnig, J., and Grigorieff, N. (2003) *J. Mol. Biol.* **332**, 171–182
35. Cole, J. M., and Hansen, J. C. (1999) *J. Biomol. Tech.* **10**, 163–176
36. Horio, Y., Hibino, H., Inanobe, A., Yamada, M., Ishii, M., Tada, Y., Satoh, E., Hata, Y., Takai, Y., and Kurachi, Y. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12885–12888
37. Laver, D. R., O'Neill, E. R., and Lamb, G. D. (2004) *J. Gen. Physiol.* **124**, 741–758
38. Yin, C. C., Blayney, L. M., and Lai, F. A. (2005) *J. Mol. Biol.* **349**, 538–546
39. Misonou, H., Mohapatra, D. P., Park, E. W., Leung, V., Zhen, D., Misonou, K., Anderson, A. E., and Trimmer, J. S. (2004) *Nat. Neurosci.* **7**, 711–718
40. Herrick-Davis, K., Grinde, E., Harrigan, T. J., and Mazurkiewicz, J. E. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 40144–40151
41. Raghuram, V., Mak, D. D., and Foskett, J. K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1300–1305
42. Wang, S., Yue, H., Derin, R. B., Guggino, W. B., and Li, M. (2000) *Cell* **103**, 169–179
43. Bray, D., and Duke, T. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 53–73
44. Tateishi, Y., Hattori, M., Nakayama, T., Iwai, M., Bannai, H., Nakamura, T., Michikawa, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 6816–6822
45. Zimmer, J., Doyle, D. A., and Grossmann, J. G. (2005) *Biophys. J.* **90**, 1752–1766
46. Pegan, S., Arrabit, C., Zhou, W., Kwiatkowski, W., Collins, A., Slesinger, P. A., and Choe, S. (2005) *Nat. Neurosci.* **8**, 279–287
47. Stradner, A., Sedgwick, H., Cardinaux, F., Poon, W. C., Egelhaaf, S. U., and Schurtenberger, P. (2004) *Nature* **432**, 492–495
48. Reusch, R. N. (1999) *Biochemistry* **38**, 15666–15672
49. Marx, S. O., Ondrias, K., and Marks, A. R. (1998) *Science* **281**, 818–821

2.3 Trabajo Adicional

Durante el estudio de la caracterización de la actividad y la agrupación macromolecular de KcsA, desarrollada en esta publicación, se obtuvieron resultados adicionales. Así, se desarrolló una descripción más detallada de los diferentes patrones de actividad LOP y HOP importante para poder interpretar correctamente resultados posteriores, incluyendo el efecto del pH en la actividad y agrupación de KcsA (manuscrito en preparación) y así como el cambio de selectividad K^+/Na^+ (manuscrito en preparación), pero dada la novedad y posible relevancia de estos resultados no fueron incluidos en los artículos anteriores para ser incluidos en una publicación posterior y se resumen en el apartado de Avances Relevantes.





PUBLICACIÓN 3





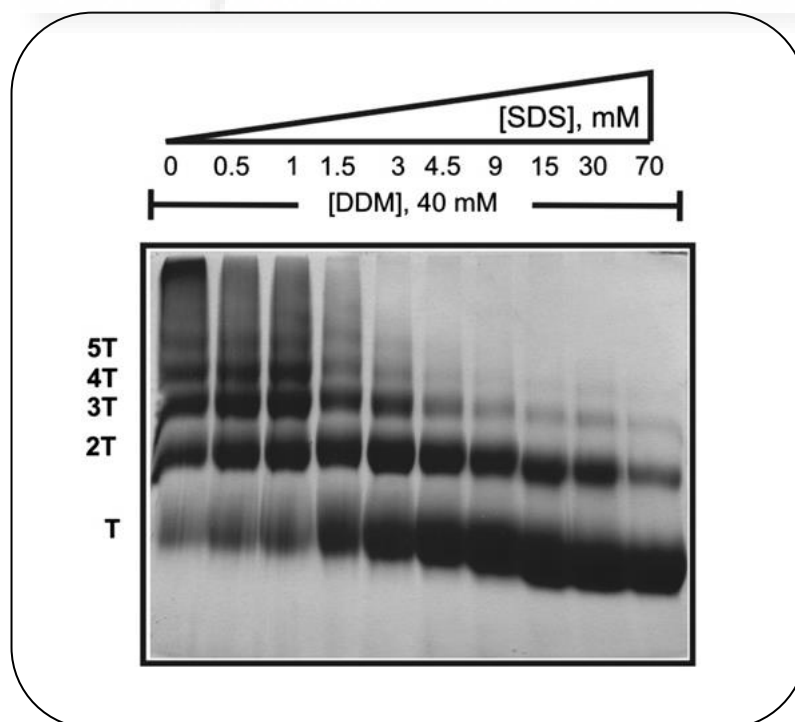
3.1 ENSAMBLAJES MACROMOLECULARES DE KcsA SENSIBLES AL DETERGENTE: ABUNDANCIA RELATIVA E INTERACCIONES IMPLICADAS

Giudici, A.M., Molina, M.L., Ayala, J.L., Montoya, E., Renart, M.L., Fernández, A.M., Encinar, J.A., Ferrer-Montiel, A.V., Poveda, J.A., and González-Ros, J.M. (JBC, 2006)

RESUMEN

En este trabajo, se expone la capacidad de canal de potasio procariota, KcsA, de ensamblarse en una variedad de agrupaciones macromoleculares de tamaños definidos que contienen al canal tetramérico KcsA como la unidad de repetición. Estos grupos, particularmente los más grandes, son marcadamente sensibles al detergente y por tanto, se disocian fácilmente con la exposición a detergentes de uso común en la purificación de proteínas o en electroforesis convencional. Este es un proceso reversible, dado que tras la eliminación del detergente se produce el reensamblaje de las agrupaciones y sin la necesidad de añadir lípidos de membrana. Curiosamente, el ensamblaje dimérico entre dos moléculas de KcsA tetramérico es bastante resistente a la disociación por detergente en moléculas individuales de KcsA tetramérico y junto con éstos últimos, son probablemente los elementos básicos a través de los cuales se organizan los grupos más grandes.

En cuanto a los dominios de la proteína implicados en la agrupación, hemos observado disociación de agrupaciones de KcsA por alquil sulfatos como el SDS. La unión de estos detergentes a sitios "no anulares" entre subunidades de la proteína sugiere que éstos sitios también median las interacciones canal-canal que intervienen en el ensamblaje de las agrupaciones.







Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: Relative abundance and interactions involved[☆]

A. Marcela Giudici¹, M. Luisa Molina¹, José L. Ayala, Estefanía Montoya, M. Lourdes Renart, Asia M. Fernández, José A. Encinar, Antonio V. Ferrer-Montiel, José A. Poveda^{*}, José M. González-Ros^{*}

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2012

Received in revised form 22 August 2012

Accepted 21 September 2012

Available online 27 September 2012

Keywords:

Ion channels supramolecular assembly

Protein clusters

Detergent stability

Crosslinking

Blue native PAGE

Membrane proteins “non-annular” sites

ABSTRACT

In this work, we illustrate the ability of the prokaryotic potassium channel KcsA to assemble into a variety of supramolecular clusters of defined sizes containing the tetrameric KcsA as the repeating unit. Such clusters, particularly the larger ones, are markedly detergent-labile and thus, disassemble readily upon exposure to the detergents commonly used in protein purification or conventional electrophoresis analysis. This is a reversible process, as cluster re-assembly occurs upon detergent removal and without the need of added membrane lipids. Interestingly, the dimeric ensemble between two tetrameric KcsA molecules are quite resistant to detergent disassembly to individual KcsA tetramers and along with the latter, are likely the basic building blocks through which the larger clusters are organized.

As to the proteins domains involved in clustering, we have observed disassembly of KcsA clusters by SDS-like alkyl sulfates. As these amphiphiles bind to inter-subunit, “non-annular” sites on the protein, these observations suggest that such sites also mediate channel–channel interactions leading to cluster assembly.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There is increasing evidence to support the notion that ion channels and neuroreceptors in their native cellular environments are likely to assemble into supramolecular complexes or clusters in which their function becomes modulated through homomeric or heteromeric molecular interactions [1,2]. According to observations on membrane protein receptors [3], clustered assemblies in which the activity of one receptor influences that of its neighbors, convert conformational changes from a single origin into intermolecular allosteric behavior. Indeed, some of the best characterized cases in this regard show that cooperative, coupled channel gating depends upon clustering. For instance, ryanodine receptors, the Ca²⁺ release channels in sarcoplasmic reticulum in skeletal and cardiac muscle, form arrays showing coupled gating as an

important regulatory mechanism in excitation–contraction coupling [4,5]. Other instances where clustering and coupled gating affect channel function include inward rectifier Kir 4.1 potassium channels [6]; cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels [7], nicotinic acetylcholine receptors [8], IP3 receptor Ca²⁺ channel [9,10] and several members of the ATP-gated channel and the G-protein-coupled receptor families [11,12], including rhodopsin [13]. Moreover, cooperative gating of clustered sodium channels has been used to explain non-Hodgkin and Huxley behavior in the dynamics of action potential initiation in mammalian neurons [14]. Nonetheless, the details on the nature and the mechanisms involved in regulating the assembly/disassembly processes of these biologically-relevant complexes remain largely unknown.

KcsA is a prokaryotic potassium channel structurally simpler than its eukaryotic counterparts and it has been used extensively to explain ion selectivity and permeation in ion channels at the molecular level [15]. The crystal structure of KcsA shows a homotetramer in which each 160 amino acids subunit defines two transmembrane segments connected by a pore region that contains an ion selectivity filter unmistakably homologous to the more complex eukaryotic K⁺ channels [15]. Despite such apparent simplicity, it has been reported that the membrane-bound KcsA tetramer further assembles into still insufficiently defined clusters, both in vitro [16–18] and in vivo [19]. Such clusters form in a protein concentration-dependent manner [16] and seem responsible for the adoption of different modes of coupled gating, which causes large changes in channel function [16,17]. Indeed, KcsA clustering is likely behind the complex activity patterns detected in

Abbreviations: KcsA, potassium channel from *Streptomyces lividans*; DDM, dodecyl β-D-maltoside; SDS-PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate; PFO, perfluoro-octanoic acid; BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis; T species, individual KcsA tetrameric channels; nT species, supramolecular assemblies containing n number of clustered KcsA tetrameric channels

[☆] Partly supported by grants from the Spanish MICINN BFU2008-0062/BMC, BFU2009-08346, BFU2011-25920 and Consolider-Ingenio 2010 CSD2-2008-00005, and from the Generalitat Valenciana Prometeo 2010/046.

^{*} Corresponding authors. Tel.: +34 966658757; fax: +34 966658758.

E-mail addresses: ja.poveda@umh.es (J.A. Poveda), gonzalez.ros@umh.es (J.M. González-Ros).

¹ These authors contributed equally to this work.

many electrophysiological studies [20–26], which most often have not been analyzed in detail. The observed clustering of KcsA, along with the availability of its high resolution structure and the ease to express it at high yields, makes this protein a potentially good model to study these phenomena of protein clustering and coupled gating. However, evidencing KcsA clusters has so far required fairly sophisticated experimental techniques [16,19], which are not too amenable for use on a routine, quantitative monitoring of assembly/disassembly processes. Moreover, simpler techniques such as conventional SDS-PAGE of the expression products from the KcsA construct, renders KcsA as a major band corresponding to the well-known SDS-resistant tetramer of four identical subunits (Fig. 1A), but usually accompanied by just a minor band corresponding to dimers of such tetramers (labeled 2T in the figure) as the only evidence of supramolecular assembly [16,27–29]. These latter observations suggest that detergents such as those used in conventional electrophoresis analysis cause cluster disassembly and therefore prevent the observation of the native clusters.

Here we report on simple electrophoretic methods as alternative analytical procedures to evaluate rapidly the supramolecular assembly of KcsA tetramers into clusters. Indeed, instead of the well-known individual KcsA tetramers, clusters of different sizes are observed as major components of the KcsA batches. Such clusters appear to have KcsA tetramers and dimers of tetramers as the elemental building blocks through which the larger, cooperative clusters are assembled in a reversible process which does not need the presence of added lipids or a membrane environment.

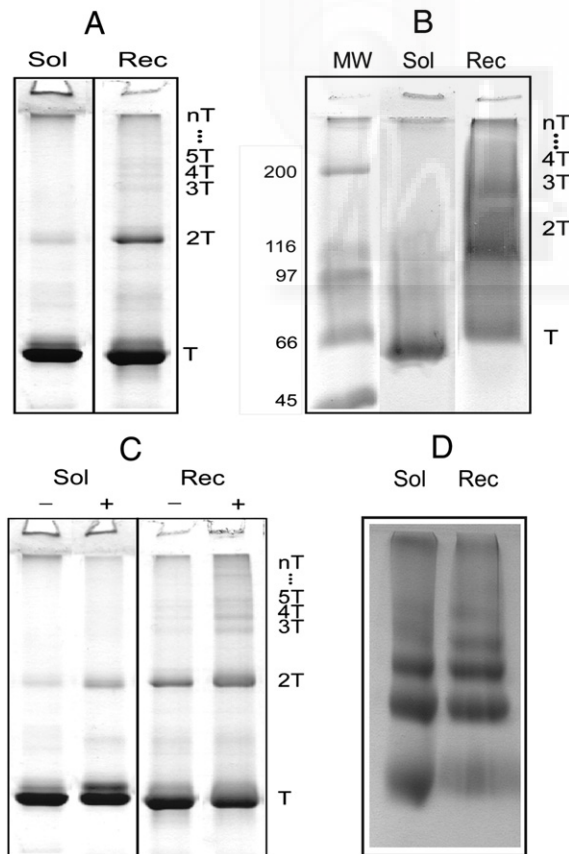


Fig. 1. Visualization of KcsA clusters by different electrophoretic methods. SDS-PAGE (A, C), PFO-PAGE (B), and BN-PAGE (D). “Sol” lanes correspond to purified KcsA solubilized in 5 mM DDM (and supplemented with 1 mM SDS in D), while “Rec” lanes correspond to KcsA reconstituted in asolectin vesicles. “Plus” sign lanes correspond to KcsA samples crosslinked with glutaraldehyde, while “minus” correspond to control samples without crosslinking. T stands for the KcsA tetramer, while 2T, 3T, 4T, 5T... nT refer to cluster species having 2, 3, 4, 5 ... n-times the molecular weight of the KcsA tetramer. MW stands for molecular weight standards.

2. Materials and methods

2.1. Expression, purification and reconstitution of KcsA

Expression and purification of wild-type KcsA were as described previously [16]. To reconstitute KcsA, batches of large unilamellar vesicles of asolectin (soybean lipids, type II-S, Sigma) were prepared at 25 mg/ml in 10 mM Hepes, pH 7, 100 mM KCl, and stored in liquid nitrogen, as described previously [30]. Then, asolectin was solubilized at a 0.8 DDM (Calbiochem)/lipid molar ratio and mixed with purified DDM-solubilized KcsA in 1 mM DDM at 500:1 lipid to protein molar ratio. The detergent was removed using Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad laboratories) at a mass ratio of 100:1 relative to the detergent in two rounds, one of 2 h at room temperature and a second one of 12 h at 4 °C, which resulted in the formation of proteoliposomes. Samples were stored in liquid nitrogen in 10 mM Hepes buffer, pH 7, 100 mM KCl.

Crude membrane extracts were obtained from *Escherichia coli* M15 (pRep4) cells harvested after 2 h of isopropyl β -D-thiogalactopyranoside induction, as described [27].

2.2. SDS-PAGE, PFO-PAGE and crosslinking

SDS-PAGE and PFO-PAGE analysis were carried out as reported [16,31]. For crosslinking “in vitro”, 15 μ g of purified KcsA, either as a solubilized protein or reconstituted into asolectin lipid vesicles at 1 mg protein/ml, was reacted with different concentrations of glutaraldehyde (ranging from 0.001 to 0.5%, w/v) for periods of time from 1 min to overnight and at room temperature [32]. The conditions chosen for routine experiments were 0.005% w/v glutaraldehyde and 1 h incubation at room temperature. For crude membrane extracts, cells were resuspended in 150 μ l PBS, pH 7.4, divided into four aliquots and reacted with glutaraldehyde at concentrations of 0.005 and 0.0125% (w/v), for 1 h at 4 °C. These conditions were similar to those used to crosslink E-cadherin–catenin complexes in epithelial cells [33]. After crosslinking, the cells were lysed by adding lysozyme (final concentration 0.4 mg/ml) for 5 min and by submitting them to six temperature cycles (each including 1 min in liquid nitrogen and 1 min at 42 °C), followed by vortexing. Cell lysates were centrifuged for 15 min at 13,000 \times g, the supernatant discarded and the pellet solubilized in 40 μ l of 10 mM Hepes buffer, pH 7, 100 mM KCl, containing 10 mM DDM, followed by several passages through a Hamilton syringe. The resulting homogenates were centrifuged for 15 min at 13,000 \times g and 5 μ l aliquots of the supernatants were mixed with 5 μ l of SDS sample buffer and used for SDS-PAGE. Western blot was done as reported [16], with the exception that the antibody solutions contained 3% (w/v) bovine serum albumin.

2.3. Blue native PAGE

Blue native PAGE (BN-PAGE) was performed in linear 4–16% (w/v) polyacrylamide–gradient gels as described [34,35]. Samples consisted of either reconstituted KcsA in asolectin lipid vesicles, or purified DDM-solubilized KcsA. When handling reconstituted samples, 30 μ g of protein was centrifuged at 18,500 \times g for 10 min. Once the supernatant was discarded, the pellet was resuspended with either DDM or SDS, and incubated at 4 °C O/N for its solubilization. After centrifugation at 18,500 \times g for 10 min., the supernatant containing the solubilized protein was collected and supplemented with a 5% Coomassie Brilliant blue G stock solution in 750 mM aminocaproic acid just before to be applied onto polyacrylamide gradient gels. For purified DDM-solubilized KcsA, 20 μ g of protein was directly supplemented with alkyl sulfates (when indicated) and Coomassie Brilliant blue G as above, and applied onto the gel. Electrophoresis was initiated at 85 V for 30 min, and continued at 200 V for 2.5 h at 4 °C. The protein bands in the gel were visualized by Coomassie blue staining. All gels were scanned and analyzed with ImageQuant TL v2005 software (Molecular Dynamics).

For crude membrane extracts, 200 µg of cell pellet was suspended in 2 ml of 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.45 mM sucrose, 8 mM EDTA supplemented with PMSF (0.3 mg/ml). Cells were lysed and processed as shown above for the crosslinking experiments except that the solubilization buffer was 80 µl of 50 mM Bis-Tris pH 7, 750 mM aminocaproic acid, 10% glycerol, 40 mM DDM, and that the solubilized supernatant was supplemented with a 5% Coomassie Brilliant blue G stock solution in 750 mM aminocaproic acid and SDS at 1 mM final concentration. Electrophoresis was carried out as explained above. Proteins were then electroblotted from the gel onto a PVDF membrane at 30 V overnight. Blots were treated with 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS for 1 h at 50 °C, dried and activated in methanol for 30 s to eliminate the Coomassie blue dye, which interferes in immunodetection. After washing in TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM NaCl, 0.05% Tween 20) blots were processed for Western blot by blocking in 3% (w/v) bovine serum albumin in TBST, then incubated with a mouse monoclonal anti-Tetra-His antibody (1:2000, Qiagen) and diluted in the blocking solution. After washing, the immunoblots were incubated with a secondary horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:10,000, Sigma). Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescent ECL select detection reagent (Amersham Biosciences) in a LIAS ChemLite 200F/400F (Avegene) imaging system.

2.4. 2D-PAGE

20 µg of purified DDM-solubilized KcsA was submitted to a BN-PAGE in the first dimension as detailed in Section 2.3. The corresponding gel strip containing the sample was excised and submitted to a SDS-PAGE in the second dimension. To do this, the strip was layered on top of a 13.5% polyacrylamide SDS-PAGE resolving gel and a 4% polyacrylamide stacking gel was polymerized all around the gel strip to fill the gap not covered by it. An identical gel strip from the BN-PAGE first dimension was stained and has been included on top of the Fig. 2 as a reference.

3. Results

3.1. Electrophoretic methods to detect KcsA clustering

Fairly sophisticated and time-consuming procedures, such as FRET between batches of fluorescently-labeled protein [16] or immunogold staining [19], have evidenced extensive KcsA clustering both “in vivo”

and “in vitro”. Nonetheless, following purification from detergent-solubilized extracts, KcsA appears mostly as the well known, SDS-resistant tetrameric protein in conventional SDS-PAGE (Fig. 1A). Moreover, the only indication of supramolecular assembly is a minor band corresponding to a dimer of such tetramers (labeled 2T in the figure), which appears in the gels instead of the expected larger clusters. A possible explanation to reconcile the above observations is that SDS and other detergents used to solubilize the samples disrupt the channel-channel interactions holding together the larger supramolecular assemblies, thus, causing the release of the individual KcsA tetrameric molecules. Fig. 1A also shows that the 2T band is more prominent when these experiments are carried out with samples of KcsA reconstituted into lipid membranes.

In an attempt to find simple alternatives to SDS-PAGE to assay KcsA samples without causing a major disruption of clusters, we first tested PFO-PAGE, very similar to SDS-PAGE but substituting SDS by a milder detergent such as PFO, which is quite effective in solubilizing membrane proteins while partly preserving the interactions within quaternary structures or supramolecular complexes [31,36]. Just as in SDS-PAGE, the electrophoretic mobilities of proteins in PFO-PAGE are linearly dependant on the logarithm of their molecular masses [31] although the bands in PFO-PAGE are not as sharp as in SDS-PAGE and frequently trail off. The tetrameric KcsA in PFO-PAGE (T species; migrating at an apparent molecular weight of 66 kDa) still appears as the major component in the DDM-solubilized samples. Conversely, the profile of samples from KcsA reconstituted into membranes shows more prominent heavier bands than the SDS-PAGE does, and in particular the 2T band appears now as the most abundant KcsA species seen in the gel (Fig. 1B). A previous study combining PFO-PAGE and purified KcsA solubilized in decyl-maltoside (instead of the dodecyl-maltoside used here) already showed a clear predominance of supramolecular species compared to the individual KcsA tetramers [37]. Such a supramolecular population, however, appeared as a single band larger than 300 kDa which could not be resolved into clusters of different sizes under the experimental conditions used in that report.

In order to obtain sharper bands while preserving the KcsA clusters, we have used glutaraldehyde crosslinking techniques in otherwise conventional SDS-PAGE. The rationale here is that disassembly by SDS of detergent-labile KcsA clusters into isolated tetramers could be prevented by crosslinking interacting tetramers within the

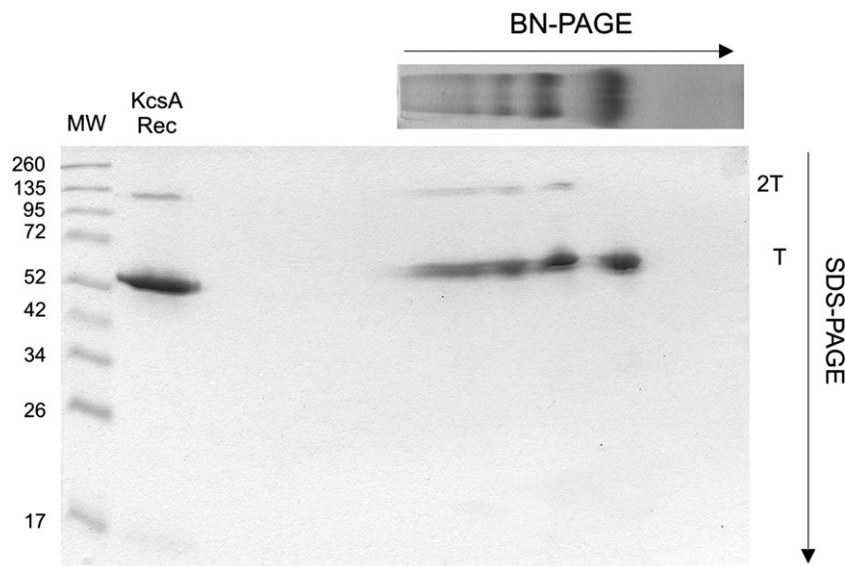


Fig. 2. Assignment of cluster bands in BN-PAGE gels by 2D-PAGE. Reconstituted KcsA in asolectin was solubilized with 40 mM DDM and subjected to a 2D-PAGE (see Methods) consisting first of a BN-PAGE, followed by SDS-PAGE in the second dimension. In the latter, commercial molecular weight standards (MW) and a sample of KcsA reconstituted in asolectin lipid vesicles (KcsA Rec) were run in separate wells as references (see text). Abbreviations and symbols are as in Fig. 1.

clusters prior to detergent treatment. This is similar to the approach used by Failer et al. [32], except that we use milder conditions (20-fold lower concentrations of glutaraldehyde) in order to prevent possible unspecific protein crosslinking. Fig. 1C illustrates that our mild glutaraldehyde treatment causes that molecular weight bands corresponding to integer values of the KcsA tetramer (labeled as 2T, 3T and so on, in the figure) appear more prominently upon crosslinking, as it would be expected from the occurrence of KcsA clusters prior to SDS treatment. Nonetheless, because of our mild cross-linking conditions, it is reasonable to assume that the crosslinked cluster bands seen in the gels result from detergent-induced disassembly of larger protein complexes insufficiently crosslinked under our experimental conditions and therefore, represents an underestimation of clustering. Again, cluster bands are more apparent when lipid-reconstituted samples, instead of detergent-solubilized ones, are used in the experiments. This suggests that KcsA clusters become partly disassembled in the DDM-solubilized purified samples, and therefore, cannot be crosslinked so efficiently.

As an additional tool to evaluate KcsA clustering we performed BN-PAGE, which has become a method of choice to define the oligomeric state of different proteins, and to study the organization of protein complexes in their native state [34,38–40]. Moreover, this technique has been used as an alternative to size exclusion chromatography (SEC) or dynamic light scattering (DLS) in evaluating protein aggregation states before crystallization [41]. In BN-PAGE, samples are first solubilized with a mild detergent, usually digitonin or DDM, but it is the negative charge from the Coomassie Brilliant Blue bound to the hydrophobic protein surfaces what determines the protein electrophoretic mobility. Fig. 1D shows that several bands can be clearly observed by BN-PAGE, which correspond to different KcsA supramolecular assemblies. Also, as observed with the other electrophoretic methods, when the protein is reconstituted into lipid vesicles (“Rec” line in the figure), the higher molecular weight bands in BN-PAGE are more intense than those from DDM-solubilized samples (“Sol” line). These results were highly reproducible when using different purified protein batches.

A known drawback of the BN-PAGE technique when dealing with membrane proteins is the difficulty to assign molecular weights to the gel bands [39], which are usually overestimated because membrane proteins bind lipids, detergents and Coomassie dye that contribute to an apparent weight larger than real [39,42]. Indeed, using a standard set of soluble proteins as molecular weight markers, the estimated molecular weight for the fastest migrating KcsA band was approximately 140 kDa, instead of the theoretical 70 kDa expected for the tetrameric KcsA (data not shown). This is confusing because one could erroneously assign such band to the 2T species mentioned above. Therefore, in order to identify correctly the KcsA oligomers states we performed a two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE), BN-PAGE in the first dimension and SDS-PAGE in the second one, since the latter allows unequivocal molecular weight assignments. Fig. 2 shows that in the BN-PAGE dimension there are several KcsA cluster bands that yield T and 2T species when submitted to the second SDS-PAGE dimension. The exception to this pattern is the fastest migrating band in BN-PAGE, which yields only T species in the SDS-PAGE dimension. In addition to confirming the efficiency of SDS on disassembling KcsA clusters, these observations bear on two important additional facts. First, they demonstrate that all the heavier bands in BN-PAGE result from the association of KcsA tetramers and dimers of tetramers (T and 2T species, respectively). Second, it is confirmed that the fastest migrating band in the BN-PAGE gels corresponds exclusively to T species (KcsA tetramers), as it is the only band which does not yield 2T species in the second dimension.

We also used samples from crude membrane extracts to test the presence of KcsA clusters in such native environment. In a first approach, intact *E. coli* cells expressing the KcsA construct were crosslinked with glutaraldehyde, lysed and a membrane fraction obtained by centrifugation. Such fraction was solubilized by DDM

and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Fig. 3A shows that, similarly to the observations on the purified protein (see Fig. 1C), electrophoretic bands heavier than the KcsA tetramer are observed in response to increasing the glutaraldehyde concentration, even under the mild cross-linking conditions used here. In a second approach, a crude membrane fraction was also obtained from *E. coli* cells and analyzed by BN-PAGE and immunoblotting. It can be seen that the band pattern of a control sample of purified KcsA is comparable to that of the crude membrane extract (Fig. 3B and C) except for the reduced mobility of bands in the latter, probably due to a larger amount of lipids bound to KcsA [39,42]. This result shows that the protein in a native environment is also assembled into similar clusters to those observed in the purified KcsA preparations. This is consistent with a recently published manuscript on clustering of membrane proteins in which very similar or identical transmembrane segments seem required for clustering to occur and therefore, “homoclusters” containing a single class of membrane proteins should be favored [43].

3.2. Use of detergents to study the assembly and disassembly of KcsA clusters

In order to explore how the individual channels are clustered, we have also used detergents to disassemble KcsA clusters in a progressive, concentration-dependant manner. This is a similar approach to that used for decades in unfolding proteins by denaturants or chaotropic agents from which so much folding information has been derived. In these experiments we determine the ability of either DDM or SDS, a milder and a harsher detergent, respectively, i) to solubilize KcsA samples for electrophoretic purposes and ii) to disrupt channel–channel interactions within the clusters. For these purposes, reconstituted KcsA samples were exposed to increasing detergent concentrations and the resulting band patterns analyzed by BN-PAGE. Fig. 4A shows that a minimum of 20 to 40 mM DDM is needed to solubilize properly the sample. The term *properly* used here means that if less detergent is used, the protein is mostly lost when the samples are pelleted before being applied to the gel, or remain at the interface of the separating gel upon completion of the electrophoresis run (Fig. 4A, first lane). On the other hand, a concentration of DDM above 150 mM is needed to start disassembling significantly the KcsA clusters. Then, bands corresponding to 3, 4 and 5T KcsA species begin to disappear from the gel, although

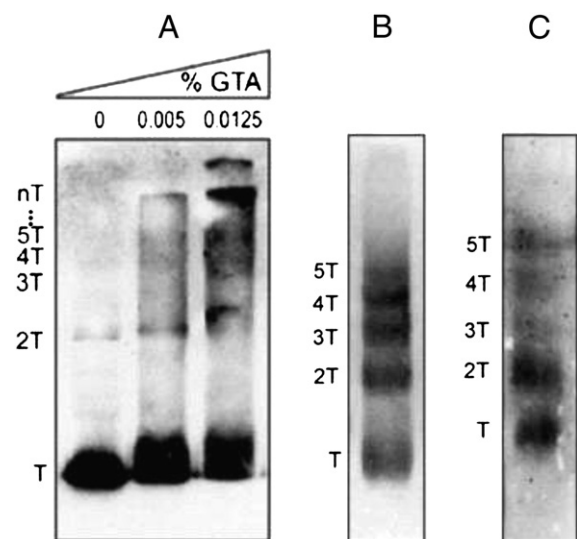


Fig. 3. KcsA clusters in crude membrane extracts from *Escherichia coli* cells. Immunoblot of a 7.5% SDS-PAGE with crude membrane extracts from crosslinked intact *E. coli* cells expressing KcsA (A). Immunoblot from a BN-PAGE with 5 µg of purified DDM-solubilized KcsA (B), and a crude membrane extract of *E. coli* cells expressing KcsA (C). Abbreviations and symbols are as in Fig. 1. GTA stands for glutaraldehyde.

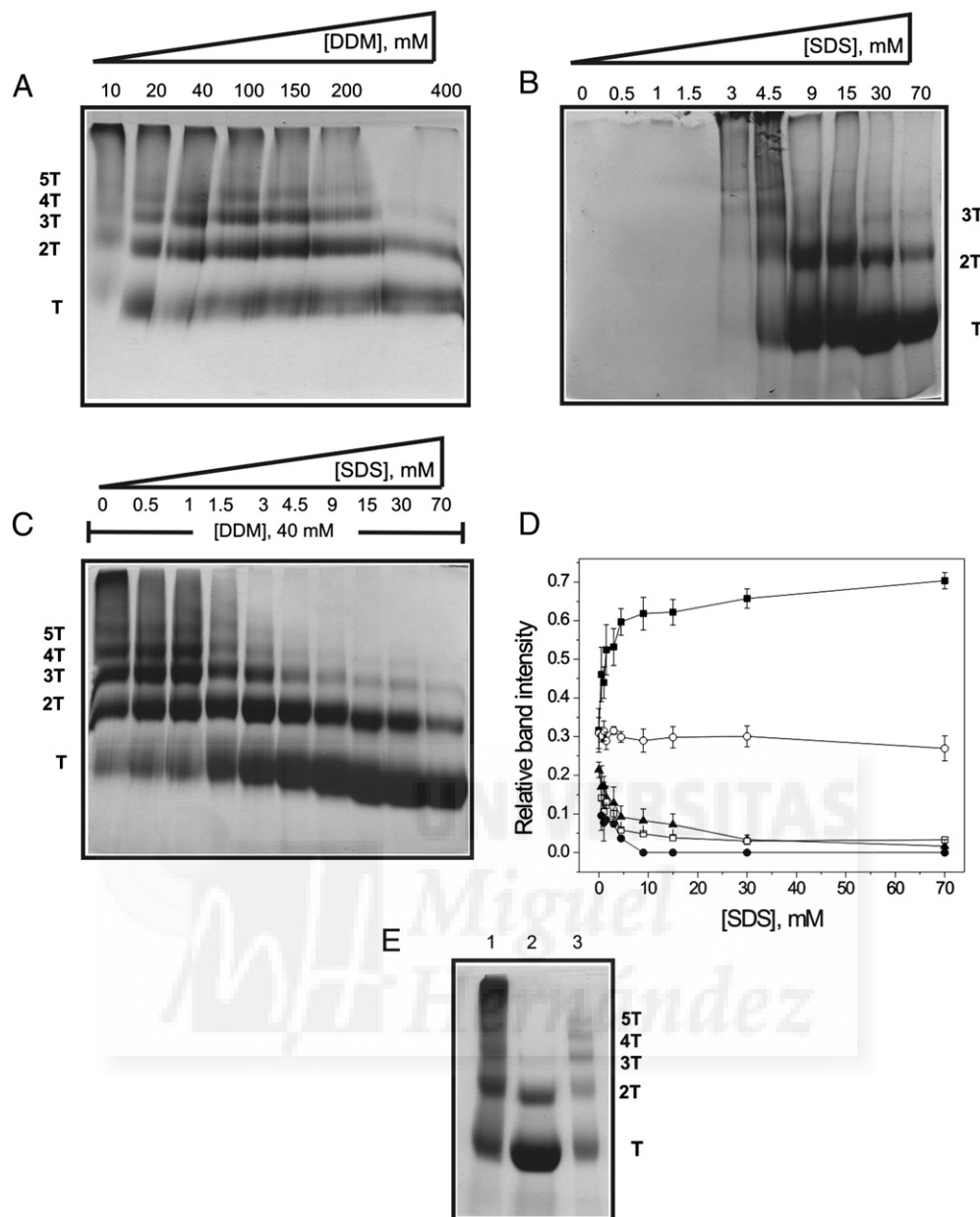


Fig. 4. Detergent-induced disassembly of KcsA clusters. Reconstituted KcsA in asolectin was incubated with different concentrations of DDM (A) or SDS (B and C) before being applied to a BN-PAGE. Samples were solubilized with 40 mM DDM before adding SDS (C). Panel D shows the analysis of BN-PAGE gel bands such as that from C. The results are expressed as the intensity of each band relative to the sum of all the bands present within each lane. Values represent the average \pm SEM of 5 different gels. Symbols indicate T (■), 2T (○), 3T (▲), 4T (□) and 5T (●) KcsA species. BN-PAGE was also used to test the reversibility of the assembly/disassembly process (panel E). For that purpose, purified KcsA solubilized in 20 mM Hepes, pH 7.0, 100 mM KCl, and 5 mM DDM (lane 1) was incubated with 70 mM SDS for 5 min (lane 2) and then dialyzed overnight against the same buffer but without SDS (lane 3).

the 3T band for instance, is still somewhat visible even at 400 mM DDM (Fig. 4A). These observations indicate a relative resistance to DDM of the channel–channel interactions in the KcsA clusters.

When SDS was used in these experiments instead of DDM, it was observed that concentrations of SDS lower than 3 mM do not suffice to properly solubilize the reconstituted samples. From 3 to 4.5 mM SDS, large KcsA clusters are detected, although the bands are not sharp enough and still some protein does not enter the gel. Finally, when SDS is at concentration above 9 mM the samples are satisfactorily solubilized, but most of the protein appears already disassembled in the form of T and 2T species, not too different from conventional SDS-PAGE, where SDS is used at around 70 mM (Fig. 4B).

In designing a more precise monitoring of detergent-induced disassembly of KcsA clusters we have combined the best features of the two

detergents from above. Thus, moderate concentrations of DDM (40 mM) was first used to properly solubilize the reconstituted membranes while leaving the clusters fairly unaffected, followed by addition of increasing concentrations of SDS to have a precise monitoring of cluster disassembly in the BN-PAGE. Fig. 4C shows that at the lowest SDS concentrations, a somewhat continuous trail of protein material is seen at the top of the gel, suggesting the existence of very large KcsA clusters under those conditions. Clusters corresponding to 2, 3, 4 and 5T species are also seen at those low SDS concentrations as defined bands in the gel. Monitoring the intensity of the individual bands as the SDS concentration is increased (Fig. 4D), shows an increase in the T band concomitant with a decrease in most other bands, following an apparent precursor-to-product relationship. It seems that the larger the clusters, the more detergent-labile they are; for instance, at around

4.5 mM of SDS, the trail of larger KcsA clusters and the 5T species have practically disappeared from the gel, while the 4T and 3T species, although diminished, remain quite noticeable. In contrast, the 2T species exhibits a different behavior which is worth mentioning. First, it is more abundant than the other clusters bands, in fact, quite similar to that of the T band when no SDS is present. Second, 2T species are much more resistant to SDS than any other cluster, as it remains fairly noticeable even at the highest SDS concentrations, when all other clusters have long disappeared. Third, the 2T species show a moderate but reproducible increase at low SDS concentrations, while all other clusters decrease. This unique feature suggests that when disassembled by the detergent, larger cluster species such as 3T, 4T or 5T give rise to 2T, in addition to T species. This interpretation is also supported by the two-dimensional gel in Fig. 3, where both T and 2T species are observed from the disassembly of the larger clusters when subjected to the second dimension, SDS-PAGE.

Extending the parallelism with the studies on unfolding/refolding of proteins by denaturants, we decided to evaluate the reversibility of the clustering process by exploring the possible re-assembly of detergent-disassembled KcsA clusters upon detergent removal. To do so, solubilized KcsA treated with 70 mM SDS, where the larger clusters have disassembled into T and 2T species, was dialyzed against a DDM buffer to eliminate SDS. This results in the re-assembly of KcsA into larger clusters of 3T, 4T, and 5T, indicating that the assembly/disassembly of clusters is indeed a reversible process (Fig. 4E).

3.3. Effect of alkyl sulfates of different chain length on KcsA clustering

As shown above, SDS is quite efficient in disassembling KcsA clusters. However, we previously reported on the ability of SDS to stabilize the tetrameric structure of the individual KcsA channel by binding to the so called “non-annular” sites [44], which correspond to crystallographically-characterized inter-subunit crevices within the protein quaternary structure [45]. In an attempt to evaluate in more detail the correlation between these two phenomena, we have studied the effects of SDS-like alkyl sulfates, ranging 8 to 14 carbon atoms chain length, on the cluster pattern of DDM-solubilized KcsA by BN-PAGE. Fig. 5 shows that the disassembly of clusters by the alkyl sulfates is strongly dependent on their chain lengths. Thus, increasing concentrations of octyl sulfate have little or no effects on KcsA clusters. On the contrary, clusters disassemble to a certain extent in presence of decyl sulfate at high concentrations, or much more effectively, in presence of the dodecyl or tetradecyl analogues, even at fairly low concentrations. These effects of the alkyl sulfates in destabilizing KcsA clusters, closely parallel those reported for these molecules in stabilizing the KcsA tetramers [44], suggesting that the occupancy of the inter-subunit “non-annular” sites by the alkyl sulfates interferes with channel–channel interactions involved in clustering.

4. Discussion

Simple electrophoretic assays that minimize the effects of detergents on protein cluster assembly including PFO-PAGE, crosslinking/SDS-PAGE and BN-PAGE have been used here to address clustering of KcsA channels, including the relative abundance of the various species detected, their stability against different detergents, or the reversibility of the process. Despite specific advantages or disadvantages for a given application, all these assays illustrate the ability of KcsA to assemble into a variety of defined, detergent-labile supramolecular complexes or clusters. Such clusters are readily detected either in solubilized preparations of purified KcsA, in reconstituted samples, and in intact cells, suggesting that they represent the native, membrane-bound KcsA species existing “in vivo”. The detection of clustering by these procedures is also in agreement with more complex and time-consuming studies, such as those based on FRET [16], AFM [18], or in situ immunogold staining

[19], as well as with functional measurements from patch-clamping reconstituted KcsA in giant liposomes [16], where single channel events represent just a fraction of the observed KcsA gating events, which are dominated by different modes of coupled gating resulting likely from channel clustering.

An interesting feature of KcsA clustering is the variety of the resulting supramolecular assemblies. Such assemblies appear always more abundant when analyzing KcsA reconstituted into membranes instead of detergent-solubilized samples, suggesting that a membrane milieu could favor a shift in the equilibrium towards the assembled KcsA species.

In addition to the T species, (i. e., the individual KcsA tetrameric channel), at least 2T, 3T, 4T and 5T species have been clearly detected. All these protein bands show reactivity in Western blots against anti-His antibodies, thus confirming them as expression products of the KcsA construction (Fig. 3B). Such diversity is reminiscent of that seen in the voltage-dependent anion channel from the mitochondria outer membrane (VDAC), which assembles into clusters containing anywhere from 1 to 20 individual molecules, seemingly related to a diversity of functional capabilities of this protein [46–48].

KcsA clusters are detergent-labile, as they disassemble mostly to the well-known KcsA tetramer depending upon detergent type and treatment. On the contrary, such tetramers are extremely resistant to detergents and other protein denaturants [45] and therefore, KcsA tetramers could be considered an “artificial” final product from all detergent-based treatments, including those used in the solubilization and purification of the protein bacterial lysates. That is the reason why purified KcsA in conventional SDS-PAGE (where SDS is present at approximately 70 mM or higher concentration) shows the SDS-resistant, T species as the major component ([16,27–29], and Fig. 1A). In fact, the detergent-lability of the KcsA clusters constitutes also a drawback in the electrophoretic techniques used here, as they all use a given detergent at a given concentration. In this respect, SDS has been found to be particularly disruptive of the channel–channel interactions supporting clustering, but DDM or even PFO are disruptive too, although to a lesser extent. Therefore, the estimated KcsA cluster sizes and the relative abundances reported here are likely to represent an underestimation of clustering because of partial detergent-induced disassembly. Detergent-lability, on the other hand, can also be used as a tool to explore how individual KcsA molecules are packed into clusters. The progressive disassembly by SDS under controlled conditions (Fig. 4C) shows that the larger clusters are more detergent-labile than the 2T species, which indeed could be considered detergent-resistant. This suggests that KcsA tetramers are packed differently into clusters depending on the number of KcsA units clustered and involves different channel–channel interactions with variable resistance to disruption by SDS. In addition to a detergent resistance higher than any other cluster, the 2T species is unique in that along with the T species, it seems a final product from the disassembly of larger clusters. Interestingly, the mixture of T and 2T species resulting from detergent disassembly can re-assemble back into the larger clusters upon detergent removal, thus, indicating the reversibility of the assembly/disassembly process even in the absence of lipids. The peculiarities of the 2T KcsA species are also reminiscent of the dimeric species of VDAC [49]. The high resolution structure of VDAC in a native-like bilayer environment shows a tightly packed dimer, which acts as a building block to form larger protein clusters. However, inter-dimer interactions in the VDAC clusters are weaker than intra-dimer ones and therefore, facilitate the dynamic assembly/disassembly of dimer units to and from those protein clusters. We believe that 2T species of KcsA, along with the individual T species, could play a similar role to that of VDAC dimers as building blocks of the larger KcsA clusters. Indeed, this would be in agreement with the “ladder-like” activity pattern observed by patch-clamp of reconstituted KcsA giant liposomes (see Fig. 7 in reference [16]). “Ladder-like” recordings are occasional observations (only 6 recordings from of a total of 93 patches exhibiting ion channel activity) in which the number of open channels within the patch increases during

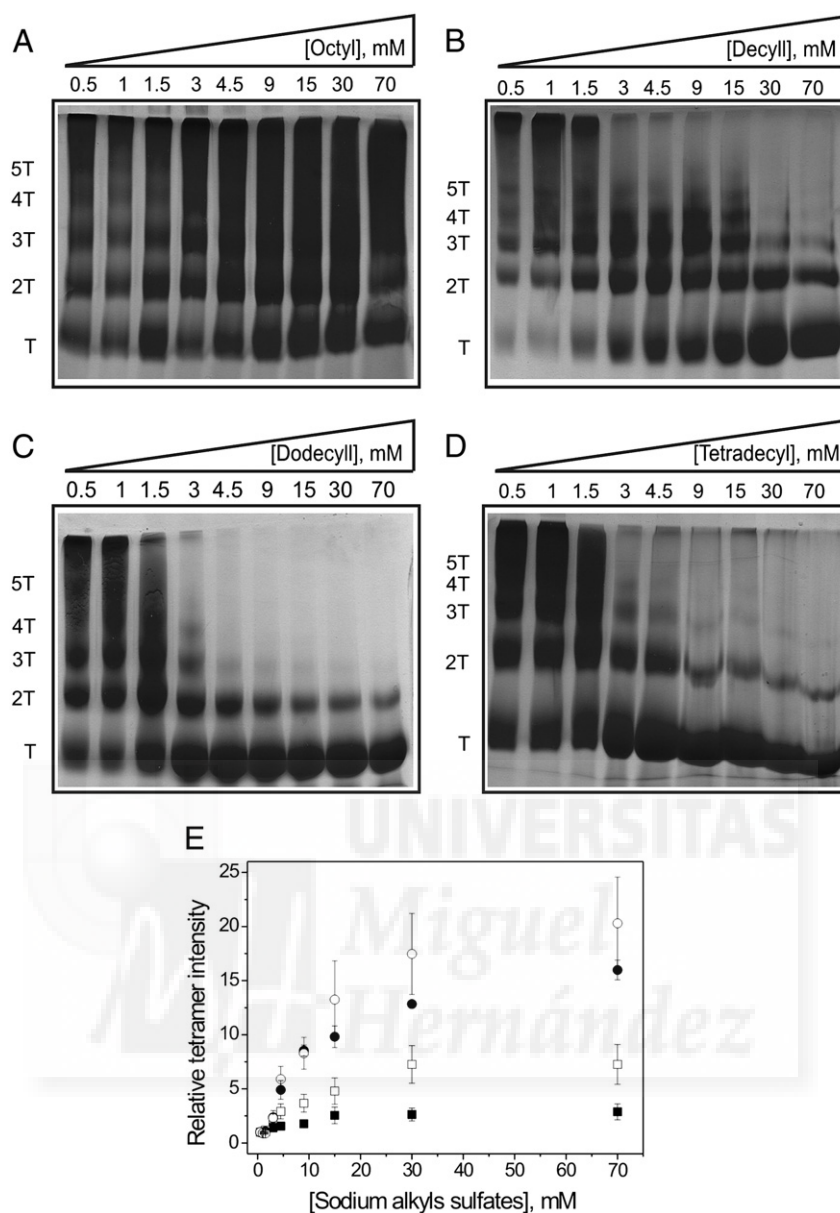


Fig. 5. Effect of different sodium alkyl sulfates on KcsA clusters. Purified DDM-solubilized KcsA was incubated with increasing concentrations of n-alkyl sulfates of different chain lengths before being applied to BN-PAGE (A, B, C and D). Panel E shows the analysis of the gel bands, expressed as the intensity of the tetramer relative to the sum of all the bands present within each lane. Values represent the average \pm SEM of 5 different gels. Symbols indicate sodium alkyl sulfates with a different chain length: octyl (■), decyl (□), dodecyl (●), and tetradecyl (○).

the time course of the recording in response to repetitive electrical stimulation, illustrating how a complex coupled-gated array of KcsA channels becomes assembled at the tip of the patch-pipette. Interestingly, the size of the current steps entering or leaving the “ladder-like” ensemble of channel activity reveals currents corresponding either to the unitary KcsA current level (T species) or to twice as much as such unitary currents (2T species), each in approximately 50% of the cases. This apparent correlation between cluster analysis and functional data from patch-clamp experiments, suggests that clustering is a reversible and dynamic process in which the establishment of channel–channel interactions causes profound changes in channel activity.

As to putative KcsA domains involved in clustering, we have studied the effects of SDS-like alkyl sulfates to gain information on this issue. We previously showed that these molecules bind to inter-subunit “non-annular” sites on the protein, stabilizing the tetrameric structure of individual KcsA molecules [44]. Hydrophobic interactions seem to

be critical, since acyl chain carbons from C9 to C14 are necessary for this process to occur [44]. Through BN-PAGE, we also find that acyl chain longer than eight carbons are necessary to destabilize KcsA clustering, showing a clear antagonism between i) the ability of SDS-like alkyl sulfates to bind these non-annular sites and stabilize the KcsA tetrameric structure and ii) their ability to destabilize protein clusters. We conclude from these studies that such sites mediate channel–channel interactions leading to cluster assembly and that binding of the amphiphilic ligands to such sites shifts the equilibrium to promote cluster disassembly.

5. Conclusions

The highlights of this study are i) the observation that cluster formation is reversible and can be induced in DDM without lipids being present, ii) the documentation that dimers of tetramers are more

stable than other clustered forms and iii) that destabilization of the tetramer dimers by alkylsulfates is correlated to stabilization of the tetramer itself, in line with effects resulting from non-annular binding of these alkylsulfates.

The finding that KcsA, one of the structurally simplest ion channels, already shows such a complex clustering behavior and its relation to functionally-relevant coupled gating reinforces the idea that supramolecular assemblies of ion channels and the interactions that hold them together may be more important than originally thought for the understanding of the biological processes they mediate. In such endeavor, KcsA might again be an excellent model to identify structural motifs responsible for clustering-mediating, channel-channel interactions or to establish the mechanisms by which such interactions lead to coupled gating of ion channels.

References

- [1] A.D. Douglas, R.D. Vale, Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells, *Cell* 121 (2005) 937–950.
- [2] B.F. Lillemeier, J.R. Pfeiffer, Z. Surviladze, B.S. Wilson, M.M. Davis, Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 18992–18997.
- [3] D. Bray, T. Duke, Conformational spread: the propagation of allosteric states in large multiprotein complexes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33 (2004) 53–73.
- [4] S.O. Marx, K. Ondrias, A.R. Marks, Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels ryanodine receptors, *Science* 281 (1998) 818–821.
- [5] C.C. Yin, L.M. Blayney, F.A. Lai, Physical coupling between ryanodine receptor-calcium release channels, *J. Mol. Biol.* 349 (2005) 538–546.
- [6] Y. Horio, H. Hibino, A. Inanobe, M. Yamada, M. Ishii, Y. Tada, E. Satoh, Y. Hata, Y. Takai, Y. Kurachi, Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by an anchoring protein, PSD-95/SAP90, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 12885–12888.
- [7] M.E. Krouse, J.J. Wine, Evidence that CFTR channels can regulate the open duration of other CFTR channels: cooperativity, *J. Membr. Biol.* 182 (2001) 223–232.
- [8] K.H. Huh, C. Fuhrer, Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses, *Mol. Neurobiol.* 25 (2002) 79–112.
- [9] Y. Tateishi, M. Hattori, T. Nakayama, M. Iwai, H. Bannai, T. Nakamura, T. Michikawa, T. Inoue, K. Mikoshiba, Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 6816–6822.
- [10] T.U. Rahman, A. Skupin, M. Falcke, C.W. Taylor, Clustering of IP3 receptors by IP3 returns their regulation by IP3 and Ca^{2+} , *Nature* 458 (2009) 655–659.
- [11] C.D. Rios, B.A. Jordan, I. Gomes, L.A. Devi, G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function, *Pharmacol. Ther.* 92 (2001) 71–87.
- [12] Y. Fujiwara, Y. Kubo, Density-dependent changes of the pore properties of the P2X2 receptor channel, *J. Physiol.* 558 (2004) 31–43.
- [13] S.E. Mansoor, K. Palczewski, D.L. Farrens, Rhodopsin self-associates in asolectin liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103 (2006) 3060–3065.
- [14] B. Naundorf, F. Wolf, M. Volgushev, Unique features of action potential initiation in cortical neurons, *Nature* 440 (2006) 1060–1063.
- [15] D.A. Doyle, J. Morais-Cabral, R.A. Pfueter, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, R. MacKinnon, The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity, *Science* 280 (1998) 69–77.
- [16] M.L. Molina, F.N. Barrera, A.M. Fernandez, J.A. Poveda, M.L. Renart, J.A. Encinar, G. Riquelme, J.M. Gonzalez-Ros, Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 18837–18848.
- [17] M. Raja, E. Vales, Effects of sodium chloride on membrane fusion and on the formation of aggregates of potassium channel KcsA in *Escherichia coli* membrane, *Biophys. Chem.* 142 (2009) 46–54.
- [18] H.M. Seeger, C.A. Bortolotti, A. Alessandrini, P. Facci, Phase-transition-induced protein redistribution in lipid bilayers, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 16654–16659.
- [19] J. Hegermann, J. Overbeck, H. Schrempf, In vivo monitoring of the potassium channel KcsA in *Streptomyces lividans* hyphae using immuno-electron microscopy and energy filtering, *Microbiology* 152 (2006) 2831–2841.
- [20] M. LeMasurier, L. Heginbotham, C. Miller, KcsA: it's a potassium channel, *J. Gen. Physiol.* 118 (2001) 303–314.
- [21] H. Choi, L. Heginbotham, Functional influence of the pore helix glutamate in the KcsA K^+ channel, *Biophys. J.* 86 (2004) 2137–2144.
- [22] H. Schrempf, O. Schmidt, R. Kümmerlen, S. Hinnah, D. Müller, M. Betzler, T. Steinkamp, R. Wagner, A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*, *EMBO J.* 14 (21) (1995 Nov 1) 5170–5178.
- [23] D. Meuser, H. Splitt, R. Wagner, H. Schrempf, Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*, *FEBS Lett.* 462 (1999) 447–452.
- [24] D. Meuser, H. Splitt, R. Wagner, H. Schrempf, Mutations stabilizing an open conformation within the external region of the permeation pathway of the potassium channel KcsA, *Eur. Biophys. J.* 30 (2001) 385–391.
- [25] L.G. Cuello, J.G. Romero, D.M. Cortes, E. Perozo, pH-Dependent gating in the *Streptomyces lividans* K^+ channel, *Biochemistry* 37 (1998) 3229–3236.
- [26] E. Zakharian, R.N. Reusch, *Streptomyces lividans* potassium channel KcsA is regulated by the potassium electrochemical gradient, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 429–436.
- [27] M.L. Molina, J.A. Encinar, F.N. Barrera, G. Fernandez-Ballester, G. Riquelme, J.M. Gonzalez-Ros, Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA, *Biochemistry* 43 (2004) 14924–14931.
- [28] L. Heginbotham, E. Odessey, C. Miller, Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K^+ channel, *Biochemistry* 36 (1997) 10335–10342.
- [29] D.M. Cortes, E. Perozo, Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K^+ channel [SKC1]: oligomeric stoichiometry and stability, *Biochemistry* 36 (1997) 10343–10352.
- [30] G. Riquelme, E. Lopez, L.M. Garcia-Segura, J.A. Ferragut, J.M. Gonzalez-Ros, Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels, *Biochemistry* 29 (1990) 11215–11222.
- [31] M. Ramieesingh, L.J. Huan, E. Garami, C.E. Bear, Novel method for evaluation of the oligomeric structure of membrane proteins, *Biochem. J.* 342 (1999) 119–123.
- [32] B.U. Failer, A. Aschrafi, G. Schmalzing, H. Zimmermann, Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase2 after heterologous expression in *Xenopus* oocytes, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1802–1809.
- [33] G. Ronzitti, G.P. Rossini, Yessotoxin induces the accumulation of altered E-cadherin dimers that are not part of adhesive structures in intact cells, *Toxicology* 244 (2008) 145–156.
- [34] H. Schägger, G. von Jagow, Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal. Biochem.* 199 (1991) 223–231.
- [35] H. Schägger, W.A. Cramer, G. von Jagow, Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis, *Anal. Biochem.* 217 (1994) 220–230.
- [36] C.H. Lin, C.C. Chang, S.F. Cheng, D.K. Chang, The application of perfluorooctanoate to investigate trimerization of the human immunodeficiency virus-1 gp41 ectodomain by electrophoresis, *Electrophoresis* 29 (2008) 3175–3182.
- [37] M. Raja, E. Vales, Dissimilarity in the channel intrinsic stability among the bacterial KcsA and the inwardly rectifying potassium channel ROMK1, *Biochimie* 91 (2009) 1426–1433.
- [38] A. Nicke, J. Rettinger, E. Mutschler, G. Schmalzing, Blue native PAGE as a useful method for the analysis of the assembly of distinct combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits, *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 19 (1999) 493–507.
- [39] E.H. Heuberger, L.M. Veenhoff, R.H. Duurkens, R.H. Friesen, B. Poolman, Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation, *J. Mol. Biol.* 317 (2002) 591–600.
- [40] K.R. Vinothkumar, S. Raunser, H. Jung, W. Kühlbrandt, Oligomeric structure of the carnitine transporter CaiT from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 4795–4801.
- [41] J. Ma, D. Xia, The use of blue native PAGE in the evaluation of membrane protein aggregation states for crystallization, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2008) 1150–1160.
- [42] I. Wittig, T. Beckhaus, Z. Wumaier, M. Karas, H. Schägger, Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis: principles and practical hints, *Mol. Cell. Proteomics* 9 (2010) 2149–2161.
- [43] F. Spira, N.S. Mueller, G. Beck, P. von Olshausen, J. Beig, R. Wedlich-Söldner, Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 640–648.
- [44] I. Triano, F.N. Barrera, M.L. Renart, M.L. Molina, G. Fernández-Ballester, J.A. Poveda, A.M. Fernández, J.A. Encinar, A.V. Ferrer-Montiel, D. Otzen, J.M. González-Ros, Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein, *Biochemistry* 49 (2010) 5397–5404.
- [45] F.I. Valiyaveetil, Y. Zhou, R. MacKinnon, Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K^+ channel, *Biochemistry* 41 (2002) 10771–10777.
- [46] R.P. Gonçalves, N. Buzhynskyy, V. Prima, J.N. Sturgis, S. Scheuring, Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes, *J. Mol. Biol.* 369 (2007) 413–418.
- [47] R.P. Gonçalves, N. Buzhynskyy, S. Scheuring, Mini review on the structure and supramolecular assembly of VDAC, *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (2008) 133–138.
- [48] R. Zalk, A. Israelson, E.S. Garty, H. Azoulay-Zohar, V. Shoshan-Barmatz, Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria, *Biochem. J.* 386 (2005) 73–83.
- [49] R. Ujwal, D. Cascio, V. Chaptal, P. Ping, J. Abramson, Crystal packing analysis of murine VDAC1 crystals in a lipid environment reveals novel insights on oligomerization and orientation, *Channels* 3 (2009) 167–170.

PUBLICACIÓN 4





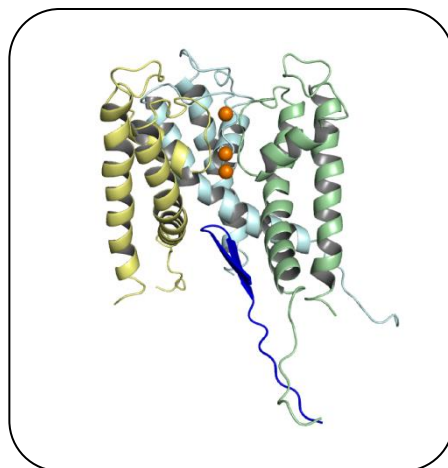
4.1 INACTIVACIÓN DE TIPO N DEL CANAL DE POTASIO *KcsA* POR EL PÉPTIDO “BOLA” DE SHAKER B:

MAPEO DEL EPÍTOPO DE UNIÓN DEL PÉPTIDO INACTIVANTE

Molina, M.L., Barrera, F.N., Encinar, J.A., Renart, M.L., Fernández, A.M., Poveda, J.A., Santoro, J., Bruix, M., Gavilanes, F., Fernández-Ballester, G., Neira, J.L, and González-Ros, J.M. (JBC, 2008)

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto del péptido inactivante del canal de potasio eucariota *Shaker B* (el péptido ShB) en el canal procarionota *KcsA* mediante métodos de patch-clamp. Los datos muestran que el péptido induce la inactivación rápida, de tipo N, en *KcsA* a través de un proceso que incluye el desacoplamiento funcional de los canales. También hemos empleado métodos de RMN, como el STD (del inglés “saturation transfer difference”), que permiten asignar las interacciones moleculares entre el péptido inactivante y su diana en el canal. Los resultados indican que la unión del péptido ShB a *KcsA* implica los protones orto y meta de la Tyr8, que exhiben los efectos más fuertes del STD; el HC4 en el anillo de imidazol de la His16; los protones metílicos de las Val4, Leu7, y Leu10, y los protones amino de la cadena lateral de uno, o los dos, residuos de Lys18 y Lys19. Cuando se utiliza el mutante no-inactivante SHB-L7E en los estudios, la unión a *KcsA* todavía se observa, pero implica diferentes aminoácidos. Así, los efectos más fuertes de STD se ven ahora en los protones metílicos de Val4 y Leu10, mientras que la His16 parece afectada de forma similar a anteriormente. Por el contrario, los efectos en Tyr8 están fuertemente reducidos, y los de Lys18 y/o Lys19 han desaparecido. Además, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de *KcsA* en presencia de derivados peptídicos ¹³C sugiere que el péptido SHB, pero no el mutante SHB-L7E, adopta una estructura de horquilla β cuando se une al canal *KcsA*. De hecho, el docking de una estructura en horquilla β en un modelo de canal de potasio abierto para simular el complejo inactivante péptido/canal predice interacciones de acuerdo con las observaciones experimentales.





N-type Inactivation of the Potassium Channel *KcsA* by the *Shaker B* “Ball” Peptide

MAPPING THE INACTIVATING PEPTIDE-BINDING EPITOPE*

Received for publication, December 12, 2007, and in revised form, April 7, 2008. Published, JBC Papers in Press, April 22, 2008, DOI 10.1074/jbc.M710132200

M. Luisa Molina^{†1,2}, Francisco N. Barrera^{†1,3}, José A. Encinar[†], M. Lourdes Renart^{†2}, Asia M. Fernández[†], José A. Poveda[†], Jorge Santoro[§], Marta Bruix[§], Francisco Gavilanes[¶], Gregorio Fernández-Ballester[†], José L. Neira^{¶||}, and José M. González-Ros^{†4}

From the [†]Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, 03202 Elche (Alicante), the [§]Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, 28006 Madrid, the [¶]Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, and the ^{||}Biocomputation and Complex Systems Physics Institute, 50009 Zaragoza, Spain

The effects of the inactivating peptide from the eukaryotic *Shaker B* K⁺ channel (the ShB peptide) on the prokaryotic *KcsA* channel have been studied using patch clamp methods. The data show that the peptide induces rapid, N-type inactivation in *KcsA* through a process that includes functional uncoupling of channel gating. We have also employed saturation transfer difference (STD) NMR methods to map the molecular interactions between the inactivating peptide and its channel target. The results indicate that binding of the ShB peptide to *KcsA* involves the ortho and meta protons of Tyr⁸, which exhibit the strongest STD effects; the C4H in the imidazole ring of His¹⁶; the methyl protons of Val⁴, Leu⁷, and Leu¹⁰ and the side chain amine protons of one, if not both, the Lys¹⁸ and Lys¹⁹ residues. When a noninactivating ShB-L7E mutant is used in the studies, binding to *KcsA* is still observed but involves different amino acids. Thus, the strongest STD effects are now seen on the methyl protons of Val⁴ and Leu¹⁰, whereas His¹⁶ seems similarly affected as before. Conversely, STD effects on Tyr⁸ are strongly diminished, and those on Lys¹⁸ and/or Lys¹⁹ are abolished. Additionally, Fourier transform infrared spectroscopy of *KcsA* in presence of ¹³C-labeled peptide derivatives suggests that the ShB peptide, but not the ShB-L7E mutant, adopts a β -hairpin structure when bound to the *KcsA* channel. Indeed, docking such a β -hairpin structure into an open pore model for K⁺ channels to simulate the inactivating peptide/channel complex predicts interactions well in agreement with the experimental observations.

Inactivation of ion channels limits the duration of channel openings and is essential in shaping and regulating cellular excitability. Early studies on N-type inactivation in voltage-dependent Na⁺ or K⁺ channels envisioned this process as a consequence of the occlusion of the channel mouth by a flexible cytoplasmic domain, located either at the N-terminal end of the channel protein or at an associated β subunit, which acts as an open channel blocker. This proposal, known as the “ball and chain” hypothesis of channel inactivation (1), received plenty of experimental support, and indeed, several “ball” peptides have been identified in different channels. In the *Shaker B* K⁺ channel, the inactivating ball peptide (the ShB peptide) corresponds to the first 20 amino acids of each of the subunits forming the tetrameric channel (MAAVAGLYGLGEDRQHRKKQ) (2, 3). Synthetic peptides derived from the ShB peptide sequence restore inactivation in deletion *Shaker B* channels lacking the inactivation peptide (4) and also inactivate a variety of other K⁺ channels (5–10). From such observations it was concluded that channel inactivation has a rather unconstrained basis in terms of primary structure and also that there must be two domains, complementary to those in the ball peptides, configuring the site for the inactivating peptide in the channel protein: (i) a hydrophobic pocket accessible only upon channel opening and separated from the cytoplasm by (ii) a region with a negative surface potential (3, 11). Such conclusions seem supported by the known crystal structures of K⁺ channels (12–15) in which the central cavity and inner pore are lined by hydrophobic amino acids, whereas the surrounding cytoplasmic domains contain acidic residues to favor electrostatic interaction with the positively charged C-terminal segment of most ball peptides. Nonetheless, no crystallographic data are yet available on a channel-ball peptide complex, and therefore, issues such as the identity of the peptide-binding site within the channel protein or the conformation adopted by the channel-bound inactivation peptide must await future studies. In the absence of such information, different electrophysiological studies (13, 16) suggest that the inactivating ball peptide snakes into the cytoplasmic channel mouth and stays there during inactivation in an almost linear, extended conformation. On the other hand, the conformational propensity of both the ball peptide of the K_v3.4 channel (17, 18) and the ShB peptide (19–22) has been studied spectroscopically in solution and in the presence of anionic

* This work was supported by Spanish Ministerio de Educación y Ciencia Grants CTQ2005-00360/BQU (to J. L. N.) and BFU2005-00749 (to J. M. G.-R.); FIPSE Experiment 36557/06 (to J. L. N.) and Grant BANCAJA-UMH IP/UR/01; and Consellería de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana Grant GV07/017 (to J. A. E.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat Valenciana.

³ Supported in part by predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain.

⁴ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Biología Molecular y Celular, Edificio Torregaitán, Universidad Miguel Hernández, 03202 Elche (Alicante), Spain. Tel.: 34-966658757; Fax: 34-966658758; E-mail: gonzalez.ros@umh.es.

phospholipid vesicles that, similar to the presumed inactivation site on the channel protein (3, 11), contain a hydrophobic domain (the acyl chains in the lipid bilayer), separated from the aqueous media by the negatively charged vesicle surface. These studies show that ball peptides are poorly structured in solution but adopt a β -structure when challenged by the channel-mimicking model target (19–21). Such β -structure has been identified as a β -hairpin that readily inserts into the hydrophobic domains provided by the lipid bilayer model target (20, 21, 23, 24).

Here we first demonstrate the occurrence of N-type inactivation mediated by the ShB peptide in KcsA, a prokaryotic potassium channel from *Streptomyces lividans* (25). Interestingly, KcsA inactivation is associated to functional uncoupling of channels that exhibited positively coupled gating prior to the addition of the ShB peptide (26). Also, saturation transfer difference (STD)⁵ NMR methods (27–29) have been used to identify interactions at atomic resolution in the KcsA–ShB complex. STD spectra are obtained after selective saturation of resonances of the KcsA protein, whereby the magnetization redistributes within the protein via intramolecular spin diffusion. Then, if a bound ligand is present, magnetization transfers from the protein to the ligand via ¹H–¹H dipolar contacts. An efficient intermolecular magnetization transfer from protons of the protein to the ligand requires very short distances, and therefore, ligand binding is strictly required for the transfer phenomenon. Our results demonstrate that indeed the wild-type ShB peptide binds to KcsA and also distinguish which amino acid residues are involved in binding. Finally, Fourier transform infrared spectroscopy using ¹³C-labeled ShB peptide supports the notion that the inactivating ShB peptide adopts a β -hairpin structure when channel-bound. Moreover, docking such a β -hairpin into the open channel conformation of KcsA modeled after MthK (14), a prokaryotic channel taken as a model for open K⁺ channels, predicts interactions that are well in agreement with those determined in the STD–NMR experiments.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Peptide Synthesis and Characterization—The wild-type ShB and the mutant ShB–L7E peptides were synthesized as C-terminal amidated peptides in an automatic multiple synthesizer (AMS 422, Abimed, Lanfengeld, Germany) by using a solid phase procedure and standard Fmoc chemistry (19). The peptides were also acetylated at their N termini. The peptides were purified by reverse phase HPLC to better than 95% purity, and their composition and molecular mass were confirmed by amino acid analysis and mass spectrometry (19). The residual trifluoroacetic acid used in peptide synthesis and HPLC purification was removed by repeated lyophilization–solubilization in 10 mM HCl. For the synthesis of the ¹³C-labeled ShB and ShB–L7E peptide analogs, L-alanine–N-Fmoc (1-¹³C, 99%) and L-leucine–N-Fmoc (1-¹³C, 99%) (from Cambridge Isotope Lab-

oratories, Inc.) were used, instead of the regular L-alanine and L-leucine reagents, under otherwise identical experimental procedures.

Protein Expression and Purification—Expression of the wild-type KcsA protein with an added N-terminal hexahistidine tag in *Escherichia coli* M15 (pRep4) cells and its purification by affinity chromatography on a Ni²⁺-nitrilotriacetic acid–agarose column was carried out as reported (30). The final buffer used with the purified protein was 20 mM Hepes, pH 7.0, containing 100 mM KCl and 1 mM DDM. 1–125 KcsA was prepared by chymotrypsin hydrolysis of wild-type KcsA and characterized by matrix-assisted laser desorption ionization tryptic-peptide mass fingerprinting (30).

Reconstitution of KcsA into Asolectin Lipid Vesicles—Large unilamellar vesicles of asolectin (soybean lipids, type II-S; Sigma) were prepared at 25 mg/ml in 10 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM KCl (reconstitution buffer) and stored in liquid N₂ (31). The purified, DDM-solubilized KcsA protein was mixed with the above asolectin vesicles previously resolubilized in 3 mM DDM at a lipid:protein subunit molar ratio of 500:1, for 2 h. Reconstituted liposomes were formed by removing the detergent by gel filtration on Sephadex G-50 (fine, 15–20-ml bed volume) previously swollen overnight in buffer without detergent. The detergent-solubilized lipid/protein mixture (2 ml) was loaded on top of the column, and the reconstituted liposomes were eluted in the void volume. The protein-containing reconstituted fractions were pooled and centrifuged for 30 min at 300,000 × g. The pellet was suspended into reconstitution buffer to a protein concentration of 1 mg/ml, divided into 50- μ g aliquots, and stored in liquid N₂ (30).

Electrophysiological Recordings in Reconstituted Giant Liposomes—Multilamellar giant liposomes (up to 50–100 μ m in diameter) were prepared by submitting a mixture of the reconstituted vesicles from above (usually containing 50 μ g of KcsA protein) and asolectin lipid vesicles (25 mg of total lipids) to a cycle of partial dehydration/rehydration (26, 30, 31). Standard inside-out patch clamp recordings (32) were carried out on excised patches from giant liposomes containing the wild-type KcsA, as reported previously (26). Recordings were obtained using either an Axopatch 200A (Axon Instruments) or an EPC-9 (Heka Electronic, Lambrecht/Pfalz, Germany) patch clamp amplifier, at a gain of 50 mV/pA. The holding potential was applied to the interior of the patch pipette, and the bath was maintained at virtual ground ($V = V_{\text{bath}} - V_{\text{pipette}}$). The recordings were filtered at 1 kHz, and the data were analyzed with the Clampfit-9 software (Axon Instruments). An Ag–AgCl wire was used as the reference electrode through an agar bridge. All of the measurements were made at room temperature. The pipette (extracellular) solution contained 10 mM Hepes buffer, pH 7, 100 mM KCl, and the bath (intracellular) solution contained 10 mM MES buffer, pH 4, 100 mM KCl.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy—One-dimensional ¹H NMR experiments were recorded at 283 K on a Avance Bruker DRX-500 using a z axis gradient by using BBO or TXI probeheads. Two-dimensional NMR spectra were recorded in the phase sensitive mode by using the States time proportional phase incrementation method (33). All of the experiments were carried out using the WATERGATE pulse sequence for water suppression

⁵ The abbreviations used are: STD, saturation transfer difference; DDM, dodecyl β -D-maltoside; NOE, nuclear Overhauser effect; Fmoc, N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl; HPLC, high pressure liquid chromatography; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid.

Binding of the Shaker B Ball Peptide to KcsA

(34). Two-dimensional ^1H - ^1H total correlation spectra were recorded by using a MLEV-17 spin-lock sequence (35) with a mixing time of 80 ms. NOE spectroscopy experiments were recorded with mixing times of 100 and 250 ms. Typically, spectra were acquired with 512 t_1 increments, 2048 data points, and a relaxation delay of 1 s. The spectral width was 6000 Hz in all cases. The spectra were processed using the BRUKER-XWIN-NMR software working on a PC work station. All of the spectra were zero-filled in the F_1 spectral dimension to 1024 data points, and a squared sine bell window function was applied in both dimensions prior to Fourier transformation. Sequential assignments of proton resonances of ShB and ShB-L7E peptides were based on characteristic sequential NOE connectivities between the H_α of a particular residue, and the amide proton of the next residue in the NOE spectra was referred to internal 3-(trimethylsilyl) propionic acid-2,2,3,3- $^2\text{H}_4$ -sodium salt.

In the STD experiments, 2 mg of freeze-dried peptide were dissolved in 500 μl of buffer (50 mM d_4 -acetic acid, 100 mM KCl, 10% D_2O), containing KcsA either reconstituted in asolectin vesicles or solubilized in 5 mM of the detergent DDM. Deuterated acetic acid and its sodium salt were purchased from Sigma. Peptide and KcsA final concentrations were 2 mM and 45 μM , respectively. The one-dimensional ^1H STD NMR (27–29) spectra of ShB or ShB-L7E peptides-KcsA complexes were recorded with usually 4000 scans. Selective saturation of protein resonances was set at -3 ppm (on resonance). Control experiments at this frequency showed that the entire protein (either in reconstituted lipid vesicles or solubilized in DDM micelles) can be saturated uniformly and then efficiently used for the STD NMR technique. In this region, the methyl resonances of the protein appear, and irradiation at protein methyl groups has previously been found to yield the most effective saturation (36); furthermore, this frequency is far away from the most up-field shifted methyl protons of the peptides (see Ref. 22 and our own observations), such that no perturbation of this signal can be induced by the selectively shaped pulse. Investigation of the time dependence of the saturation transfer with saturation times ranging from 0.2 to 2.5 s showed that 1.5 s were needed for efficient transfer saturation from the protein to the ligand protons. STD NMR spectra were acquired using a series of equally spaced 50-ms Gaussian-shaped pulses for selective saturation. The radio frequency field strength of the Gaussian-shaped pulses was ~ 100 Hz, with a 1-ms delay between the pulses. Residual water signal was eliminated by using excitation sculpting procedures (37). A spin-lock sequence was applied before the excitation sculpting sequence to remove the signals of KcsA (27, 38). The reference STD spectra were recorded with the off resonance set at 30 ppm. The saturated spectra were subtracted from the reference spectra via phase cycling. Experiments with ShB-L7E peptide were only carried out with KcsA reconstituted in asolectin vesicles.

To ensure that the observed signals arose from the STD effect, the following controls were carried out. STD-NMR experiments with the on and off resonance frequencies set either at -3 and 30 ppm, respectively, were acquired with samples containing the ShB peptide in the absence of KcsA, either in plain aqueous buffer or in the presence of DDM; the satura-

tion time was 2 s. No signals were present in the difference spectra, indicating that the effects observed in the presence of KcsA were due to true saturation transfer. In addition, we recorded control experiments in a sample of DDM micelles with on and off saturation frequencies set to identical values (either at -3 or 30 ppm). The difference spectra did not contain any signals, proving that good subtraction was achieved.

To allow for comparison among the different signals in the STD experiments, the signal intensities of the different protons were analyzed by the use of the fractional STD amplification factor, which expresses the signal intensity in the STD spectrum, $I_0 - I_{\text{sat}}$, as a fraction of an unsaturated reference spectrum, I_0 , and the excess of added ligand (28).

$$\text{STD amplification factor} = \frac{(I_0 - I_{\text{sat}})}{I_0} \times [\text{ligand excess}] \quad (\text{Eq. 1})$$

The errors in the STD amplification factor were estimated from the determination of the STD effects measured in two identical samples at 1.5 s and processed simultaneously. The differences obtained were lower than 10% for all the measured resonances.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy—Lyophilized aliquots of synthetic peptides, with or without the desired lipid vesicles, were processed in D_2O buffer as reported earlier (20). For the samples containing detergent-solubilized KcsA, both in the presence and in the absence of added ShB or ShB-L7E peptides, aliquots of KcsA in 10 mM Hepes buffer, pH 7.0, 100 mM KCl, and 1 mM DDM were processed as described earlier (39), except that 10 mM acetate buffer, pH 4.0, 100 mM KCl, 1 mM DDM was used for the washings. Routinely, amide I' bands in these experiments were 0.4 absorbance units or larger.

For spectral acquisition, the aliquots of 20 μl of each sample were placed between a pair of CaF_2 windows separated by a 50- μm -thick mylar spacers and mounted in a Harrick (Ossining, NY) demountable cell. Temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$) was maintained constant with a circulating water bath. The spectra were recorded on a Bruker IF66s instrument equipped with a DTGS detector, and the sample chamber was continuously purged with dry air. A minimum of 600 scans/spectra were taken, averaged, apodized with a Happ-Genzel function, and Fourier-transformed to give a nominal resolution of 2 cm^{-1} (40). Three spectra were recorded for each sample, and the buffer contribution was subtracted. Derivation was performed using a power of 3 and a breakpoint of 0.3. Self-deconvolution was performed using a Lorentzian bandwidth of 18 cm^{-1} and a resolution enhancement factor of 2.0 (39).

Modeling the ShB-KcsA Complex—The modeling of KcsA in the open conformation was done by homology, using the crystal structure at 3.3 Å resolution of the calcium-gated potassium channel MthK as a template (Protein Data Bank code 1LNQ). The multiple sequence alignment was made with CLUSTALW at the European Bioinformatics Institute site and manually supervised (final 24% identity and 40% similarity). The homology modeling was performed in the Swiss-Model Protein Modeling Server at the ExPASy Molecular Biology site. For model refinements, the orientation and optimization of the side chains was carried out in two steps. First, those residues making van

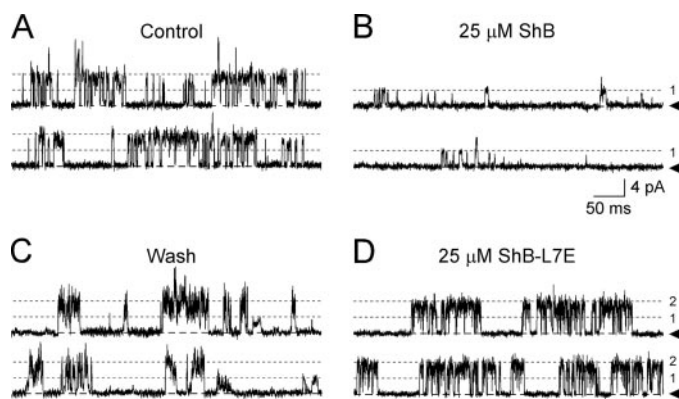


FIGURE 1. Inactivation of the KcsA channel by the ShB peptide. The two traces in each panel correspond to different recordings, both taken at +150 mV, for the same experimental condition. *A*, representative control recordings from excised giant liposome patches containing reconstituted KcsA channel displaying the typical activity seen in a low opening probability pattern (26). The channels in such low opening probability patterns of KcsA are closed most of the time and open in bursts of activity, such as shown in the figure. Notice that current levels corresponding mostly to the concerted (coupled) gating of two KcsA channels are observed in these control conditions (26). *B*, addition of the ShB peptide (25 μM) to the solution bathing the patch (cytoplasmic side of the channel) results in the uncoupling of channel gating and in channel inactivation in a peptide concentration-dependent manner. *C*, washing off the added ShB peptide results in the recovery of channel electrical activity and in the reappearance of coupled channel gating. *D*, addition of the noninactivating ShB-L7E peptide (25 μM) to the solution bathing the patch, under otherwise identical conditions to those used in *B*. The *discontinuous line* in all panels and the *arrowheads* indicate the zero current level, whereas the *dotted lines* are indicative of the current levels corresponding to one or two single channel openings.

der Waals' clashes were selected and fitted with "Quick and Dirty" algorithms; second, models were energy minimized (100 steps of steepest descent and 100 conjugate gradient, cut-off of 10 Å for nonbonded interactions) with Insight II (Biosym/MSI, Accelrys Software Inc.). Structure editions were made with Swiss Protein Data Bank viewer v3.7 (41).

The protein-protein docking interaction prediction was accomplished with GRAMM-X v.1.2.0 (42) using default conditions. The protein complex was tested in terms of energy with FoldX (43, 44) at the CRG site and evaluated with PROCHECK (45), showing 81.8% of residues in most favored regions and 17% in additional allowed regions of the Ramachandran plot. The molecular graphic representations were created with PyMOL.

RESULTS AND DISCUSSION

The Inactivating ShB Peptide Uncouples and Inactivates KcsA—The prokaryotic potassium channel KcsA behaves in many respects similarly to its structurally more complex eukaryotic counterparts (46), including the occurrence of slow, C-type inactivation (47). Perhaps for these reasons and also because of the promiscuity of the ShB ball peptide in inducing N-type, rapid inactivation in many different potassium channels (4–10), it has been assumed that the ShB peptide should also induce N-type inactivation in KcsA (13). Nonetheless, no experimental evidence on this matter has been reported to date. Here, we have used patch clamp techniques to study the effects of synthetic ShB peptide on KcsA reconstituted into asolectin giant liposomes. Fig. 1 illustrates the effects of the addition of the ShB peptide to the bath solution (cytoplasmic side of the

channel) in an excised, inside-out membrane patch exhibiting a low opening probability pattern, the most frequent functional pattern exhibited by the reconstituted KcsA channel (27). No effects on the ion currents were observed when the ShB peptide was added into the pipette solution (extracellular side of the channel).

Prior to the addition of the peptide (Fig. 1A), KcsA exhibits "single channel-like" currents of different sizes (mainly 8 pA, but also a few 12 pA events at +150 mV), which are integer multiples of the smaller, truly KcsA single-channel current of 4 pA, and result from the simultaneous (coupled) gating of two or three KcsA channels (see Ref. 27 for more details on the positive coupling of KcsA). Also, as in the original report on the inactivation of *Shaker B* $\Delta 6-46$ channel by the synthetic ShB peptide (4), inactivation of KcsA occurs in a peptide concentration-dependent manner and most noticeably at positive (depolarizing) voltages, where the peptide (Fig. 1B) causes only a few, uncoupled 4 pA currents to remain that eventually disappear as the peptide concentration is increased, leaving little or no activity in the recording. An apparently similar uncoupling of channel gating seemed also present in the original report on the effects of the ShB peptide on the *Shaker B* $\Delta 6-46$ channel (see Fig. 3 in Ref. 4), although it was not discussed by the authors. On the other hand and also similar to the report on the *Shaker B* channel, only minor effects of the inactivating peptide were observed at negative (up to -200 mV) voltages (not shown). Moreover, Fig. 1C shows that washing the ShB peptide off the membrane patch by replacing the bath solution with fresh peptide-free buffer results in the recovery of channel activity and in the reappearance of coupled gating. Finally, no significant effects on the currents are seen at any voltage when, instead of the wild-type ShB peptide, the noninactivating ShB-L7E peptide mutant is used in the experiments (Fig. 1D), which is also reminiscent of the original report on the inactivation of the *Shaker B* $\Delta 6-46$ channel by ShB peptide derivatives (4).

NMR Assignments and Peptide Structure—The above demonstration that the ShB peptide induces N-type inactivation of the KcsA channel, along with the fact that both the channel and the synthetic peptide can be prepared easily and in sufficiently large amounts, makes this an unique experimental system to learn on the molecular interactions behind the rapid inactivation phenomena through the application of spectroscopic techniques. Here, we have used STD-NMR methods in an attempt to explore such interactions between the inactivating peptide and KcsA as the ion channel target. To this end, we first assigned the resonances seen in the proton NMR spectra of the wild-type ShB peptide in aqueous solution at pH 5.0. Such acidic conditions (pH 4–5.5) have been reported as optimal for opening the KcsA channel (27, 46, 48–51), and indeed, the inactivation patch clamp experiments from above were conducted at pH 4 in the solution bathing the membrane patches. Proton assignment was carried out by using homonuclear standard two-dimensional total correlation spectroscopy and NOE spectroscopy experiments (52). Chemical shifts essentially agreed with those reported previously by Kalbitzer and co-workers at pH 7.2 (see Table 1 in Ref. 22), except for small changes in the side chains of the amino acid His¹⁶ and its neighboring residues, probably because of protonation of the imid-

Binding of the Shaker B Ball Peptide to KcsA

azole ring at the acidic pH used here. Under our experimental conditions and in apparent agreement with previous reports (22), the ShB peptide in aqueous solution adopts a mainly dis-

ordered conformation, as concluded from: (i) the absence of medium or long range NOEs (Fig. 2A); (ii) the small H_{α} conformational shifts that, with the exception of residues D13 to Gln¹⁵, are within the usually accepted limits for random coil conformations (Fig. 2B) (53, 54); and (iii) the absence of chemical shift dispersion in both the amide and the methyl group regions of the spectra (data not shown).

In the presence of KcsA reconstituted into asolectin vesicles, the spectrum of the ShB peptide experienced a significant line broadening with compared with that in solution, although the chemical shifts of the different protons were not modified (data not shown). We interpret such broadening as a clear indication of an interaction between ShB and KcsA, particularly because it occurs at a high ShB peptide to KcsA molar ratio (2 mM of peptide *versus* 45 μ M of KcsA), where the spectral features are dominated by signals arising mostly from the free form of the peptide. Interestingly, either in aqueous solution or in the presence of KcsA reconstituted into asolectin vesicles, the methyl protons of Val⁴ appeared at the same chemical shift (0.98 ppm), but those of Leu⁷ (0.85 and 0.91 ppm) and Leu¹⁰ (0.93 and 1.00 ppm) appeared at different chemical shifts, suggesting some preferred local orientations, as reported in other random coil ensembles (53, 54).

Proton assignments were also obtained for the noninactivating ShB-L7E mutant peptide both in aqueous solution and in the presence of KcsA reconstituted into lipid vesicles. In either condition, the ShB-L7E peptide showed similar chemical shifts to those exhibited by the wild-type ShB peptide, except for amino acids Gly⁶ and Tyr⁸, which are adjacent to the mutation site. Despite the similarities, two observations were made in the ShB-L7E peptide that differed from those made in the wild-type ShB. First, the line broadening of peptide signals observed in the presence of KcsA was not as large as that observed for the wild-type ShB (Fig. 3, A and B), suggesting a weaker binding of the ShB-L7E peptide to the KcsA channel. Second, the resonances of the methyl groups of Leu¹⁰ were degenerated in the ShB-L7E, suggesting that the preferred local conformation observed in the wild-type ShB peptide around these methyl groups is disrupted in the noninactivating mutant.

Probing Wild-type ShB Peptide-KcsA Channel Interactions in STD-NMR Experiments—Fig. 3 shows the amide region of a reference, nonsaturated ¹H NMR spectrum of a sample containing the wild-type ShB peptide and KcsA reconstituted into asolectin vesicles (Fig. 3A), along with STD-NMR spectra from the same sample, taken at different times of saturation (1 s, panel C and 2.5 s, panel E). Several resonances can be observed within the one-dimensional ¹H-STD NMR spectra, which (i) are sufficiently resolved from the rest of the peptide reso-

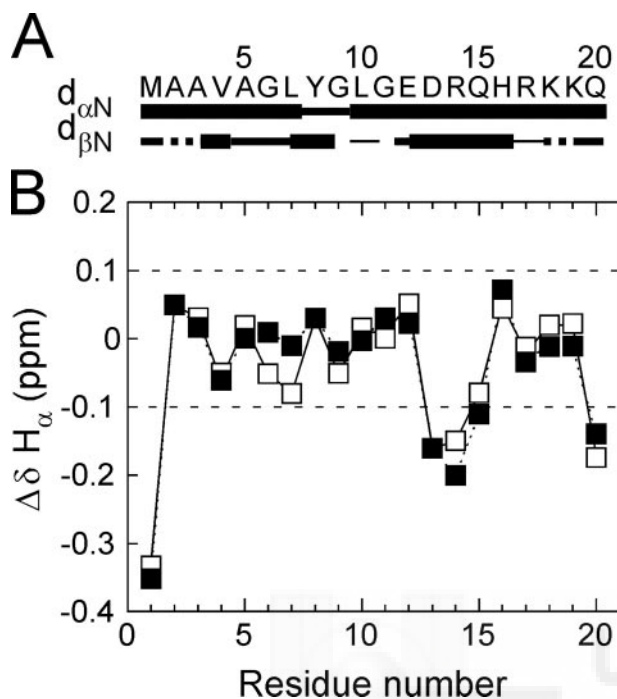


FIGURE 2. Summary of NMR data and conformational shifts for the ShB peptides. A, sequential NOEs between different atoms of successive residues ($d_{\alpha N} H_{\alpha}(i) - HN(i+1)$, and $d_{\beta N} H_{\beta}(i) - HN(i+1)$) for the wild-type ShB peptide. NOEs are classified into strong, medium, or weak, according to the thickness of the bar underneath the sequence, and their intensity was judged by visual inspection in the spectra. The dotted lines indicate ambiguous observed NOEs caused by spectral overlapping. B, conformational shifts of the H_{α} protons for the wild-type ShB (blank squares) and ShB-L7E (filled squares) peptides. The resonances of Lys¹⁸ and Lys¹⁹ could not be unambiguously assigned. The dashed lines indicate the usually accepted range of deviations from random coil conformational shifts.

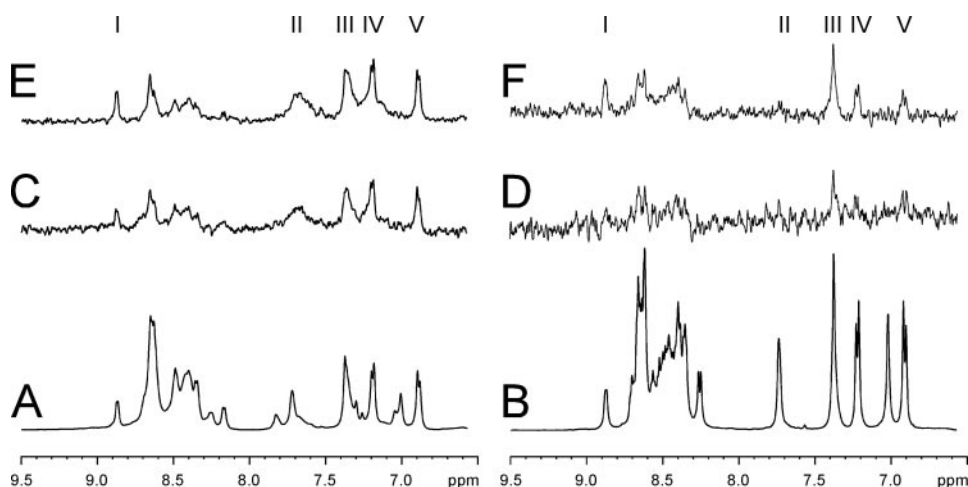


FIGURE 3. STD in the interaction of KcsA and the peptides ShB (left side) and ShB-L7E (right side). A and B show the reference spectra of ShB and ShB-L7E, respectively, in the presence of KcsA reconstituted into asolectin vesicles. C and D show the STD-NMR spectrum after a saturation of 1 s, whereas E and F show the STD-NMR spectrum at a saturation time of 2.5 s. In C–F, KcsA resonances were selectively saturated by irradiation at -3 ppm. The roman numerals indicate the proton resonances from the different amino acids showing strong STD effects: I, amide proton of Ala²; II, the side chain NH protons of Lys¹⁸ and/or Lys¹⁹ (7.70 ppm); III, the C4H of His¹⁶ (7.36 ppm); IV, the ortho protons of Tyr⁸ (7.20 ppm); V, meta proton of Tyr⁸ (6.88 ppm). The peptide concentration was 2 mM, whereas the concentration of KcsA reconstituted in asolectin vesicles was 45 μ M in 50 mM acetic/acetate, 100 mM KCl, pH 5.5.

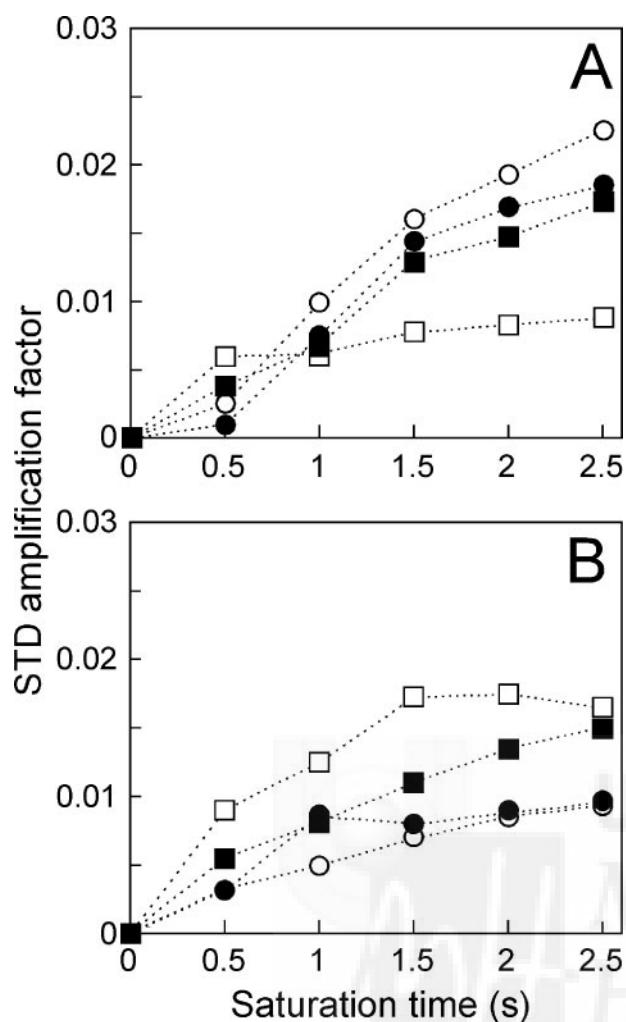


FIGURE 4. **STD amplification factors for ShB and ShB-L7E.** The STD amplification factors at different saturation times were calculated for the interaction of wild-type ShB (A) and ShB-L7E (B) to KcsA reconstituted into asolectin lipid vesicles. The different symbols correspond to the ortho (blank circles) and meta (filled circles) protons of Tyr⁸; the methyl protons of Val⁴, Leu⁷ (not present in ShB-L7E), and Leu¹⁰ (blank squares); and the C4H proton of the imidazole ring of His¹⁶ (filled squares). The errors at each experimental point were lower than 10%, as concluded from two different experimental series of STD measurements.

nances as to be accurately monitored and (ii) show changes in the intensity of the STD signals with the different times of saturation used in the experiments (Fig. 4A). In particular, the ortho (at 7.20 ppm) and meta (at 6.88 ppm) protons of Tyr⁸ are among the ShB peptide resonances showing the largest STD effects. This seems consistent with previous findings indicating that Tyr⁸ is a critical residue for the ShB peptide to retain its ability to inactivate channels, as well as to adopt a defined, β -hairpin conformation upon binding to anionic phospholipid vesicles, a model target mimicking some of the presumed features of the inactivating peptide-binding site on the channel protein (23, 55). Interestingly, a conservative Y8F mutation was shown to retain the ability of the wild-type peptide to inactivate potassium channels (16), thus lending support to our findings that the protons at the bulky aromatic ring of Tyr⁸ are important in the interaction of the peptide with the target channel during inactivation.

We also observed a strong STD effect on the C4H of the imidazole ring of His¹⁶ (at 7.36 ppm), as well as a much weaker STD effect on the amine protons of the side chains of Lys¹⁸ and/or Lys¹⁹ (at \sim 7.70 ppm and close to one of the protons of the side chains of Gln¹⁵ and Gln²⁰). Finally, the amide proton of Ala² (at 8.85 ppm) also shows STD effects, but they were smaller than any other described here and will not be further discussed. Moreover, the methyl protons of Val⁴, Leu⁷, and Leu¹⁰ also experienced significant STD effects (Fig. 4), although their magnitude was not as large as those observed for the aromatic protons of Tyr⁸. Taken together, the above results indicated that binding of the ShB peptide to KcsA reconstituted into lipid vesicles involved mainly the aromatic rings of both Tyr⁸ and His¹⁶ in the inactivating peptide.

When the experiments were performed using DDM-solubilized KcsA as the target for the ShB peptide, instead of the reconstituted KcsA vesicles, a similar line broadening of the ShB peptide signals was observed. Moreover, practically identical STD effects were seen in such samples, suggesting that KcsA in the detergent-solubilized form is as capable as the reconstituted KcsA in allowing binding of the ShB peptide. Unfortunately, however, the presence of signals in the aliphatic region arising from the detergent overlapped with some of the peptide signals, thus preventing an adequate integration. Therefore, we decided not to study any further the detergent-solubilized system.

STD-NMR Monitoring of the Interaction of the Noninactivating ShB-L7E Peptide with KcsA Reconstituted into Lipid Vesicles—As concluded from the above patch clamp experiments, the ShB-L7E peptide does not inactivate the KcsA channel, which also resembles the original observation by Aldrich and co-workers (4) on the *Shaker* B Δ 6–46 channel. Interestingly, despite such dramatic functional differences between the noninactivating ShB-L7E peptide and the wild-type ShB, both peptides are able to bind to the KcsA channel, as suggested by the line broadening observed in the NMR spectral bands (see above). However, the STD effects are quite different from those observed in the ShB peptide (Figs. 3 and 4). For instance, the STD effects on the aromatic protons of Tyr⁸ are clearly smaller in the mutant ShB-L7E peptide than in the wild-type ShB peptide. Conversely, STD effects on the methyl groups of Val⁴ and Leu¹⁰ are clearly more important in the mutant peptide than in its wild-type counterpart, despite the fact that in the latter, this contribution includes also that of Leu⁷, which is obviously lacking in the mutant L7E peptide (Fig. 4). Furthermore, the side chains of Lys¹⁸ and/or Lys¹⁹ displayed STD effects in the wild-type ShB peptide but do not give rise to any STDs in the ShB-L7E peptide, indicating that the side chains of these residues do not participate in the binding of the mutant peptide to KcsA. Therefore, the main conclusion from these experiments is that binding of the noninactivating ShB-L7E peptide to KcsA results in less important STD effects on the key residue Tyr⁸, as well as none at all on Lys¹⁸ and/or Lys¹⁹, being the interaction between the KcsA protein with the aliphatic Val⁴ and Leu¹⁰ methyl groups clearly more intense. Finally, the involvement of the aromatic moiety of His¹⁶ in the binding to the channel protein remains similar, within experimental error, for both peptides.

Binding of the Shaker B Ball Peptide to KcsA

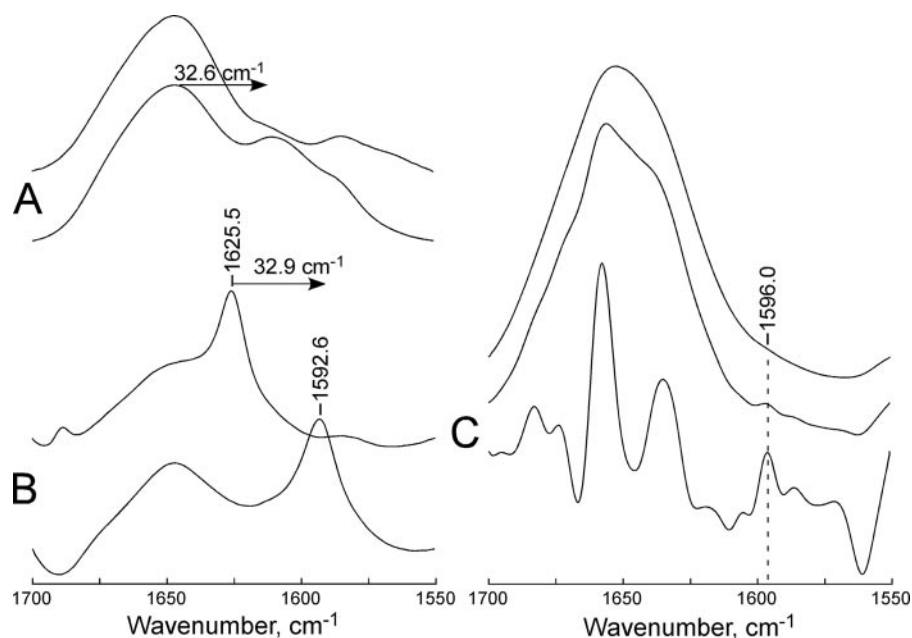


FIGURE 5. Infrared studies on the conformation of ShB bound to KcsA. A and B show the amide I' infrared spectral region of the ShB peptide in plain buffer (10 mM HEPES, pH 7, 100 mM NaCl) (A) as well as in the presence of dimyristoyl phosphatidic acid vesicles (B), under otherwise identical conditions. The lower traces in both panels correspond to the ^{13}C -labeled ShB peptide derivative, while the upper traces correspond to the non-labeled, wild-type ShB. C shows the infrared spectrum of a sample containing a mixture of ^{13}C -labeled ShB peptide and DDM-solubilized KcsA at a 1:1 molar ratio of peptide per KcsA subunit in acetate buffer, pH 4, 100 mM KCl, 5 mM DDM. The upper trace is the original spectrum, whereas the middle and lower traces represent the Fourier self-deconvolution and derivative of the spectrum, respectively.

Does the ShB Peptide Adopt a Defined Conformation when Bound to the KcsA Channel?—The above NMR measurements suggested that the inactivating ShB peptide and the noninactivating ShB-L7E peptide mutant associate in different manners to the KcsA channel protein. Hypothetically, such a different association could be due to the adoption of different conformations by the peptides once they become channel-bound. Thus, we thought of characterizing such putative peptide structures by means of NOE transfer measurements (56). Unfortunately, however, no such transfer NOEs could be obtained, even when employing different channel to peptide ratios (ranging from 45:1 to 15:1, in molar terms) and mixing times (ranging from 100 to 400 ms). Detection of transfer NOEs requires a fast exchange between free and bound forms of the peptide ligand (57), and therefore, it is conceivable that they could not be detected here, because of an unfavorable slow exchange of the ligand from the ShB-KcsA complex. This could perhaps be the case, because the dissociation constant estimated from fluorescence titrations of the binding of ShB peptide to the KcsA channel is of $\sim 4 \times 10^{-7}$ M.⁶ Whatever the reason might be, we turned out to conformation-sensitive Fourier transform infrared spectroscopy measurements as an alternative means to detect the possible adoption of a defined structure by the ShB peptide upon interaction with the KcsA channel. For technical simplicity, because the interaction of ShB with KcsA reconstituted into asolectin vesicles is similar to that seen in detergent solution (see above), the Fourier transform infrared spectroscopy measurements were carried out on detergent-solubilized

⁶ F. N. Barrera, unpublished observation.

channel/peptide mixtures. Also, the chymotryptic derivative 1–125 KcsA was used in these experiments instead of the wild-type channel, because it was found that cleavage of the cytoplasmic C terminus facilitated channel inactivation by the ShB peptide and allows the use of lower peptide concentrations.⁷ Finally, because the relevant infrared bands in both the peptide and the channel protein are fully overlapped, we performed these experiments using a heavy isotope-labeled ShB peptide, in which all the alanine (Ala², Ala³, and Ala⁵) and leucine (Leu⁷ and Leu¹⁰) residues were substituted by their ^{13}C analogs. Under such conditions, an isotopic shift to lower vibrational frequencies in the infrared bands of the heavy isotope-labeled peptide is expected, which should permit its monitoring separately from the spectral bands arising from the non-labeled channel protein or other sample components.

Fig. 5A shows that the amide I' band of the nonlabeled ShB peptide in aqueous solution, where the peptide is known to adopt a random conformation (see above) (20), is indeed dominated by a 1644 cm^{-1} spectral component, assigned to nonordered secondary structure. In the ^{13}C -labeled peptide, an additional shoulder at 1610 cm^{-1} was observed, thus allowing for the separate detection of $^{12}\text{C}=\text{O}$ and $^{13}\text{C}=\text{O}$ vibrations, which differed in $\sim 33\text{ cm}^{-1}$. Such extent in the isotopic shift was further confirmed by spectra of the ShB peptide taken in the presence of anionic lipid (dimyristoyl phosphatidic acid) vesicles (Fig. 5B), which is known to induce the adoption of a β -hairpin structure in the ShB peptide with a characteristic band at 1624 cm^{-1} (20). In the ^{13}C -labeled peptide, this spectral component was shifted to $\sim 1593\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 5B). Similar results were obtained with DMPG vesicles (data not shown). Interestingly, the spectra of the labeled ShB peptide in the presence of anionic lipid vesicles showed little or none of the nonlabeled β -hairpin band at 1624 cm^{-1} , suggesting that the amino acid residues substituted by their ^{13}C -labeled counterparts are precisely those contributing the most to the observed β -hairpin peptide structure.

Fig. 5C shows the results obtained when using the ^{13}C -labeled ShB peptide in presence of the KcsA channel. Despite the extent of the isotopic shift from above, the amide I' band arising from the detergent-solubilized KcsA is too large and still overlaps considerably with the spectral region where the amide I' band from the ^{13}C -labeled ShB peptide is expected to appear (Fig. 5, A and B). Nevertheless, despite overlapping, use of

⁷ M. L. Molina, unpublished observation.

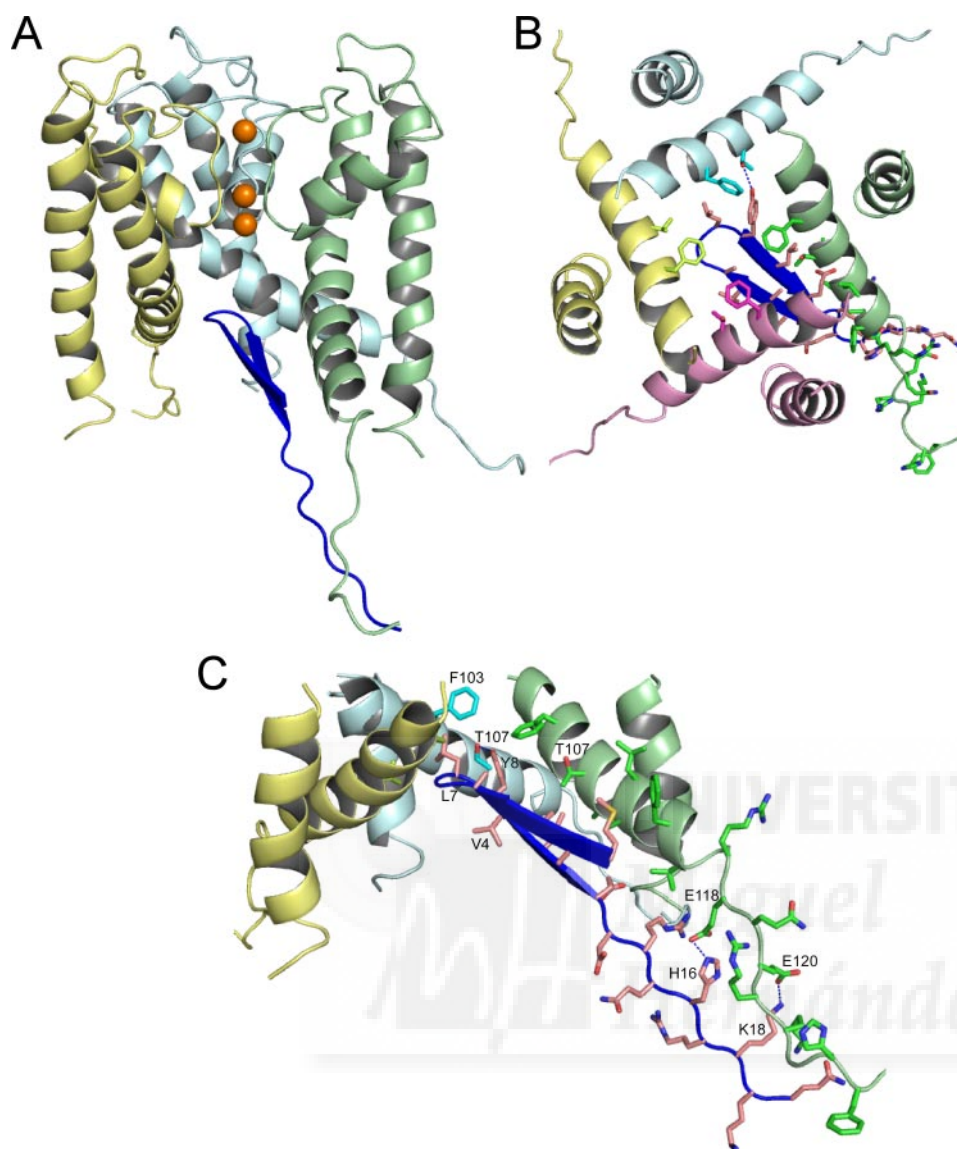


FIGURE 6. Structural model of the ShB peptide/KcsA channel complex as obtained by GRAMM (see “Experimental Procedures” for details). The ShB peptide has been modeled as a β -hairpin, as reported previously (21), whereas modeling of KcsA in the open conformation has been done by homology, using the crystal structure at 3.3 Å resolution of the calcium-gated potassium channel MthK as the template (14) (Protein Data Bank code 1LNQ). A shows a side view of the complex in which one of the KcsA subunits has been removed to facilitate the observation. The ShB peptide is drawn in dark blue, whereas three potassium ions inside the selectivity filter appear in brown. B is a top view zooming of part of the internal vestibule of the peptide/channel complex, as viewed down from the N-terminal end of the selectivity filter. The side chains of Phe103 and Thr¹⁰⁷ have been drawn to indicate that those two residues from the four KcsA subunits make up the site of interaction for most of the hairpin moiety of the ShB peptide. C is a side view zooming on the putative interactions between the C-terminal moiety of the ShB peptide and the initial part of the cytoplasmic, C-terminal domain of KcsA that follows the TM2 transmembrane fragment. Again, in this panel we have removed one of the KcsA subunits for clarity. Binding energy calculation on the model structure shown in the figure yields values of 7.75 Kcal/mol, corresponding to a dissociation constant of $\sim 2 \mu\text{M}$.

olution enhancement techniques, such as Fourier self-deconvolution or derivation, allowed the detection of a spectral component at $\sim 1596 \text{ cm}^{-1}$, *i.e.* at approximately the same wave number corresponding to the β -hairpin structure detected in the ^{13}C -labeled ShB peptide (Fig. 5B). The 1596 cm^{-1} component was not found in control experiments (i) where the ^{13}C -labeled peptide was dissolved either in detergent micelles or in the presence of asolectin vesicles without KcsA or (ii) when a ^{13}C -labeled ShB-L7E peptide was used in the experiments instead of the wild-type derivative (data not shown). Therefore,

the N-terminal half of the ShB peptide that, as indicated in the Introduction section, should have a complementary domain into the cytoplasmic channel mouth, into which it should be able to enter and bind when the channel is in the open state. Size seems not to be a problem, because the width of a β -hairpin would not exceed that of the cytoplasmic mouth of KcsA (14).

In an attempt to integrate the above experimental information, we carried out docking of the ShB peptide modeled as a β -hairpin, into an open channel conformation of KcsA modeled after the x-ray structure of MthK, the open K^+ channel

despite the difficulties arising from spectral overlap, we interpret such spectral component as truly derived from the acquisition of a β -hairpin or similar structure by a presumably small population of ^{13}C -labeled-ShB peptide bound to the KcsA channel during the course of the experiment. A potential candidate for such a structure could be the β -turn resulting from Asp¹³, Arg¹⁴, and Gln¹⁵, as suggested by the slight deviation from the accepted random coil conformational shifts. This, however, seems unlikely because the only ^{13}C -labeled residue near such putative turn is Leu¹⁰, which should not be able to produce the infrared component seen at 1596 cm^{-1} . A more likely possibility is that such structure corresponds to a β -turn similar to that causing the β -hairpin seen when the ShB peptide is confronted to anionic lipid vesicles, a much simpler experimental model system mimicking certain physicochemical features of the cytoplasmic channel mouth (21). This seems supported by the similarity observed in the wave number of the spectral components seen in the ^{13}C -ShB when bound to the KcsA channel (1596 cm^{-1}) and in the ^{13}C -ShB peptide in presence of anionic lipid vesicles (1593 cm^{-1}). Furthermore, the β -hairpin structures resulting from a β -turn either at VAGL (residues 4–7) or at AGLY (residues 5–8) (21) include hydrogen bonding of all the ^{13}C -labeled amino acid residues in ShB, namely, Ala², Ala³, Ala⁵, Leu⁷, and Leu¹⁰, thus making it possible to produce the observed 1596 cm^{-1} component in the infrared spectrum. In either case, the putative β -hairpins would define a mostly hydrophobic domain comprising

Binding of the Shaker B Ball Peptide to KcsA

model (Fig. 6). The amino acid residues indicated in the figure and their numbering correspond to the KcsA sequence after the homology alignment on the MthK sequence. Fig. 6A shows that the ShB hairpin predictably enters into the pore up to the hydrophobic pocket provided mainly by the Phe¹⁰³ and Thr¹⁰⁷ residues from all four KcsA subunits, ~8–9 Å below the N-terminal end of the selectivity filter. The docking model foresees interactions involving Val⁴, Leu⁷, Tyr⁸, and Leu¹⁰ in the ShB peptide and Phe¹⁰³ and Thr¹⁰⁷ in KcsA (Fig. 6B). Likewise, the model predicts that His¹⁶ and possibly Lys¹⁸ in the ShB peptide may be hydrogen-bonded to Glu¹¹⁸ and Glu¹²⁰, respectively, in the KcsA channel (Fig. 6C). Interestingly, the energy estimates for the modeled ShB peptide/KcsA channel complex yield binding affinities in the micromolar range, similar to that determined experimentally by patch clamp measurements. Moreover, a previous report based on a double mutant cycle analysis (13) using the α subunit of rat K_v1.4 channel, a mammalian homolog of *Shaker*, and the construct β 12 subunit as the inactivation gate, predicted that peptide binding to the channel should involve the residues equivalent to Ala³, Gly⁶, or Leu⁷ in the ShB peptide and Thr¹⁰⁷ or Ala¹¹¹ in the KcsA channel, which is in apparent agreement with our expectations from the docking model. Thus, the predictions from the docking model seem consistent with the experimental data and lend further support to both the identity of the amino acid residues conforming the ShB peptide-binding epitope and the adoption of the β -hairpin conformation when the inactivating peptide is channel-bound.

Conclusions and Final Remarks—Rapid inactivation of KcsA, a prokaryotic potassium channel, by a synthetic peptide (the ShB peptide) having the sequence of the inactivating ball peptide of the eukaryotic *Shaker* B K⁺ channel is reported. We found that channel inactivation is associated to functional uncoupling of positively coupled KcsA channels and exhibits similar features to those reported originally for the inactivation by the ShB peptide of *Shaker* and other K⁺ channels of eukaryotic origin. Such similarity emphasizes the conservation through evolution of important functional domains in these channels and further confirms KcsA as a *bona fide* model for studying potassium channels.

This report also introduces STD-NMR methods to study ion channel inactivation, drawing important information on molecular events that were largely unknown up to now. Thus, it is observed that regardless of whether the wild-type ShB peptide or the noninactivating ShB-L7E mutant peptide is used in the experiments, there is always peptide binding to the KcsA channel. However, clear differences in the binding of both peptides to KcsA were detected. For instance, Tyr⁸ in the ShB peptide displays a stronger interaction with KcsA than its homolog Tyr⁸ in the noninactivating ShB-L7E peptide. Furthermore, qualitative differences were observed for the side chains of Lys¹⁸ and/or Lys¹⁹, because the STDs observed for these residues in the ShB peptide were not observed in the ShB-L7E peptide. Finally, the STD effects obtained for the methyl groups of Val⁴ and Leu¹⁰ were clearly more intense in the mutant than in the wild-type peptide. These results indicate that the mutation at position 7 alters not only the binding of the peptide to the KcsA channel, but also the topology of the peptide atoms within

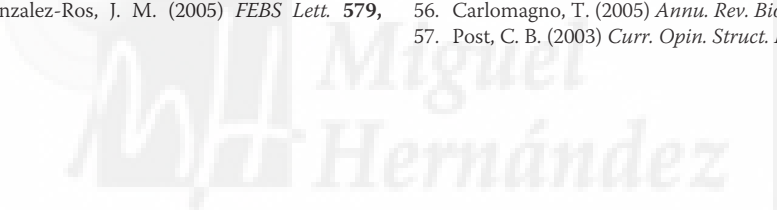
the KcsA binding site. Unfortunately, transfer NOEs could not be obtained, and therefore, the adoption of preferred conformations by either peptide when bound to the KcsA channel could not be assessed by means of NMR. On the contrary, Fourier transform infrared spectroscopy measurements using ¹³C-labeled peptides could be applied successively, and although not fully conclusive because of spectral overlap, they suggest that the ShB peptide, but not the noninactivating ShB-L7E mutant, adopts a β -hairpin structure when bound to the KcsA channel. Indeed, such conclusions seem supported by the observations derived from docking the ShB peptide as a β -hairpin into a KcsA open channel model, which predicts the occurrence or interactions very similar to those observed experimentally.

Acknowledgments—We thank Prof. Alain Milon (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS, Toulouse, France) for helpful comments on the possible uses of STD-NMR prior to the initiation of this work; Prof. Gloria Riquelme (Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) for continuous support and advice on the patch clamp studies; and Alicia Hurtado for involvement in spectral assignment. May García, María del Carmen Fuster, Javier Casanova, María T. Garzón, Helena López, and Eva Martínez provided excellent technical assistance throughout.

REFERENCES

1. Armstrong, C. M., and Bezanilla, F. (1977) *J. Gen. Physiol.* **70**, 567–590
2. Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1990) *Science* **250**, 533–538
3. Catterall, W. A. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 493–531
4. Zagotta, W. N., Hoshi, T., and Aldrich, R. W. (1990) *Science* **250**, 568–571
5. Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1991) *Nature* **353**, 86–90
6. Dubinsky, W. P., Mayorga-Wark, O., and Schultz, S. G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1770–1774
7. Riquelme, G., Fernandez, A. M., Encinar, J. A., Gonzalez-Ros, J. M., and Sepulveda, F. V. (1999) *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **438**, 879–882
8. Toro, L., Stefani, E., and Latorre, R. (1992) *Neuron* **9**, 237–245
9. Foster, C. D., Chung, S., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W., and Levitan, I. B. (1992) *Neuron* **9**, 229–236
10. Kramer, R. H., Goulding, E., and Siegelbaum, S. A. (1994) *Neuron* **12**, 655–662
11. Kukuljan, M., Labarca, P., and Latorre, R. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, C535–C556
12. Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetschner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69–77
13. Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., and MacKinnon, R. (2001) *Nature* **411**, 657–661
14. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) *Nature* **417**, 523–526
15. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007) *Nature* **450**, 376–382
16. Murrell-Lagnado, R. D., and Aldrich, R. W. (1993) *J. Gen. Physiol.* **102**, 949–975
17. Antz, C., Geyer, M., Fakler, B., Schott, M. K., Guy, H. R., Frank, R., Ruppersberg, J. P., and Kalbitzer, H. R. (1997) *Nature* **385**, 272–275
18. Abbott, G. W., Mercer, E. A., Miller, R. T., Ramesh, B., and Srari, S. K. (1998) *Biochemistry* **37**, 1640–1645
19. Fernandez-Ballester, G., Gavilanes, F., Albar, J. P., Criado, M., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1995) *Biophys. J.* **68**, 858–865
20. Encinar, J. A., Fernandez, A. M., Gavilanes, F., Albar, J. P., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1996) *Biophys. J.* **71**, 1313–1323
21. Encinar, J. A., Fernandez, A. M., Gil-Martin, E., Gavilanes, F., Albar, J. P., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1998) *Biochem. J.* **331**, 497–504
22. Schott, M. K., Antz, C., Frank, R., Ruppersberg, J. P., and Kalbitzer, H. R.

- (1998) *Eur. Biophys. J.* **27**, 99–104
23. Encinar, J. A., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Molina, M. L., Albar, J. P., Gavilanes, F., and Gonzalez-Ros, J. M. (2003) *Biochemistry* **42**, 8879–8884
 24. Hong, S. Y., Oh, J. E., and Lee, K. H. (1999) *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1775–1780
 25. Schrepf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) *EMBO J.* **14**, 5170–5178
 26. Molina, M. L., Barrera, F. N., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Renart, M. L., Encinar, J. A., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 18837–18848
 27. Mayer, M., and Meyer, B. (1999) *Angew. Int. Chem. Int. Ed.* **38**, 1784–1788
 28. Mayer, M., and Meyer, B. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6108–6117
 29. Klein, J., Meineke, R., Mayer, M., and Meyer, B. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5336–5337
 30. Molina, M. L., Encinar, J. A., Barrera, F. N., Fernandez-Ballester, G., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2004) *Biochemistry* **43**, 14924–14931
 31. Riquelme, G., Lopez, E., Garcia-Segura, L. M., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1990) *Biochemistry* **29**, 11215–11222
 32. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **391**, 85–100
 33. States, D. J., Haberkorn, R. A., and Ruben, D. J. (1982) *J. Magn. Reson.* **48**, 286–292
 34. Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992) *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665
 35. Bax, A., and Davis, D. G. (1985) *J. Magn. Reson.* **65**, 355–360
 36. Yan, J., Kline, A. D., Mo, H., Shapiro, M. J., and Zartler, E. R. (2003) *J. Magn. Reson.* **163**, 270–276
 37. Prost, E., Sizun, P., Piotto, M., and Nuzillard, J. M. (2002) *J. Magn. Reson.* **159**, 76–81
 38. Meyer, B., and Peters, T. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 864–890
 39. Encinar, J. A., Molina, M. L., Poveda, J. A., Barrera, F. N., Renart, M. L., Fernandez, A. M., and Gonzalez-Ros, J. M. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 5199–5204
 40. Fernandez-Ballester, G., Castresana, J., Arrondo, J. L., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1992) *Biochem. J.* **288**, 421–426
 41. Guex, N., and Peitsch, M. C. (1997) *Electrophoresis* **18**, 2714–2723
 42. Tovchigrechko, A., and Vakser, I. A. (2006) *Nucleic Acids Res.* **34**, 310–314
 43. Guerois, R., Nielsen, J. E., and Serrano, L. (2002) *J. Mol. Biol.* **320**, 369–387
 44. Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., and Serrano, L. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, 382–388
 45. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486
 46. LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) *J. Gen. Physiol.* **118**, 303–314
 47. Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Lewis, A., Vasquez, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1062–1069
 48. Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., and Schrepf, H. (1999) *FEBS Lett.* **462**, 447–452
 49. Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M., and Schrepf, H. (2000) *FEBS Lett.* **472**, 83–87
 50. Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) *J. Gen. Physiol.* **114**, 551–560
 51. Cuello, L. G., Romero, J. G., Cortes, D. M., and Perozo, E. (1998) *Biochemistry* **37**, 3229–3236
 52. Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York
 53. Neri, D., Billeter, M., Wider, G., and Wüthrich, K. (1992) *Science* **257**, 1559–1563
 54. Evans, P. A., Topping, K. D., Woolfson, D. N., and Dobson, C. M. (1991) *Proteins* **9**, 248–266
 55. Encinar, J. A., Fernandez, A. M., Molina, M. L., Molina, A., Poveda, J. A., Albar, J. P., Lopez-Barneo, J., Gavilanes, F., Ferrer-Montiel, A. V., and Gonzalez-Ros, J. M. (2002) *Biochemistry* **41**, 12263–12269
 56. Carlomagno, T. (2005) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 245–266
 57. Post, C. B. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 581–588



4.3 Trabajo adicional

Como consecuencia del análisis de la inactivación de KcsA por el péptido bola de *Shaker*, desarrollada en esta Publicación 4, se descubre un péptido activante de canales de potasio que podría ser la base para el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades que cursan con hiperexcitabilidad celular (pendiente de patente). Además se obtienen datos que inducen a proponer una hipótesis del mecanismo de inactivación rápida o de tipo N basada en un acoplamiento activación e inactivación similar al descrito en la inactivación de tipo C (manuscrito en preparación). Estos resultados no fueron incluidos en la publicación anterior para ser incluidos en una publicación y posible patente posterior y se resumen en el apartado de Avances Relevantes.





ANEXO





MANUSCRITO EN REVISIÓN





Dear Dr. Gonzalez-Ros:

We have received your manuscript entitled:

"Competing Lipid-Protein and Protein-Protein Interactions Determine Clustering and Gating Patterns in KcsA".

It has been given the number JBC/[2015/669598](#) and has been assigned to:

Dr. Stephenson
Associate Editor
Journal of Biological Chemistry
E-mail: echaulk@asbmb.org

Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all authors concur in the submission and that the final version of the manuscript has been seen and approved by all authors. Papers are published with the implicit understanding that you will pay all publication charges, as detailed here: www.jbc.org/site/misc/ifora.xhtml#PubCharges.

All authors may view the manuscript by logging into the Author Area of Bench>Press <http://submit.jbc.org>, the JBC's manuscript handling system. In order to log in, authors need an account in the system and the email address given for an author during the submission process must be associated with that account. Any author without a current Bench>Press account may create one by clicking "Create an account" at <http://submit.jbc.org>. Please note that the system might require up to 30 minutes to create a new account and provide access to the manuscript.

For corresponding authors who are members of ASBMB, member discounts apply to publication charges, including free color figures. To learn more about ASBMB membership, visit www.asbmb.org/membership.aspx.

The Journal of Biological Chemistry publishes papers based on original research that are judged to make a novel and important contribution to understanding the molecular and cellular basis of biological processes. A detailed description of JBC Editorial policies can be found on the Journal's website at <http://www.jbc.org/misc/edpolicy.xhtml>. Manuscripts that are judged to be inconsistent with JBC editorial policies may be declined without a full review, even if the experimental work is technically sound.

The Editor-in-Chief, or the Co-editor, initiates a confidential editorial evaluation process by sending submitted manuscripts to an Associate Editor. The Associate Editor sends it to reviewing editors with the appropriate scientific expertise from the Editorial Board, or to expert reviewers outside the Board. Reviewing editors may ask additional referees for advice on technical issues when needed. Reviewers provide assessments of originality, scientific importance and technical quality to the Associate Editor to use in deciding whether the manuscript should be accepted, reconsidered after revision, or declined. The Associate Editor forwards the critiques to the corresponding author with a letter that explains the decision.

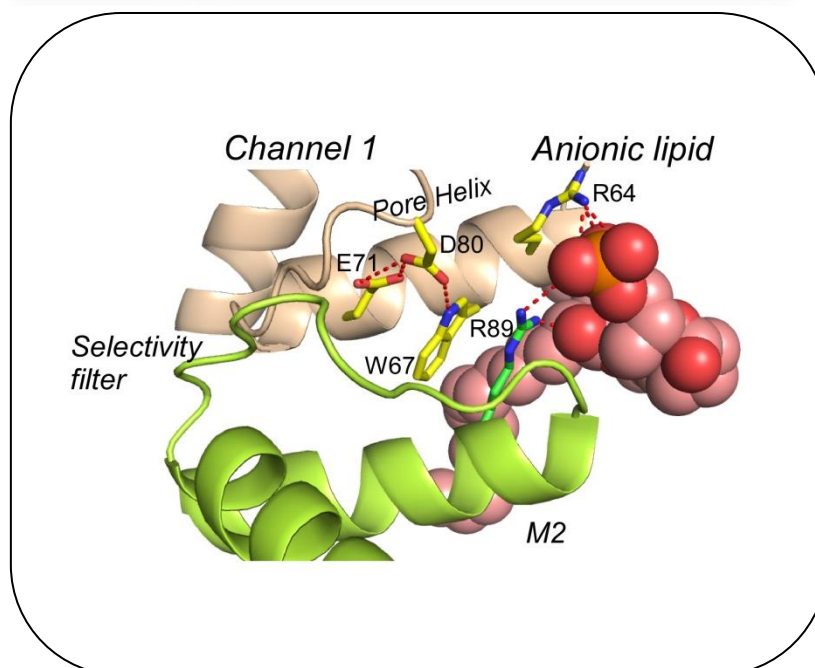


A.2 LA COMPETENCIA DE INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA Y PROTEÍNA-PROTEÍNA DETERMINAN LA AGRUPACIÓN Y LOS PATRONES DE ACTIVIDAD EN KcsA

M.L. Molina¹, A.M. Giudici¹, J.A. Poveda¹, G. Fernández-Ballester, E. Montoya, M.L. Renart, A.M. Fernández, J.A. Encinar, G. Riquelme, A. Morales², and J.M. González-Ros (Enviado a JBC)

RESUMEN

Cada vez hay más evidencias que apoyan la idea de que las proteínas de membrana, en lugar de ser componentes aislados que flotan en un ambiente de lípidos, podrían estar agrupadas en complejos macromoleculares que participan en una amplia variedad de funciones celulares cooperativas. Las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína son un factor determinante en el ensamblaje y la dinámica de este tipo de complejos de membrana. Aquí, nosotros informamos del papel de los fosfolípidos aniónicos en la agrupación de KcsA, un modelo de canal de potasio. La asociación/disociación de las agrupaciones se produce, al menos en parte, como consecuencia de la competencia de las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína en sitios no anulares de unión de lípidos en la superficie del canal y provoca grandes cambios en las propiedades de gating. Nuestros resultados sugieren que tales efectos de los lípidos aniónicos están mediados a través de la triada de inactivación W67-E71-D80 y su relación con el filtro de selectividad.





Competing Lipid-Protein and Protein-Protein Interactions Determine Clustering and Gating Patterns in KcsA

M. Luisa Molina^{‡1}, A. Marcela Giudici^{‡1}, José A. Poveda[‡], Gregorio Fernández-Ballester[‡], Estefanía Montoya[‡], M. Lourdes Renart[‡], Asia M. Fernández[‡], José A. Encinar[‡], Gloria Riquelme[§], Andrés Morales[#], and José M. González-Ros^{‡**}

[‡]From the Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain, the ^(§)ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago, Chile, and the ^(#)Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, 03080 Alicante, Spain.

*Running title: *Modulation of clustering and gating in KcsA*

Key Words: Membrane protein clusters; Supramolecular assembly of ion channels; Membrane protein “non-annular” sites; Coupled channel gating; Ion channel inactivation.

Background: Membrane proteins form supramolecular complexes that mediate cooperative cellular functions.

Results: Clustering of KcsA results from competing lipid-protein and protein-protein interactions at non-annular sites and changes its gating.

Conclusion: Clustering effects on gating occur *via* the W67-E71-D80 inactivation triad and its bearing on the selectivity filter.

Significance: These interactions are potential targets for designing ion channel modulators.

ABSTRACT

There is increasing evidence to support the notion that membrane proteins, instead of being isolated components floating in a fluid lipid environment, can be assembled into supramolecular complexes that take part in a variety of cooperative cellular functions. The interplay between lipid-protein and protein-protein interactions is expected to be a determinant factor in the assembly and dynamics of such membrane complexes. Here we report on a role of anionic phospholipids on determining the extent of clustering of KcsA, a model potassium channel. Assembly/disassembly of channel clusters occurs, at least partly, as a consequence of competing lipid-protein and protein-protein interactions at non-annular lipid binding sites on the channel surface and brings about profound changes in the gating properties of the channel. Our results suggest that these latter effects of anionic lipids are mediated *via* the W67-E71-D80 inactivation triad within the channel structure and its bearing on the selectivity filter.

INTRODUCTION

Since the elucidation of the X-ray structure of KcsA² (1-3) this potassium channel from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces lividans* (4) has become an experimental system of choice in many ion channel and membrane protein studies. From the functional view point, the characterization of the KcsA single channel properties has been surrounded by certain controversy. Schrempf's group, discoverers of KcsA, reported a dependence of channel opening on acidic pH, multiple conductance states with fairly high opening probabilities and unusual permeabilities to different cations besides K⁺ (4-6). In contrast, Miller's group (7,8) using KcsA reconstituted into planar lipid bilayers, found a single conductance state with a much lower opening probability, as well as orthodox ion selectivity to validate KcsA as a *bona fide* K⁺ channel model. Such discrepancies were never fully explained but still, it became accepted that KcsA behaves as a moderately voltage-dependent, K⁺-selective channel with low opening probability and the peculiar property of opening in response to intracellular acidic pH. Later on, however, different modes of KcsA activity have been reported, which differ greatly on their opening probability and channel kinetics (9). Moreover, it was found that KcsA may also open at neutral pH when subjected to certain experimental conditions (10). Also, it has been proposed that a more “physiological” version of KcsA might correspond to a supramolecular complex in which the channels would coassemble with polyhydroxybutyrate and inorganic polyphosphates (11), which are reservoir materials

in prokaryotes. In our hands, purified KcsA reconstituted into giant liposomes made from asolectin phospholipids, exhibits two major patterns of activity in patch-clamp recordings from excised, inside-out membrane patches: i) a Low Opening Probability (LOP) pattern, seen in approximately 55% of the recordings, in which channel openings are scarce and result primarily from single channel events or from coupled gating of a few channels, and ii) a High Opening Probability (HOP) pattern observed in the remaining 45% of the patches, in which the channels are opened most of the time and exhibit positive cooperativity through coupled gating of a larger number of channels (12). Because abundant channel clusters were also detected in the giant liposomes, it was speculated that the different functional patterns could arise from “non-clustered” or “clustered” KcsA channels and that the assembly of such supramolecular entities would somehow determine changes in the integrated behaviour of the channels involved. Interestingly, KcsA clusters have also been detected “*in vivo*” both, in *S. lividans* and in *E. coli*, suggesting that clusters may be the native form of KcsA in the bacterial membranes (13).

From the structural view point, KcsA is arranged as a homotetramer with subunits of 160 amino acids, each comprising N- and C-terminal cytoplasmic domains and two transmembrane alpha-helices, TM1 and TM2, connected by a short “pore” helix and a P-loop containing the characteristic TVGYG sequence of the selectivity filter in potassium channels. A further examination of the KcsA crystal structure reveals that it contains non-covalently bound lipid (2,14), identified as phosphatidylglycerol (PG) (15). Tight binding prevents these lipids from dissociating appreciably from the protein by treatments such as detergent solubilization and indeed, they co-crystallize with the protein and can be seen in the X-ray structure. The crystallographic evidence and other studies (16) conclude that the PG binding sites in KcsA have the features of the so called “non-annular” sites (17), which usually correspond to clefts or grooves between transmembrane helices or at protein-protein interfaces (18,19). In particular, non-annular sites in KcsA include a deep cleft on the protein surface, between the pore helix and TM2 of adjacent subunits, which bind “*in vitro*” other anionic phospholipids, besides PG, in a rather unspecific manner (16,20,21) and their occupancy seems important for a number of KcsA features. These include its folding,

tetramerization, structural stability and channel function and therefore, makes it extremely interesting to study the interactions involved (22-24), which might even be potentially useful targets for the design of ion channel modulators.

Here we report on a role of anionic phospholipids on determining the extent of KcsA clustering, which seemingly occurs as a consequence of competing lipid-protein and protein-protein interactions at the non-annular sites of the channel and brings about changes in the gating properties. In regard to the latter, our results suggest that such changes are mediated *via* the W67-E71-D80 inactivation triad within the channel structure and its bearing on the selectivity filter.

MATERIALS AND METHODS

Cholesterol and asolectin (L- α -Phosphatidylcholine from soybean type 2-S) were purchased from Sigma. DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DOPG, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)]; PA, L- α -phosphatidic acid (egg chicken); PC, L- α -phosphatidylcholine (egg, Chicken); PE, L- α -phosphatidylethanolamine (egg, Chicken) and PG, L- α -phosphatidylglycerol (egg, chicken) were purchased from Avanti Polar Lipids. Alexa Fluor®647 C2-maleimide was from Molecular Probes. DDM was from Calbiochem.

Cloning and mutagenesis of KcsA

The pT7-837KcsA containing the R64A-KcsA gene mutant was kindly donated by Professor A. Killian (Utrecht University, Holland). The R89A-KcsA mutant was obtained through site-directed mutagenesis, using the wild-type gene inserted into the pQE30 (Qiagen) plasmid as a template. The S22C-KcsA mutant was prepared as described previously (12). All mutations were confirmed by dideoxynucleotide sequencing.

Overexpression and purification of KcsA

Expression of the wild-type KcsA protein, S22C and R89A mutants were performed in *Escherichia coli* M15 (pRep4) cells, whereas R64A mutant was expressed in *E. coli* strain BL21(λ DE3). Purification and determination of protein concentrations were performed as described (25). Yields ranging 1-2 mg of purified, DDM-solubilized, tetrameric KcsA per liter of culture were obtained. The purified protein batches were also analyzed by SDS-PAGE (25).

Blue native PAGE

Blue native PAGE (BN-PAGE) was performed in linear 4%-16% (w/v) polyacrylamide-gradient gels (26-28). Shortly before starting BN-PAGE, DDM-solubilized KcsA was incubated in the absence or in the presence of increasing concentrations of the corresponding phospholipids as mixed micelles containing 5 mM DDM. Just before their application onto the gel, sample aliquots containing 10 μ g of DDM-solubilized protein were mixed with 5% Coomassie Brilliant blue G stock solution in 750 mM aminocaproic acid and 1mM SDS to a final 4:1 (by weight) DDM to Coomassie ratio. Electrophoresis was initiated at 85 V for 30 min, then continued at 200 V for 2.5 h, at 4 °C. After electrophoresis, the gels were stained overnight with colloidal Coomassie Blue G 250 (CCB) (29). All gels were scanned and analyzed with ImageQuant TL v2005 software (Molecular Dynamics).

Reconstitution of KcsA

Large unilamellar vesicles were prepared either from i) asolectin, ii) PC:PG:Chol mixtures (both, at 50:25:25 and 70:5:25 molar ratios) or iii) PC:PA:Chol mixtures (both, at 50:25:25 and 70:5:25 molar ratios), at 25 mg/ml in 10 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM KCl (reconstitution buffer) and stored in liquid N₂ (30). DDM-solubilized wild-type KcsA or mutant proteins were incubated during 30 minutes with the above vesicles previously resolubilized in 3 mM DDM at a lipid:tetrameric KcsA protein molar ratio of 500:1 and proteoliposomes were formed by detergent removal by gel filtration, as described (12). The reconstituted samples were centrifuged for 30 min at 300,000xg. The pellet was resuspended into reconstitution buffer to a protein concentration of 1 mg/ml, divided into 50 μ g aliquots, and stored in liquid N₂ (25).

Electrophysiology

Multilamellar giant liposomes (up to ~100 μ m in diameter) were prepared by submitting a mixture of the reconstituted vesicles from above (containing 50 μ g of wild-type KcsA or mutants at a lipid to tetrameric protein molar ratio of 500:1) and either asolectin, PC:PA:Chol or PC:PG:Chol lipid vesicles (25 mg of total lipids), to a cycle of partial dehydration/rehydration (12). Cholesterol was included in the phospholipid mixtures to facilitate giant liposome formation and handling. The resulting giant liposomes have a final lipid:tetrameric protein molar ratio of 46,800:1.

Standard, inside-out patch-clamp recordings (31) were carried out on excised patches from the giant liposomes, as reported previously (12). The pipette (extracellular) solution contained 10 mM Hepes buffer, pH 7, 100 mM KCl, and the bath (intracellular) solution contained 10 mM MES buffer, pH 4, 100 mM KCl. Voltage ramps or different holding potentials were routinely imposed on the membrane patches to record channel currents (see details in Figure legends).

Supported lipid bilayers (SLB) containing fluorescently-labeled KcsA

The sulfhydryl-containing mutant KcsA S22C was fluorescently labeled with a maleimide Alexa probe (Alexa Fluor®647 C2-maleimide, Molecular Probes, OR), as reported (12). Planar bilayers were prepared as in Chiantia et al. (32). Briefly, Alexa-labelled KcsA was reconstituted at 10,000:1, lipid to protein molar ratio in lipid vesicles of the indicated compositions. After a dilution to 0.7 mg/ml of lipid in 10 mM Hepes pH 7, 100 mM KCl, the sample was bath-sonicated for approximately 15 minutes to obtain small unilamellar vesicles. 150 μ L of the sample were then placed on a freshly cleaved mica substrate glued to a glass coverslip within an open chamber. To induce vesicle fusion and SLB formation, 3 mM Ca²⁺ was added, rapidly diluted with 400 μ l of buffer and incubated for 15 min at 37°C. Then the chamber was rinsed thoroughly with pre-warmed buffer to remove Ca²⁺ and non-fused vesicles. Control experiments to check for the homogeneity of lipid distribution in the SLBs were done always before measuring KcsA distribution (not shown). To do that, the fluorescent probe DiO C18(3) was incorporated in the liposomes, by its addition to the lipid mixtures when in the chloroform:methanol (2:1) solution used in the initial stages of the liposome formation protocol (30).

Confocal microscopy was performed on an laser scanning microscope Meta 510 system (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a 40 \times NA 1.2 UV-VIS-IR C Apochromat water-immersion objective. SLB samples with Alexa-labelled KcsA were excited with the 633 nm line of a He-Ne laser and the emitted light filtered through a 650 nm long-pass filter. In control experiments, DiO C18 (3) was excited with the 488 nm line of an Ar laser and the emitted light filtered through a 505–550 nm band-pass filter. Images were processed and analyzed with Scion Image (Scion Corp.).

Molecular modeling

KcsA-DPPA complexes were built using the KcsA structure having co-crystallized lipids (2) (PDB code 1K4C). The partial lipid structures seen in the crystal were used as a scaffold to build the entire DPPA lipid molecule. Lipid-protein contacts were optimized by energy minimization (see below).

Modeling of KcsA in the open conformation was done by homology, using the crystal structure of the open calcium-gated potassium channel MthK as a template (33) (PDB code 1LNQ). The sequence alignment was made with CLUSTALW (34) at the European Bioinformatics Institute site (<http://www.ebi.ac.uk/>) and manually supervised (final 24% identity and 40% similarity). The homology modeling was performed in the Swiss-Model Protein Modeling Server (35) at the ExPASy Molecular Biology site (<http://kr.expasy.org/>) under the *Project Mode*. Structure preparation for modeling was made using DeepView v4.1 (36). The model was evaluated using PROCHECK to show the residues in the allowed regions of the Ramachandran plots (37). Model refinements were carried out as in Molina *et al.* (38), followed by energy minimization. This latter process involved an initial short steepest descent minimization to remove bumps. Next, we performed a simulated annealing minimization in which the simulation cell was slowly cooled towards 0 K by downscaling the atom velocities. The entire system was subject to an equilibration process before the molecular dynamics simulation. The equilibration consisted of an initial minimization of the fixed backbone atoms. Next, the restrained α -carbon atoms were minimized and a short molecular dynamics (10 ps) minimization was performed to reduce the initial incorrect contacts and to fill the empty cavities. Finally, under periodic boundary conditions in the three coordinate directions, the full system was simulated at 310 K for 0.2 ns. All dynamic simulations were performed using Yasara (39) with the force field AMBER03 (40). The cutoff used for long-range interactions was set at 10 Å.

The above open KcsA model was used to predict dimeric KcsA-KcsA interactions. The docking prediction was accomplished with GRAMM-X v.1.2.0 (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu/>) using default conditions. The solutions were checked and filtered manually, discarding those without biological significance, then evaluated in terms of energy. The final model chosen was that having

the highest interaction energy and the lowest van der Waals clashes. Finally, we perform molecular dynamic simulation on the resulting dimeric KcsA, following the protocol stated above.

As an alternative to build a dimer of open KcsA channels, we used the crystal structure of the dimeric potassium transporter TrkH (41) (PDB code 3PJZ) as a scaffold to superimpose the 3-D structures of two open KcsA channels. The criteria for the superimposition were the correct alignment of the pore filter and the base of the pore helix.

The energy of the models and the docking complexes were tested using FoldX (42,43) on the CRG site: <http://foldx.crg.es>. Molecules were edited and reconstructed with the general purpose molecular modeling software Yasara (39). The final molecular graphic representations were created using PyMOL v1.6 (<http://www.pymol.org/>).

RESULTS

Modelling lipid-protein versus protein-protein interactions

Specific interactions of anionic phospholipids with non-annular binding sites at inter-subunit crevices in the KcsA homotetramer were first evidenced crystallographically (2) and more recently modelled (21). Figure 1A focuses on the details of such interaction at the level of the extracellular membrane-water interphase and shows that R89 at one of the KcsA subunits and R64 at the contiguous subunit forming the inter-subunit crevice, interact with the phospholipid, “clogging” the crevice’s entrance and forcing the side chain of W67 towards the channel core, where it interacts with E71 and D80. Such W67-E71-D80 triad has been reported to play a critical role on the dynamics and conformational stability of the channel’s selectivity filter and to determine inactivation in KcsA (44), an analogous process to C-type inactivation in eukaryotic K_v channels. The involvement of R89 and mainly R64 residues in the interaction with anionic lipids at these non-annular channel sites has been confirmed by NMR experiments (23) and MD simulations (45).

On the other hand, KcsA is known to self-associate into clusters, both *in vivo* and *in vitro* (12,13,46,47). Our hypothesis is that such clusters are responsible for the observed HOP patterns of KcsA activity, where the channels are opened most of the time and exhibit coupled gating (12). Therefore, in an attempt to explain how the individual channels could be assembled into clusters to give raise to channel activity with a high opening probability, we performed molecular

docking between two adjacent KcsA molecules, using an open channel model of KcsA based on the X-ray open channel structure of MthK as a template (33). The reason for choosing MthK for these studies is that it still remains as the only crystal structure of a potassium channel having open both, the inner and outer channel gates. Presence of lipid at the non-annular binding sites prevents docking between the two channels and therefore, lipids were eliminated from the model. In the absence of the competing lipids (Figure 1B), the inter-subunit crevice defining the non-annular sites in each channel, becomes now wider (the distance between the α -carbons of P63 in the pore helix and W87 in M2 segment increase 1-2 Å, as predicted by the model), being occupied by the N-terminal end of transmembrane M2 from the other channel, which contributes W87 to the interaction network. As a consequence of docking, the W67 side chain rotamer pointing away from the channel central core becomes now favoured, thus, disrupting the interactions within the W67-E71-D80 triad. Moreover, R64 and mainly R89 interact now with E71 and D80, further contributing to the disassembly of the W67-E71-D80 triad responsible for channel inactivation. In other words, the model predicts that a “clustered” KcsA channel should have different gating and inactivation properties than those seen when anionic phospholipids occupy the non-annular sites of the channel. Similar results as to the observed disruption of the inactivation triad as a consequence of clustering were also obtained when the open, inactivated X-ray structure of KcsA (PDB code 3F5W, (48)), instead of the MthK-derived model, was used for docking (data not shown).

As a second approach to test the above hypothesis, we took advantage of the reported X-ray structure of the potassium transporter TrkH (41), which already crystallizes as a dimer and therefore, does not require any docking procedure to be applied. In this case, it is the N-terminal end of the pore helix of one channel (instead of the M2, as mentioned above) what goes closer to the also wider inter-subunit crevice in the adjacent channel (Figure 1C). Nonetheless, the consequences of such interaction on the W67-E71-D80 triad are practically identical to those predicted from the docking above, as the positioning of the W67, R64 and R89 side chains in the dimer structure contribute similarly to disrupt the interactions within the inactivation triad.

From the above observations, two related predictions can be made: i) binding of anionic lipids to the non-annular sites should compete with KcsA clustering, and ii) assuming that clustering is indeed a determinant factor of gating behaviour, anionic phospholipids should be expected to influence the frequency of appearance of LOP or HOP activity patterns. These two predictions are tested below.

Effects of lipids on the assembly/disassembly of KcsA clusters

Mixed micelles containing the purified KcsA channel protein solubilized in DDM and different concentrations of specific lipids have been used here to evaluate the extent of KcsA clustering by BN-PAGE, a method of choice to study the organization of protein complexes (27,49-51) including KcsA (26). In BN-PAGE, samples are first solubilized with a mild detergent, usually digitonin or DDM, but it is the negative charge from the Coomassie Brilliant Blue bound to the hydrophobic protein surfaces what determines the electrophoretic mobility. Figure 2 shows that in the absence of added lipids, the DDM-solubilized protein (left-hand lane in all gels) exhibits several bands able to enter the gel, which correspond to different KcsA supramolecular assemblies, which remain as such in spite of detergent presence (26). The fastest migrating band in the gels is the well-known KcsA homotetramer (labeled as T species in the Figure), while the other gel bands correspond to supramolecular clusters comprising 2, 3, 4, and 5 tetrameric channels (labeled 2T, 3T, 4T and 5T in the Figure). Figure 2 also shows that increasing the amount of zwitterionic phospholipids (PC or PE in upper panel, respectively) in the mixed micelles, regardless of the phospholipid to protein ratio, have no significant effects on the relative abundances of the KcsA species detected by BN-PAGE. Conversely, when anionic phospholipids (PG or PA in lower panel) are used in the experiments, disassembly of the larger clusters occurs progressively as the phospholipid to protein ratio is increased, so that eventually the gels show mostly T and 2T KcsA species instead of the more complex starting population of clustered species. Quantitative analysis of cluster disassembly caused by the anionic phospholipids shows no apparent differences between the effects of either PG or PA, suggesting that the concentration-dependent process requires just a negatively-charged anionic phospholipid to take place.

In addition to the mixed micelles from above, SLBs have also been used as an experimental system to assess the concentration-dependent effects of anionic phospholipids on KcsA clusters. SLBs are likely to model native membranes better than mixed micelles and also lack detergents, thus providing data complementary to those from above. Figure 3 shows that fluorescently-labeled KcsA in the SLBs forms indeed clusters of variable sizes, up to 1-2 microns in diameter. The abundance of such clusters decreases dramatically and their size decreases slightly when the presence of anionic lipids in the supported bilayer is increased, thus, qualitatively confirming the observation from the mixed micelles above on the ability of high levels of anionic phospholipids to interfere on the assembly of KcsA into clusters.

Effects of lipids on KcsA function

We reconstituted KcsA into giant liposomes made from mixtures of different phospholipids to assess their effects on channel function by patch-clamp techniques. Figure 4A and B show that under these conditions the reconstituted KcsA still exhibits both LOP and HOP patterns of channel activity, comparable in all aspects to those described in detail when using asolectin phospholipids for reconstitution of wild-type KcsA (12). However, the frequencies of appearance of such activity patterns are now found to be dependent on the relative proportion of anionic to zwitterionic phospholipids used in the experiments (Figure 4C). Thus, giant liposomes containing only 5% of either PA or PG in a PC/cholesterol matrix have a high percent of patches exhibiting HOP patterns of activity (~70% of the recordings, taking together the two populations of PA- and PG-containing giant liposomes; n=84). Conversely, giant liposomes containing 25% of either PA or PG in the lipid matrix show an increased presence of LOP patterns, i.e., a marked decrease in the frequency of appearance of HOP patterns (which account for only ~30% of the recordings; n=91; $p < 0.01$ when compared against the group of 5% anionic lipids, z-test). Interestingly, the frequency of appearance of HOP patterns reported in asolectin lipids (12), which is between those found in the lipid media containing 5 or 25% anionic phospholipids from above (Figure 4C), seems consistent with the report that asolectin lipids contain 10-13% anionic phospholipids (52). These observations indicate that the ability of KcsA to exhibit HOP patterns of channel activity is inversely related to the

concentration of anionic phospholipids within the reconstituted membrane bilayer. In any case, it should be noted that at comparable concentrations, PA was always more efficient than PG in decreasing the percent of HOP patterns.

The presence of anionic phospholipids in the lipid matrix has an additional effect on the observed HOP currents: While the samples containing 5% anionic lipids, in which HOP patterns are predominant, show a clear inward rectification at negative potentials (see lower (HOP) traces in Figure 4A), those containing 25% anionic lipids show HOP currents with a lesser inward rectification (see lower (HOP) traces in Figure 4B). Such different features were previously observed as variants of HOP patterns upon reconstitution of KcsA in asolectin lipids (12).

Analysis of KcsA single mutants

In the previous paragraphs we hypothesized that the different patterns of channel clustering and gating observed in the presence of increasing concentrations of anionic phospholipids, could be explained on the basis of differential interactions involving key amino acid residues, namely R64, R89 and W67, that bear on the integrity of the W67-E71-D80 inactivation triad and thus, on the properties of the selectivity filter. Therefore, we conducted experiments with several mutants of KcsA to test our hypothesis.

The electrostatic interaction between anionic phospholipids and positively-charged amino acid residues in the KcsA sequence is believed to constitute the basis for lipid binding to the non-annular sites (16,20). Therefore, substitution of the R64 or R89 residues by uncharged amino acids in KcsA mutants should disfavor the stabilization of anionic phospholipids at such sites and according to our working hypothesis, such mutants should be expected to display an altered pattern of channel clustering and gating. Figure 5 shows that compared to the wild-type channel in Figure 2, the R64A KcsA mutant is indeed relatively insensitive to the effect of anionic phospholipids on the disassembly of channel clusters observed by BN-PAGE. Conversely, the R89A mutant still shows a partial response of cluster disassembly by anionic phospholipids, more markedly to PA than to PG, suggesting that lipid interaction and the subsequent cluster disassembly, relates mainly to the presence of the R64 residue in the channel sequence.

As to the functional responses, the two arginine mutant channels have in common a marked loss of their ability to inactivate. Figure 6A and B show that the predominant pattern seen in the R64A mutant is very similar to the HOP pattern exhibited by the wild-type channel (68%; 17 out of 25 patches), including the characteristic coupled gating observed in channel openings and closings within the HOP recordings. Single channel recordings taken from this mutant channel (Figure 6C) shows that the channel conductance is also similar to that reported for the wild-type channel (12), but the channel opening probability is greatly increased, as expected, approaching that reported by others for this and other mutant channels such as the E71A mutant (53), considered an archetypical “non-inactivating” channel. As different from the above, the R89A channel mutant shows unusual HOP patterns (73%; 30 out of 41 patches), with lower overall current levels throughout the voltage ramps, particularly at negative potentials (Figure 6D), and a marked loss of the coupled gating feature (Figure 6E), as if the ensemble of channels within the clusters were now opening and closing in a mostly independent manner. We termed this behaviour of the R89A mutant as an “uncoupled” HOP pattern, which is similar to that reported by Perozo’s group for several KcsA mutant channels (53). Nonetheless, the R89A mutant has in common with the R64A mutant, a similar conductance and channel opening probability in single channel recordings (Figure 6F).

In spite of having been reported by others (44,53), W67F and E71A KcsA mutants were also prepared in our lab to compare their behaviour under our experimental conditions with the arginine mutants from above. In agreement with such reports, we found that, even more markedly than in the R89A mutant, HOP recordings in both the E71A and W67F mutants, have an even lower extent of channel coupling, i.e., were also “uncoupled” HOPs, and when recorded as single channels, exhibited also a high P_o , as expected from these two amino acid residues being part of the W67-E71-D80 inactivation triad (data not shown).

Finally, it should be noted that the “uncoupled” HOPs seen in the R89A mutant, as well as those in the W67A and E71A mutants, showed I/V curves with outward rectification, instead of the inward rectification or almost ohmic behaviour seen in conventional HOP patterns from either the wild-type KcsA or the R64A mutant. Outward rectification is a hallmark feature of

KcsA single channels (5,8,12), thus, further supporting that the “uncoupled” HOP recordings arise from channels that, despite of forming clusters, act independently.

DISCUSSION

Channel activity in KcsA results from a concerted equilibrium between two defined ion gates within the protein structure (54). The inner gate is formed by the intracellular transmembrane helix bundle crossing, which is destabilized at acidic pH, shifting the equilibrium towards its open conformation. On the other hand, the outer gate at the selectivity filter defines primarily the channel’s opening probability and may shift its conformation equilibrium from the permeation state towards a non-permeation state, causing channel inactivation. Both, the conformational state and functional responses of KcsA seem strongly modulated by its surrounding membrane milieu (43,55-57), probably through an alteration of one or both gating equilibria. So far, different mechanisms have been proposed to explain such effects. On one hand, although still controversial, non-specific electrostatic interactions between anionic lipids and the N-terminal portion of the protein are proposed to favor the open conformation of the channel’s inner gate (58), resulting in an increased activity. On the other hand, specific interactions of anionic lipids with the non-annular binding sites of KcsA have been proposed to modulate ion channel function through its influence on the outer gate (45,57), although there is not a clear explanation for such effect. In this work, we propose that a competition between lipid-protein and protein-protein interactions at the non-annular binding sites constitutes a central element in such KcsA modulation.

Both “*in vivo*” (13) and “*in vitro*” (12,25,46,47), KcsA assembles into supramolecular clusters, which could even be the predominant forms in which this channel is present in bacterial membranes (12,25). Here we report that both, in a mixed lipid/detergent micellar system and in supported bilayers, the presence of anionic phospholipids modulates assembly/disassembly of such KcsA clusters. So, low proportions of anionic phospholipids allow KcsA to remain associated into clusters, whereas higher concentrations lead to cluster disassembly. Moreover, such conditions of high or low proportion of anionic phospholipids in reconstituted giant liposomes containing KcsA, increases the frequency of appearance of either

LOP or the more complex HOP patterns of channel activity, respectively, in patch clamp recordings. Thus, the effects of the anionic phospholipids on the assembly/disassembly of clusters and on the appearance of HOP/LOP patterns of activity are correlative and suggest that the more complex HOP recordings arise indeed from large channel clusters, while LOP recordings originate mostly from non-clustered, phospholipid-bound KcsA channels. It should be noted here that experimental variables such as the presence of detergent, lipids or the lipid to protein ratios used in reconstitution, greatly influence KcsA assembly and therefore, the comparison of results from the different experimental approaches used here should only be done in qualitative terms.

In an attempt to find a cause-and-effect relationship for the above phenomena, we modelled the consequences of the interaction of either an anionic phospholipid or another tetrameric channel at the non-annular site of KcsA. Fortunately, these interactions are partly documented from X-ray crystallographic data of both, the anionic phospholipid-KcsA complex (2) and that of the dimeric potassium transporter TrkH (40), thus, providing a valuable experimental support to our models. Opposite to the channel-channel interaction, binding of the phospholipid to the non-annular site on the channel allows W67 to form the W67-E71-D80 triad, which should leave the phospholipid-bound channel prone to inactivate. Because KcsA is a homotetramer, there are four identical non-annular sites, each of them acting on just one out of the four rows of T75-V76-G77-Y78-G79 residues from each subunit, which contribute their carbonyl groups to configure the selectivity filter. It is to be expected that anionic lipids disrupt channel-channel interactions at more than one of such sites to affect sufficiently the selectivity filter conformation as to make inactivation a truly effective process, whose occurrence should be dependent on the phospholipid concentration. Obviously, a readily inactivating channel should produce recordings characterized by a low channel opening probability, i.e., a LOP pattern of activity, as it has been found experimentally.

On the contrary, because the inactivation triad in clustered KcsA is predictably disrupted as channel-channel interaction causes that W67 swings away from its E71 and D80 partners, these clustered channels would not be expected to inactivate as readily as the phospholipid-bound, non-clustered KcsA channel does. This is indeed

the case in the observed HOP patterns of channel activity.

Finally, site-directed mutagenesis at specific residues involved in the interaction with the anionic phospholipids was carried out to provide additional evidence to support or to discard our working hypothesis. In this regard, R64 and R89 residues are claimed to be responsible for electrostatic interaction with the anionic phospholipids at the non-annular protein sites and their substitution by alanine should be expected to minimize such interactions, partly preventing cluster disassembly and channel inactivation. This seems clearly the case in the R64A mutant, which does not disassemble significantly when in presence of anionic phospholipids, as shown by the BN-PAGE assay, and exhibits an essentially non-inactivating pattern of channel activity, very similar to the HOP patterns in wild-type KcsA, in which coupled-gated currents are observed throughout. These results further evidence a major role of R64 in lipid interaction.

Conversely, the R89A mutant shows clusters that partly disassemble in response to the presence of anionic phospholipids, more markedly to PA than to PG, and exhibits lower current levels and less coupled gating than the wild-type KcsA. The larger effect of PA over PG on cluster disassembly could be due to that, in the appropriate environment, PA could become a dianionic species, which may further favour the interaction with the positively-charged groups in the protein. Indeed, PA has been reported to have a higher affinity than PG to bind to the non-annular sites of KcsA (21). As to the decrease in current level observed in the R89A mutant, we found that both, the single channel conductance and the opening probability in these two arginine mutants were similar and therefore, the lower current levels observed in the R89A mutant should be mainly attributed to a diminished capacity to recruit individual channels into the coupled-gated clusters. Therefore, the behaviour of the R89A mutant channel suggests that the R89 residue is important to maintain gating features characteristic of HOP patterns in wild-type KcsA, as its absence results in "uncoupled" HOP patterns with an outward rectification. This is also similarly observed in the W67F and E71A mutants and therefore, it seems that the residues involved in determining channel inactivation, including R89, are also involved in conferring channel coupling and current rectification properties through a still undefined mechanism.

The above experimental observations as well as the predictions from the models are depicted in a simplified manner in Scheme 1. Interaction with the anionic phospholipid, in which R64 is heavily involved, impedes cluster assembly and leaves W67, E71 and D80 residues free to form the inactivation triad, resulting in individual, lipid-bound channels (LOP patterns of channel activity). On the contrary, cluster assembly displaces W67 from the inactivation triad. Such a displacement seems difficult to reverse as the remaining inactivation triad members (E71 and D80) are now predictably stabilized by interaction with R89, which swings into the channel core as a consequence of channel-channel interaction. This results in clustered channels quite unable to inactivate, which may exhibit either i) coupled gating, as in the conventional HOP patterns characteristic of wild-type KcsA, or ii) “uncoupled” HOPs, when in the absence of strategic amino acid residues, as seen in some of the mutants above. Interestingly, altering interactions among residues equivalent to those configuring the inactivation triad in KcsA, has been found to change selectivity, block and current rectification properties in a Kir channel (65).

KcsA clusters have been detected “*in vivo*” (13) and indeed, they might account for the complex patterns of electrical activity reported earlier for this channel (4,5). Nonetheless, the assembly of clusters “*in vitro*” upon membrane reconstitution from purified channel preparations is a protein concentration-dependent phenomenon (12) and therefore, the experimental conditions used in reconstitution by the different authors, particularly the lipid to protein ratios used, which ranges within more than an order of magnitude, should be expected to greatly influence the occurrence of clustering and its functional consequences. For instance, clustering might go unnoticed under conditions such as those used to obtain recordings in black lipid membranes, which use a very low concentration of KcsA, sometimes in the presence of detergents or organic solvents, which may also compete for binding to the KcsA non-annular sites. Indeed, the low opening probability mode of KcsA is believed to be predominant in planar bilayer experiments (9). In any case, considering that the molar ratio of KcsA to phospholipids in our giant liposome samples ranged approximately from 1:10,000 to 1:46,800, it becomes obvious that the affinity of KcsA to associate with other KcsA channels to form clusters above a certain threshold of protein

concentration, is much higher than that to bind the anionic phospholipids contained in the bilayer and therefore, cluster formation should be favoured under our experimental conditions.

All the evidence from above seemingly completes an scenario in agreement with the starting hypothesis, in which competing lipid-protein or protein-protein interactions at the non-annular sites of KcsA determine both, the occurrence of clustering and changes in gating behaviour. The latter changes seemingly result from interfering with the assembly of the W67-E71-D80 inactivation triad, which in turn bears on the conformation of the selectivity filter. In other words, “clustered” KcsA channels have different dynamics and conformational stability at the selectivity filter than “non-clustered”, phospholipid-bound KcsA. Both, clustering- and lipid-related effects in gating behaviour have also been reported for other channels (59-64) and although diverse mechanistic explanations have been given, it may be possible that phenomena similar to that reported here might also underline some of those observations.

Acknowledgements: J. A. Poveda acknowledges the support from the “José Castillejo” program for short research stays from the MCINN (Spain) and thanks Dr. Petra Schwille for the use of facilities at her laboratory at the “Biotechnologisches Zentrum (BIOTEC)”, Technische Universität Dresden. We also thank Dr. Salvatore Chiantia and Dr. Jakob Schweizer for their help with SLBs experiments; Dr. Erica Kremer and Dr. Antoinette Killian for the pT7-837KcsA containing the R64A-KcsA gene mutant and Dr. Antonio V. Ferrer-Montiel for his critical reading of the manuscript. Eva Martínez provided excellent technical assistance throughout. This work has been partly supported by grants from the Spanish MICINN BFU2011-25920, BFU2012-31359 and Consolider-Ingenio 2010 CSD2-2008-00005.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Author contributions: JMG coordinated the study and wrote the paper. MLM conceived the study and designed, performed and analyzed the experiments shown in Figures 4 and 6. AMG designed, performed and analyzed the experiments shown in Figures 2 and 5. JAP designed, performed and analyzed the experiments shown in Figure 3. GFB performed and analyzed the models shown in Figure 1. EM performed some of the experiments shown in Figure 6. EM, MLR, AMF, AM, JAE and GR provide a discussion and critical revision of the manuscript. AM performed also the statistical analysis. GR also gently lent his laboratory for electrophysiology experiments shown in Figure 4. All authors analyzed the results and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69-77
2. Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43-48
3. Uysal, S., Vasquez, V., Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F. A., Sidhu, S. S., Koide, S., Perozo, E., and Kossiakoff, A. (2009) Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 6644-6649
4. Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* **14**, 5170-5178
5. Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., and Schrempf, H. (1999) Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* **462**, 447-452
6. Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M., and Schrempf, H. (2000) Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* **472**, 83-87
7. Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel. *J. Gen. Physiol* **111**, 741-749
8. LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol* **118**, 303-314
9. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents. *J. Gen. Physiol* **130**, 479-496
10. Zakharian, E. and Reusch, R. N. (2004) *Streptomyces lividans* potassium channel KcsA is regulated by the potassium electrochemical gradient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 429-436
11. Zakharian, E. and Reusch, R. N. (2004) Functional evidence for a supramolecular structure for the *Streptomyces lividans* potassium channel KcsA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1059-1065

12. Molina, M. L., Barrera, F. N., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Renart, M. L., Encinar, J. A., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J. Biol. Chem.* **281**, 18837-18848
13. Hegermann, J., Overbeck, J., and Schrempf, H. (2006) In vivo monitoring of the potassium channel KcsA in *Streptomyces lividans* hyphae using immuno-electron microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. *Microbiology* **152**, 2831-2841
14. Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel. *Biochemistry* **41**, 10771-10777
15. Demmers, J. A., van Dalen, A., de Kruijff B., Heck, A. J., and Killian, J. A. (2003) Interaction of the K⁺ channel KcsA with membrane phospholipids as studied by ESI mass spectrometry. *FEBS Lett.* **541**, 28-32
16. Deol, S. S., Domene, C., Bond, P. J., and Sansom, M. S. (2006) Anionic phospholipid interactions with the potassium channel KcsA: simulation studies. *Biophys. J.* **90**, 822-830
17. Lee, A. G. (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 62-87
18. Cheng, M. H., Xu, Y., and Tang, P. (2009) Anionic lipid and cholesterol interactions with alpha4beta2 nAChR: insights from MD simulations. *J. Phys. Chem. B* **113**, 6964-6970
19. Fersht, A. R. (1999) *Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding*, 3rd Ed., New York
20. Marius, P., Alvis, S. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2005) The interfacial lipid binding site on the potassium channel KcsA is specific for anionic phospholipids. *Biophys. J.* **89**, 4081-4089
21. Triano, I., Barrera, F. N., Renart, M. L., Molina, M. L., Fernandez-Ballester, G., Poveda, J. A., Fernandez, A. M., Encinar, J. A., Ferrer-Montiel, A. V., Otzen, D., and Gonzalez-Ros, J. M. (2010) Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry* **49**, 5397-5404
22. Barrera, F. N., Renart, M. L., Poveda, J. A., de, K. B., Killian, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (2008) Protein self-assembly and lipid binding in the folding of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* **47**, 2123-2133
23. Marius, P., de Planque, M. R., and Williamson, P. T. (2012) Probing the interaction of lipids with the non-annular binding sites of the potassium channel KcsA by magic-angle spinning NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 90-96
24. van Dalen, A., Hegger, S., Killian, J. A., and de Kruijff, B. (2002) Influence of lipids on membrane assembly and stability of the potassium channel KcsA. *FEBS Lett.* **525**, 33-38
25. Molina, M. L., Encinar, J. A., Barrera, F. N., Fernandez-Ballester, G., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2004) Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* **43**, 14924-14931
26. Giudici, A. M., Molina, M. L., Ayala, J. L., Montoya, E., Renart, M. L., Fernandez, A. M., Encinar, J. A., Ferrer-Montiel, A. V., Poveda, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (2013) Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: relative abundance and interactions involved. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 193-200
27. Schagger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231
28. Schagger, H., Cramer, W. A., and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230
29. Neuhoff V, Stamm R, and Eibl H (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* **6**, 427-448
30. Riquelme, G., Lopez, E., Garcia-Segura, L. M., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1990) Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels. *Biochemistry* **29**, 11215-11222
31. Hamill, O. P., Huguenard, J. R., and Prince, D. A. (1991) Patch-clamp studies of voltage-gated currents in identified neurons of the rat cerebral cortex. *Cereb. Cortex* **1**, 48-61

32. Chiantia, S., Kahya, N., and Schwille, P. (2005) Dehydration damage of domain-exhibiting supported bilayers: an AFM study on the protective effects of disaccharides and other stabilizing substances. *Langmuir* **21**, 6317-6323
33. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**, 515-522
34. Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
35. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3381-3385
36. Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723
37. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**, 477-486
38. Molina, M. L., Barrera, F. N., Encinar, J. A., Renart, M. L., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Santoro, J., Bruix, M., Gavilanes, F., Fernandez-Ballester, G., Neira, J. L., and Gonzalez-Ros, J. M. (2008) N-type inactivation of the potassium channel KcsA by the *Shaker* B "ball" peptide: mapping the inactivating peptide-binding epitope. *J. Biol. Chem.* **283**, 18076-18085
39. Krieger, E., Koraimann, G., and Vriend, G. (2002) Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins* **47**, 393-402
40. Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J., and Kollman, P. (2003) A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* **24**, 1999-2012
41. Cao, Y., Jin, X., Huang, H., Derebe, M. G., Levin, E. J., Kabaleeswaran, V., Pan, Y., Punta, M., Love, J., Weng, J., Quick, M., Ye, S., Kloss, B., Bruni, R., Martinez-Hackert, E., Hendrickson, W. A., Rost, B., Javitch, J. A., Rajashankar, K. R., Jiang, Y., and Zhou, M. (2011) Crystal structure of a potassium ion transporter, TrkH. *Nature* **471**, 336-340
42. Guerois, R., Nielsen, J. E., and Serrano, L. (2002) Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. *J. Mol. Biol.* **320**, 369-387
43. Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., and Serrano, L. (2005) The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* **33**, W382-W388
44. Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Chakrapani, S., and Perozo, E. (2011) A multipoint hydrogen-bond network underlying KcsA C-type inactivation. *Biophys. J.* **100**, 2387-2393
45. Weingarh, M., Prokofyev, A., van der Crujisen, E. A., Nand, D., Bonvin, A. M., Pongs, O., and Baldus, M. (2013) Structural determinants of specific lipid binding to potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 3983-3988
46. Raja, M. and Vales, E. (2009) Effects of sodium chloride on membrane fusion and on the formation of aggregates of potassium channel KcsA in Escherichia coli membrane. *Biophys. Chem.* **142**, 46-54
47. Seeger, H. M., Bortolotti, C. A., Alessandrini, A., and Facci, P. (2009) Phase-transition-induced protein redistribution in lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* **113**, 16654-16659
48. Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., and Perozo, E. (2010) Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. *Nature* **466**, 203-208
49. Heuberger, E. H., Veenhoff, L. M., Duurkens, R. H., Friesen, R. H., and Poolman, B. (2002) Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J. Mol. Biol.* **317**, 591-600
50. Nicke, A., Rettinger, J., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1999) Blue native PAGE as a useful method for the analysis of the assembly of distinct combinations of nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **19**, 493-507
51. Vinothkumar, K. R., Raunser, S., Jung, H., and Kuhlbrandt, W. (2006) Oligomeric structure of the carnitine transporter CaiT from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **281**, 4795-4801

52. McCormick, J. I. and Johnstone, R. M. (1988) Volume enlargement and recovery of Na⁺-dependent amino acid transport in proteoliposomes derived from Ehrlich ascites cell membranes. *J. Biol. Chem.* **263**, 8111-8119
53. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 311-318
54. Blunck, R., Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Perozo, E., and Bezanilla, F. (2006) Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction. *J. Gen. Physiol.* **128**, 569-581
55. Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol.* **114**, 551-560
56. Imai, S., Osawa, M., Mita, K., Toyonaga, S., Machiyama, A., Ueda, T., Takeuchi, K., Oiki, S., and Shimada, I. (2012) Functional equilibrium of the KcsA structure revealed by NMR. *J. Biol. Chem.* **287**, 39634-39641
57. Marius, P., Zagnoni, M., Sandison, M. E., East, J. M., Morgan, H., and Lee, A. G. (2008) Binding of anionic lipids to at least three nonannular sites on the potassium channel KcsA is required for channel opening. *Biophys. J.* **94**, 1689-1698
58. Iwamoto, M. and Oiki, S. (2013) Amphipathic antenna of an inward rectifier K⁺ channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 749-754
59. Undrovinas, A. I., Fleidervish, I. A., and Makielski, J. C. (1992) Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. *Circ. Res.* **71**, 1231-1241
60. Goforth, R. L., Chi, A. K., Greathouse, D. V., Providence, L. L., Koeppe, R. E., and Andersen, O. S. (2003) Hydrophobic coupling of lipid bilayer energetics to channel function. *J. Gen. Physiol.* **121**, 477-493
61. Botelho, A. V., Huber, T., Sakmar, T. P., and Brown, M. F. (2006) Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophys. J.* **91**, 4464-4477
62. Grage, S. L., Keleshian, A. M., Turdeladze, T., Battle, A. R., Tay, W. C., May, R. P., Holt, S. A., Contera, S. A., Haertlein, M., Moulin, M., Pal, P., Rohde, P. R., Forsyth, V. T., Watts, A., Huang, K. C., Ulrich, A. S., and Martinac, B. (2011) Bilayer-mediated clustering and functional interaction of MscL channels. *Biophys. J.* **100**, 1252-1260
63. Spira, F., Mueller, N. S., Beck, G., von Olshausen, P., Beig, J., and Wedlich-Soldner, R. (2012) Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat. Cell Biol.* **14**, 640-648
64. Mueller, N. S., Wedlich-Soldner, R., and Spira, F. (2012) From mosaic to patchwork: matching lipids and proteins in membrane organization. *Mol. Membr. Biol.* **29**, 186-196
65. Dibb, K. M., Rose, T., Makary, S. Y., Claydon, T. W., Enkvetchakul, D., Leach, R., Nichols, C. G., and Boyet, M. R. (2003) Molecular basis of ion selectivity, block, and rectification of the inward rectifier Kir3.1/Kir3.4 K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **278**, 49537-49548.

FOOTNOTES

⁽¹⁾ These two authors contributed equally to this work.

^(**) To whom correspondence should be addressed. Phone: + 34 96 6658757; Fax: + 34 96 6658758; E-mail: gonzalez.ros@umh.es

⁽²⁾The abbreviations used are: BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis; DDM, dodecyl β -D-maltoside; DiOC18(3), 3,3'-Dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate; DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DOPG, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)]; DPPA, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate; HOP, High Opening Probability; KcsA, potassium channel from *S. lividans*; LOP, Low Opening Probability; nT species, supramolecular assemblies containing n number of clustered KcsA tetrameric channels; PA, L- α -phosphatidic acid (egg,

Chicken); PC, L- α -phosphatidylcholine (egg, Chicken); PE, L- α -phosphatidylethanolamine (egg, Chicken); PG, L- α -phosphatidylglycerol (egg, Chicken); SLB, supported lipid bilayers; T species, individual KcsA tetrameric channels.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Lipid-protein and protein-protein interactions at non-annular lipid binding sites. Panel A shows a top view (normal to the membrane plane) of an extracellular portion comprising amino acid residues 62 to 101 (roughly indicated by the box on the small diagram to the right of panel A) in the crystallographic structure of KcsA (PDB code 1K4C) defining one of the four intersubunit crevices acting as non-annular lipid binding sites. A DPPA molecule (atoms represented as spheres) has been drawn bound to such site, using as a scaffold the partial lipid structure appearing in the protein crystal (see Methods). Adjacent protein subunits defining the non-annular site are coloured in light brown and green. The one letter code and numbering in the KcsA sequence for the main amino acid residues involved in the interactions have been included. Hydrogen bonds are indicated by red dashed lines. It should be noted that the W67-E71-D80 inactivation triad is fully configured and that the lipid polar head interacts primarily with R64 and R89. Panel B shows the results from computer docking two KcsA channels in an attempt to model a cluster. In this case, the KcsA sequence was previously modelled on the basis of homology onto the open structure of MthK (see Methods). The non-annular binding sites, flanked by the pore helix and M2 in each channel, interact now with the M2 from the adjacent channel (Channel 2; subunits coloured in light blue and pink), while the inactivation triad has been disrupted. Panel C shows the results of modelling the two KcsA channel cluster based on the X-ray structure of the potassium transporter TrkH, which already crystallizes as a dimer (see Methods). Notice that in this case, the non-annular binding site interacts with the pore helix from the adjacent channel, but the effect of such interaction on the disruption of the inactivation triad is identical.

Figure 2. Blue Native PAGE analysis of phospholipid effects on the disassembly of KcsA clusters in mixed micelles. Mixed micelles containing KcsA and either PC, PE, PG and PA at the indicated phospholipid to KcsA molar ratios were prepared and analyzed by BN-PAGE. Representative gels for each condition and the results from densitometry expressed as the percentage of T (close squares) and nT (open squares) bands relative to the sum of all the bands present within each gel lane are shown. T stands for the KcsA tetramer, while nT refers to the sum of 2T, 3T, 4T, 5T cluster species having 2, 3, 4, 5-times the molecular weight of the KcsA tetramer. Values represent the average \pm SEM of 5 different gels from each condition.

Figure 3. KcsA clusters in supported bilayers. Representative fluorescence microscopy images of a confocal cross-section (parallel to the bilayer plane) of SLBs containing Alexa 647-labeled KcsA. (A) SLBs made from a DOPC:DOPG mixture at a 95:5 molar ratio. (B) SLBs of pure DOPG. Large and highly fluorescent array-like protein complexes of variable sizes are seen in both cases. (C) Size distribution of KcsA clusters in the two SLBs samples from above. Bars represent the number of clusters observed per image in the pure DOPG (filled) and in the DOPC:DOPG (open) samples. Values are the average \pm SEM of 4-9 images from each of three different SLB samples prepared in each condition.

Figure 4. Effects of anionic phospholipids on the gating patterns of KcsA reconstituted into giant liposomes. Panels A and B show representative voltage ramps (-200 to 200 mV from a 0 mV holding potential, 133 mV/s) showing typical Low Opening Probability (LOP) and High Opening Probability (HOP) activity patterns of KcsA obtained by patch clamping excised, inside-out patches from giant liposomes containing KcsA reconstituted into 5 or 25 % of anionic lipid (PA or PG; see Methods). The dashed lines indicate the closed channel states. Channel openings appear as upward (at positive voltages) or downward (at negative voltages) deflections over the closed state line. Thin continuous lines indicate zero current level. Panel C shows the percentage of patches showing HOP patterns in each of the above groups. Giant liposomes containing only 5% (black columns) of either PA or PG in the PC/cholesterol matrix showed 58,3% ($n=14$ from 24 patches) or 75,0% ($n=45$ from 60 patches) of patches exhibiting HOP patterns of activity, respectively; while giant liposomes containing 25% (grey

columns) of either PA or PG in the lipid matrix show 17,9% (n=7 from 39 patches) or 38,5% (n=20 from 52 patches) HOP patterns of activity, respectively. To compare the occurrence of a characteristic of interest between two groups, we used the z-test. Asterisks indicate significant differences ($p < 0,05$) in the occurrence of HOP pattern activity in samples containing different proportions of the same anionic lipid. The effect of anionic lipids on HOP activity occurrence was even more evident when comparing together the data of PA and PG for the two concentrations tested (see the Results section for details). The right side column in panel C, termed ASO, indicates the percent of HOP patterns found when reconstituting KcsA into giant liposomes made from asolectin lipids (45,7%; n=75 from 164 patches).

Figure 5. Blue Native PAGE analysis of the effects of phospholipids on the disassembly of clusters of KcsA arginine mutants in mixed micelles. Mixed micelles containing the indicated KcsA arginine mutants and either PC (upper row of gels), PA (middle row) or PG (bottom row), at the indicated phospholipid to KcsA molar ratios, were analyzed by BN-PAGE. Experimental conditions and details within the Figure are as in Figure 2.

Figure 6. Gating patterns observed in R64A and R89A KcsA mutants. Panel A and D show representative voltage ramps illustrating the predominant activity patterns of the R64A (panel A; 17 out of 25 patches, 68% of the cases) and the R89A (panel D; 30 out of 41 patches, 73% of the cases) KcsA mutants, respectively, reconstituted into giant liposomes made from asolectin lipids. Experimental conditions and drawing details are as in Figure 4. Notice that the R64A mutant shows HOP patterns of activity very similar to those seen in wild-type KcsA (12) and exhibits coupled gating, as illustrated in the continuous recording taken at +150 mV shown in Panel B. None of these features are clearly present in the R89A mutant (panels D and E) which exhibits mainly “uncoupled” HOPs (see the Results section). Panels C and F show single channel recordings taken also at +150 mV of the two mutant channels to illustrate that in spite of the above differences, the channel conductance and opening probability when analyzed at the single channel level, are similar in both cases.

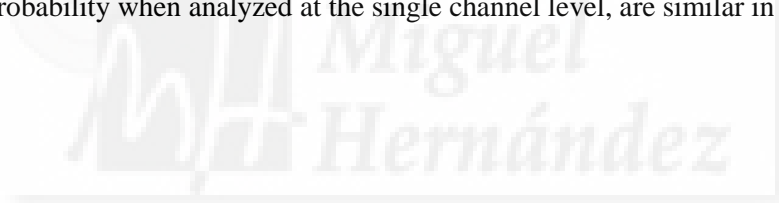


Figure 1

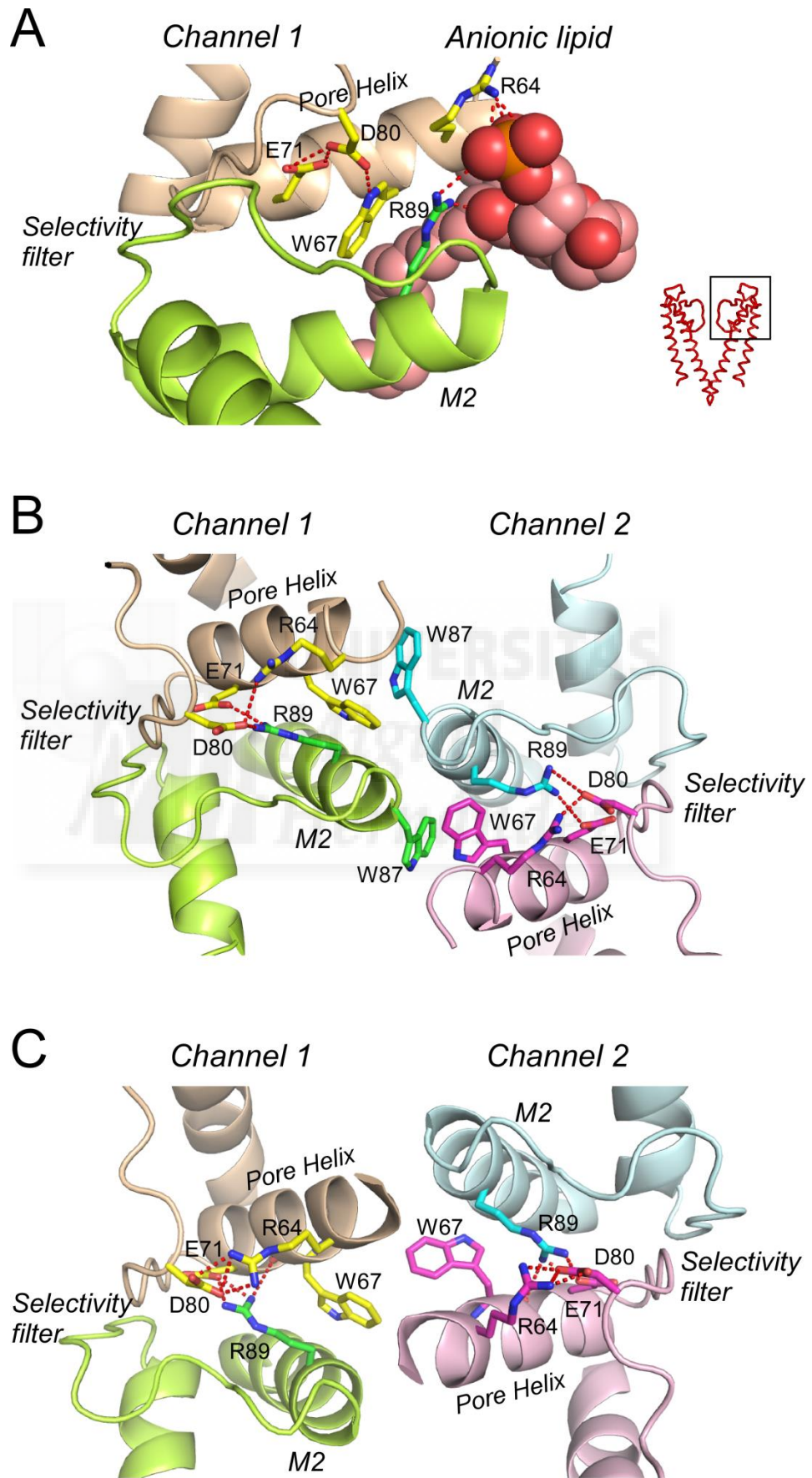


Figure 2

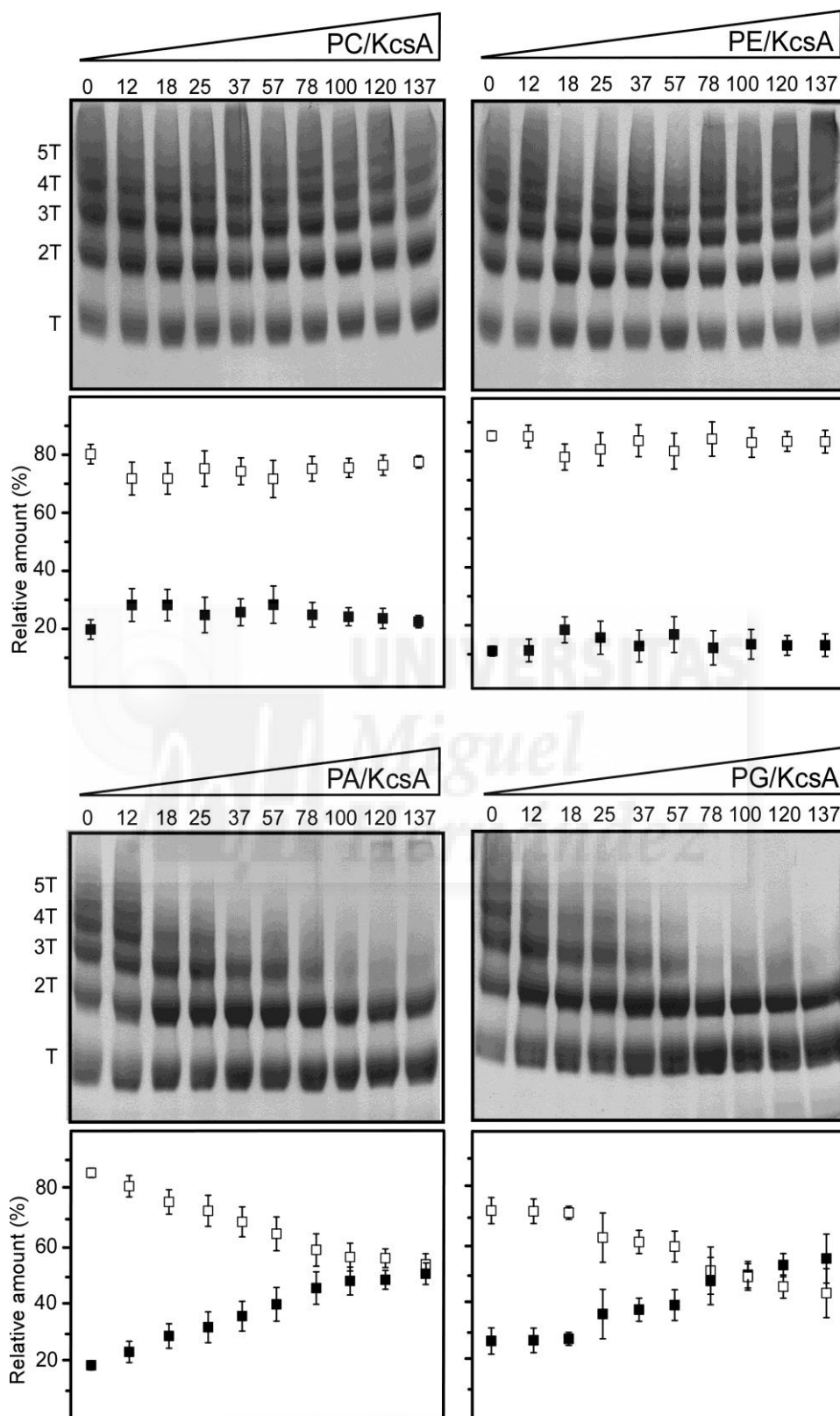


Figure 3

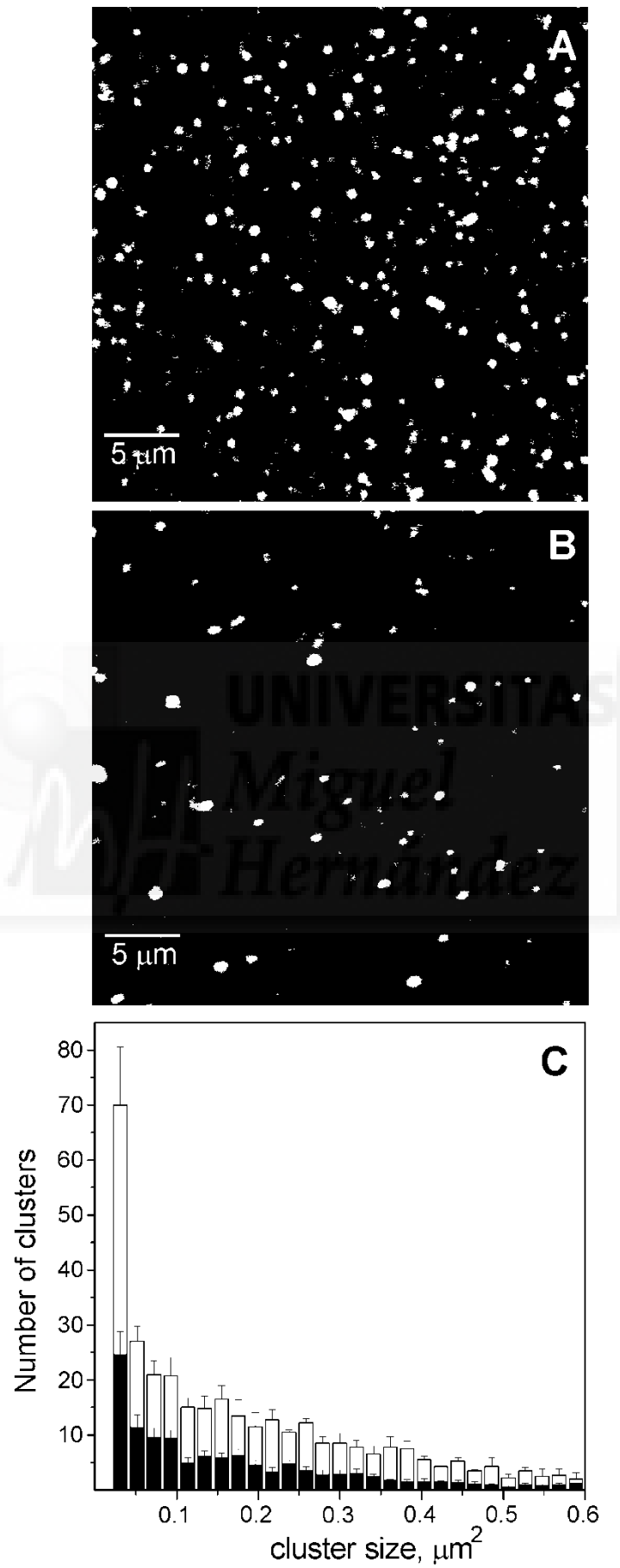


Figure 4

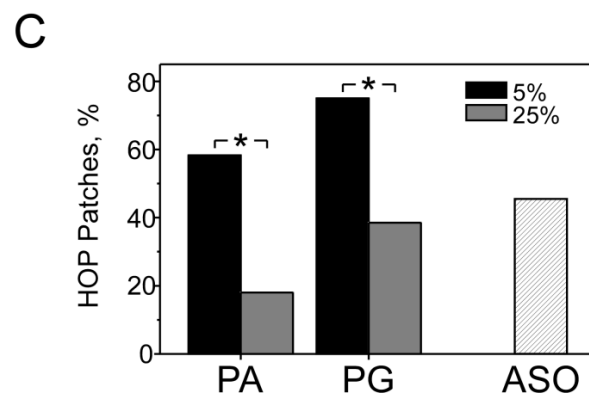
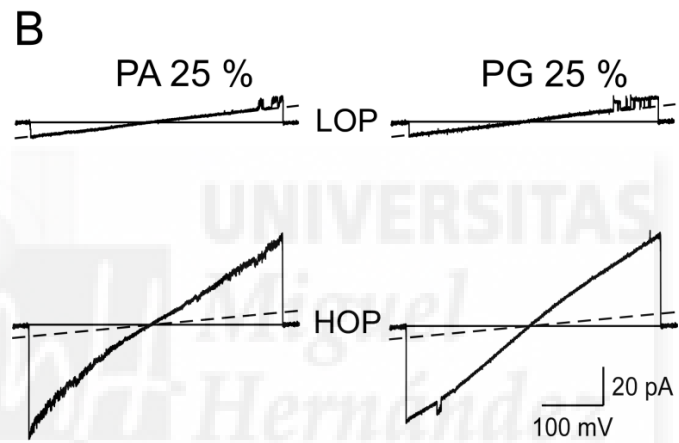
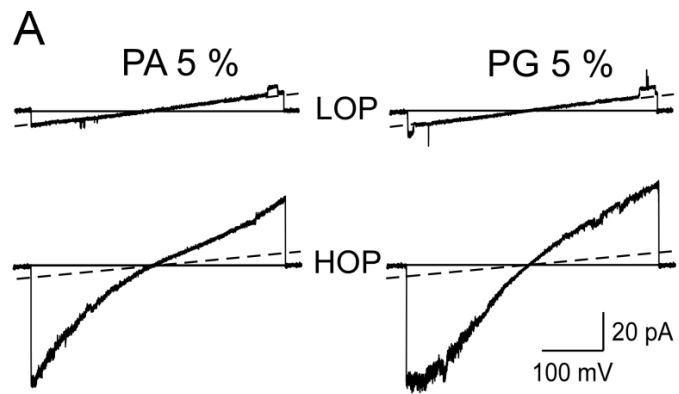


Figure 5

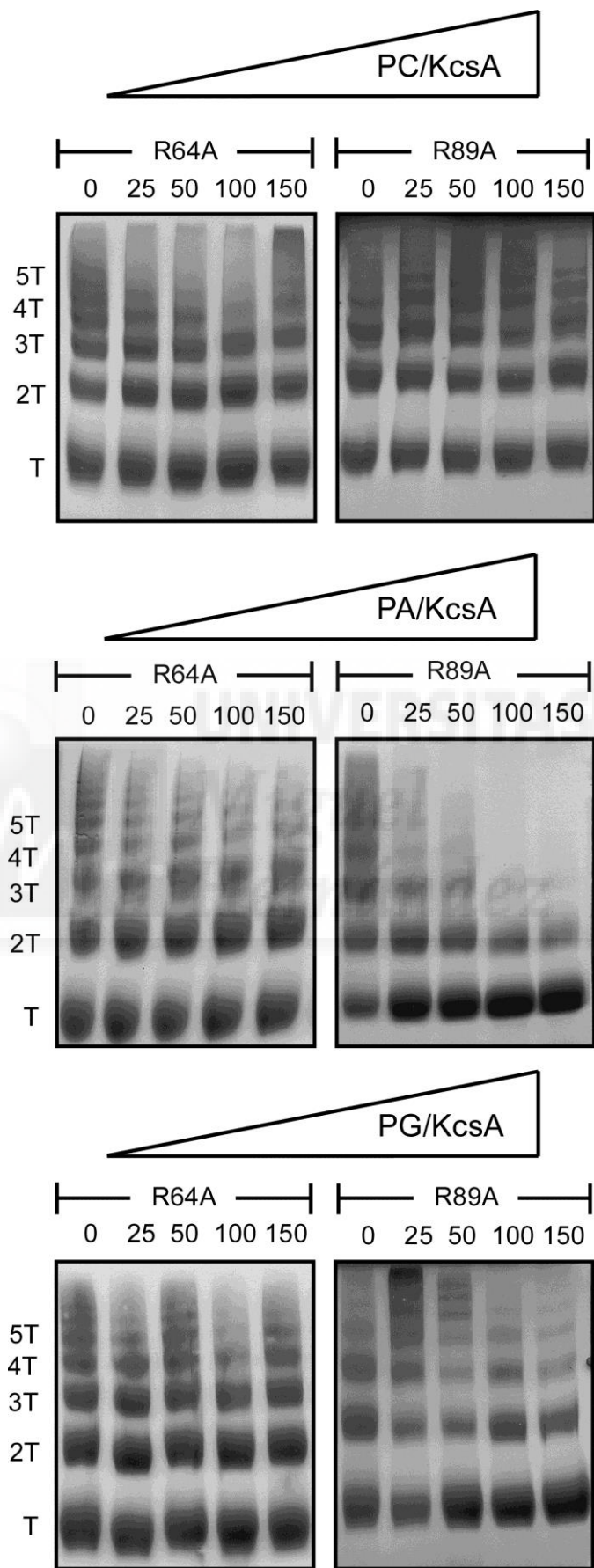
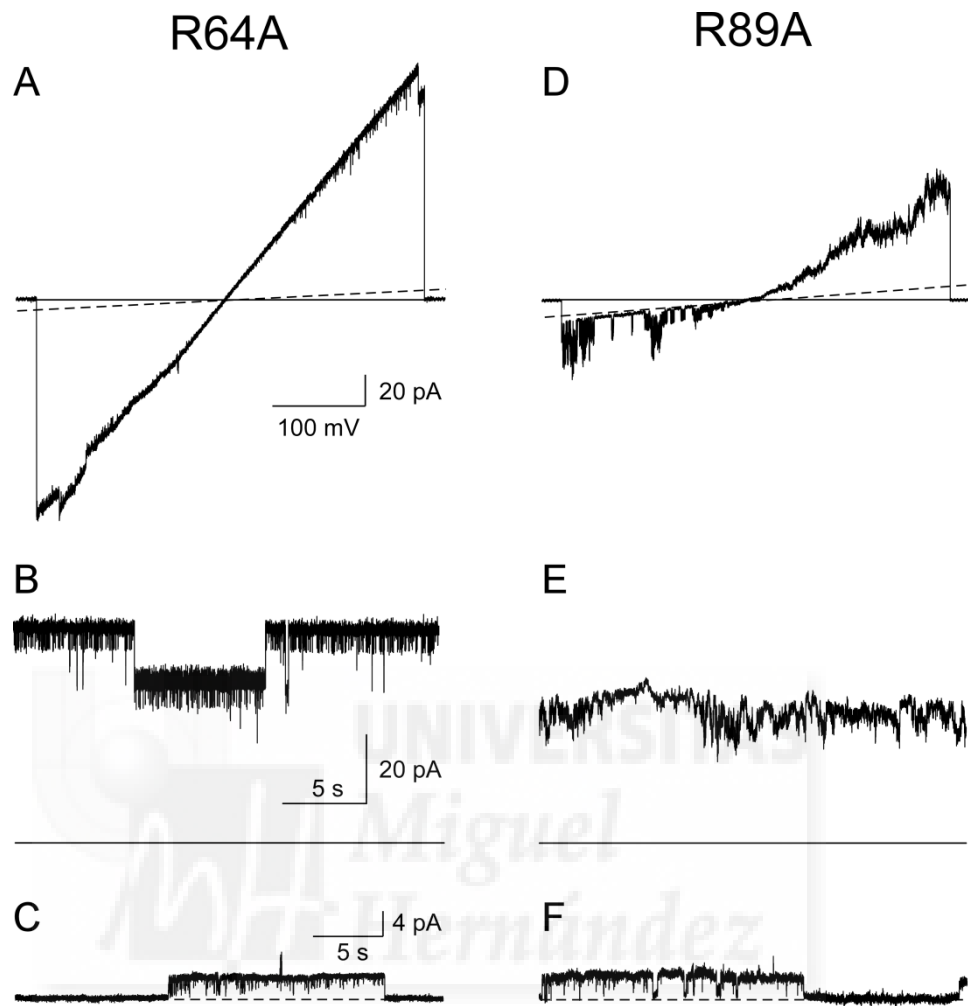
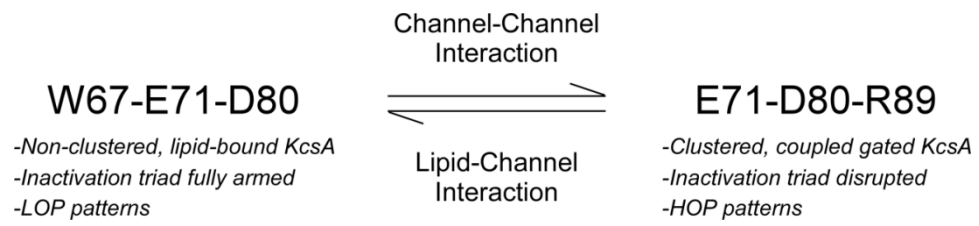


Figure 6



Scheme 1



A.4 Trabajo adicional

La línea de investigación desarrollada en este manuscrito, centrada en la modulación de la actividad y agrupación de KcsA por lípidos aniónicos, contiene datos suplementarios no incluidos en el artículo correspondiente que se incluyen en el apartado de Avances Relevantes. Además, como consecuencia de este estudio, se descubrió una posible nueva estrategia farmacológica de modulación funcional de canales basada en péptidos “anticluster” (manuscrito en preparación). Estos datos, pendientes de su publicación se resumen en el apartado de Avances Relevantes.





AVANCES RELEVANTES





AVANCES RELEVANTES

En este apartado se resumen los datos suplementarios y los avances más relevantes obtenidos durante y tras las publicaciones de los Capítulos de Resultados, dado que son importantes para poder interpretar correctamente los resultados o constituyen evidencias causa-efecto y pruebas adicionales que corroboran los resultados de esta Tesis Doctoral. Algunos de los Avances Relevantes forman parte de manuscritos en preparación o están pendientes de patente.

1- Avances en la caracterización de la actividad y agrupación de KcsA desarrollado en el Capítulo 1:

1) Se desarrolló una descripción más detallada de los diferentes patrones de actividad LOP y HOP importante para poder interpretar correctamente resultados posteriores. Así, algunas propiedades detalladas son:

(a) Ambos tipos de actividad LOP y HOP están compuestos por diferentes agrupaciones del canal unitario KcsA, que resulta ser un canal óhmico de 26 pS aprox. (Figura 1);

(b) Se compararon las propiedades de canal único que muestran canales independientes y canales acoplados en la actividad de tipo LOP, observándose que la probabilidad de apertura y su voltaje-dependencia son diferentes en canales acoplados y en canales independientes (no mostrado). Esto indica que el acoplamiento funcional entre los canales afecta a los aminoácidos implicados en la probabilidad de apertura y en la voltaje-dependencia de los canales;

(c) Se describe la dinámica de autoasociación de canales inducida por voltaje en los registros de tipo escalera ya que puede proporcionar indicios de los elementos esenciales que favorecen o permiten que se produzca el acoplamiento funcional entre canales. Así, los registros de tipo escalera muestran que la apertura de un nuevo nivel o canal requiere la presencia de una subconductancia asociada al acoplamiento funcional de los canales (no mostrado).

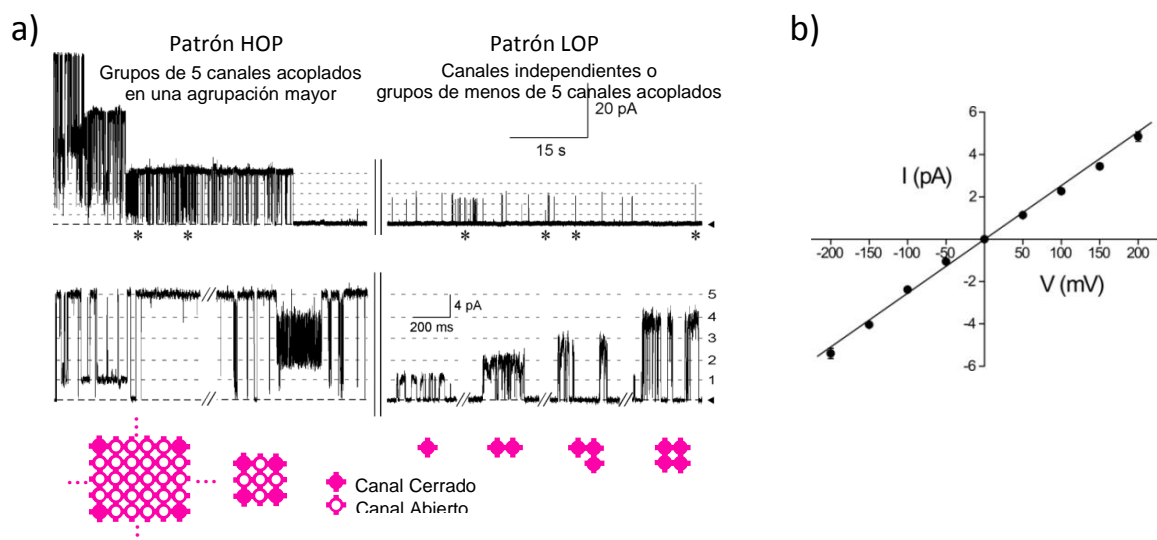


Figura 1. I-V de canal único real. Ambos tipos de actividad LOP y HOP-s están compuestas por el mismo tipo de canal unitario y se diferencian en el número de canales que están acoplados en su apertura. a) Comparación de registros LOP y HOP a +150 mV. Se señalan con asteriscos eventos del registro similares a los eventos ampliados debajo. En rosa se dibuja un esquema de las agrupaciones de canales que podrían dar lugar a la actividad observada. **b)** Curva I-V de canal único real obtenida a partir del promedio de las amplitudes mínimas de LOP y HOP (N = 19 sellos). Se ajusta a una recta de pendiente $m=0,026$ indicando que KcsA es un canal óhmico de 26 pS. Las barras de error standard están incluidas en los puntos.

2) Se estudió el efecto del pH en la actividad y agrupación de KcsA descubriéndose que la acidificación extracelular o intracelular modula la actividad de KcsA mediante el desacoplamiento funcional y físico de las agrupaciones de canales (no mostrado). Dado que los protones (H^+) tienen una importante función como neuromoduladores y neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central y Periférico, hay un especial interés en conocer el mecanismo de modulación de los H^+ en los diferentes canales y receptores. Se observó que la acidificación modula la actividad de KcsA mediante el desacoplamiento funcional y físico de las agrupaciones de canales y este mecanismo de modulación podría ser extrapolable a otros canales y receptores modulados por pH, dado que muchos de ellos están modulados por acoplamiento funcional entre canales agrupados (ver Tabla 6 del Apéndice). Dada la novedad y posible relevancia de estos resultados no fueron incluidos en la publicación Molina et al (2006) para ser incluidos en una publicación posterior (manuscrito en preparación).

3) Se estudió en detalle el bloqueo por sodio en LOP obteniéndose una IC_{50} de $6 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ ($n=5$) y se observó que está asociado al desacoplamiento funcional de los canales (no mostrado). En cambio, en HOP no bloquea y podría pasar por el filtro de selectividad. Estas y otras observaciones de selectividades alteradas (Meuser et al, 1999) no concuerdan con la conducción y selectividad de iones propuesta por el cristal de KcsA y muestran una flexibilidad del filtro de selectividad que podría depender de las interacciones entre los canales agrupados. Así, cambios en la estructura del anillo aromático del filtro de selectividad observada en canales agrupados podrían explicar los cambios de selectividad entre LOP y HOP (manuscrito en preparación).

2- Avances en el papel del N- y C-terminal de KcsA en su oligomerización y actividad desarrollado en el Capítulo 2:

1) Mediante mutagénesis dirigida se corroboró el modelo de tetramerización de la región C-terminal que proponemos en Molina et al (2004) y se revelaron dos etapas en el proceso de tetramerización que sugieren que el tetrámero de KcsA podría ser un dímero de dímeros.

2) Tal y como se anunció en Molina et al (2006), se determinó el papel del N- y el C-terminal en la agrupación y actividad acoplada de KcsA descubriéndose que:

(a) KcsA en ausencia del N- o del C-terminal continúa agrupándose y funcionando acopladamente indicando que los determinantes moleculares necesarios para la actividad acoplada están en la región transmembrana (no mostrado);

(b) La ausencia del C-terminal aumenta la frecuencia de las aperturas en la actividad de tipo LOP indicando que en canales individuales, los C-terminales interactúan entre sí estabilizando el estado cerrado de la actividad de tipo LOP, en concordancia con lo hallado por Perozo et al (1998) y por nosotros (Molina et al, 2004); en cambio, en la actividad de tipo HOP, la ausencia del C-terminal inestabiliza el estado abierto y el acoplamiento funcional indicando que cuando los canales están agrupados, los C-terminales interactúan con los canales adyacentes (no mostrado; manuscrito en preparación); y

(c) La alteración estructural del N-terminal en el mutante KcsA L5/12R impide la agrupación y el acoplamiento funcional entre canales y muestra actividad homogénea compuesta únicamente de aperturas de canales individuales y con baja Po. Esto demuestra que las agrupaciones de canales son responsables de la compleja actividad basada en el acoplamiento funcional entre canales de KcsA. Además, la ausencia de actividad con alta Po en ausencia de agrupaciones sugiere que la interacción entre canales induce la estabilización del estado abierto, indicando que el mecanismo de estabilización del filtro de selectividad en estado abierto podría estar asociado al mecanismo de acoplamiento funcional entre canales (no mostrado; manuscrito en preparación).

3- Avances en la modulación de la actividad y agrupación de KcsA por lípidos aniónicos desarrollado en el Capítulo 3:

1) Se obtienen datos suplementarios adicionales del efecto de lípidos aniónicos en cuanto a la formación de agrupaciones y en cuanto a su actividad:

(a) En cuanto a la formación de agrupaciones se comprobó el efecto de los lípidos aniónicos mediante entrecruzado con glutaraldehído de forma alternativa a los experimentos de “blue-native”. Mediante entrecruzado se detectaron los efectos detectados por el “blue-native”, corroborándolos, como que las agrupaciones se disocian con el aumento de la concentración de lípido aniónico, pero también se detectaron otros efectos adicionales, como que bajas concentraciones de lípidos aumentan la proporción y el tamaño de agrupaciones de KcsA en comparación a las presentes en KcsA solubilizado, y que las agrupaciones se disocian también con la longitud de los lípidos aniónicos (no mostrado).

(b) En cuanto al efecto sobre su actividad, se observó que la alta concentración de lípido aniónico, además de reducir la proporción de sellos con actividad de tipo HOP, aumenta el número de canales acoplados en las aperturas de tipo LOP, y la actividad de tipo HOP es más inestable frente al voltaje, llegando a transformarse ocasionalmente en actividad de tipo LOP tras la aplicación de rampas de voltaje sucesivas. Estas tres características de la actividad parecen estar asociadas entre sí como consecuencia de la disociación o reducción del tamaño de las agrupaciones.

3) Descubrimiento de una posible nueva estrategia farmacológica de modulación funcional de canales basada en péptidos anticluster. Resultados preliminares muestran que péptidos “anticluster” diseñados para interferir en la región de interacción entre canales de KcsA son capaces de disociar las agrupaciones y reducir la actividad de KcsA por desacoplamiento funcional de los canales (no mostrado). La amplia bibliografía existente de evidencias de agrupaciones entre canales, receptores y proteínas de membrana eucariotas (Lillemeier et al, 2006; Spira et al, 2012; TABLA 6) indica que estas interacciones podrían ser utilizadas como una nueva diana farmacológica. El desarrollo de péptidos anticluster específicos de cada canal, receptor o proteína de membrana es una posible nueva estrategia para el descubrimiento de fármacos (manuscrito en preparación), incluyendo posibles tratamientos específicos o como estrategias preventivas para evitar la propagación de las enfermedades neurodegenerativas así como aquellas que tengan que ver con la agregación de proteínas (como las cataratas o la Diabetes de tipo II).

4- Avances en el mecanismo de inactivación de KcsA por el péptido inactivante de *Shaker*, ShB, desarrollado en el Capítulo 4:

1) En el estudio de la inactivación de KcsA sin C-terminal por el péptido ShB se descubre un péptido activante de canales de potasio (pendiente de patente) que podría ser la base para el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades que cursan con hiperexcitabilidad celular (Figura 2). En KcsA wt y en el canal de potasio *Shaker* B se obtuvieron resultados similares, aunque en KcsA wt se necesitó mayor concentración de péptido y el efecto fue más transitorio, probablemente debido al impedimento estérico del C-terminal y el papel de éste último en la estabilización del estado cerrado del canal (no mostrado).

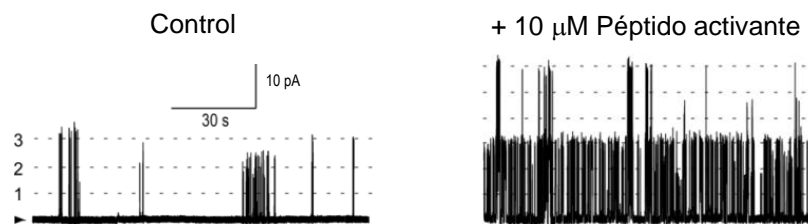


Figura 2. Hallazgo de un péptido activante de canales de potasio. Izquierda: Registro de KcsA Δ 125-160 a +200 mV en condiciones control (100 mM KCl, 10 mM Mes, pH 4 intracelular; 100 mM KCl, 10 mM Hepes, pH 7 extracelular). **Derecha:** registro del mismo sello tras la adición de 10 μ M de péptido activante en el baño (lado intracelular).

2) Se descubren dos etapas en el proceso de inactivación rápida por el péptido inactivante de *Shaker*, ShB: una etapa de activación previa a la inactivación que permite la proposición de una hipótesis detallada del mecanismo de inactivación rápida que podría ser extrapolado a sus homólogos eucariotas y que engloba todos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral (no mostrado). Los resultados del estudio de la inactivación rápida de KcsA por el péptido ShB sugieren que podría ocurrir de forma similar al conocido acoplamiento entre la activación y la inactivación de tipo C propuesto por Cuello et al (2010a y b) para KcsA y otros canales de potasio. Así, los resultados permiten plantear la hipótesis de un mecanismo de inactivación rápida basada en un acoplamiento activación e inactivación, donde los principios mecanísticos de la inactivación rápida en su propagación hacia el filtro de selectividad podrían ser los mismos que los observados en la inactivación de tipo C (Cuello et al, 2010a y b), es decir, a través de la F103 y provocando el desacoplamiento funcional de los canales, tanto en KcsA como en sus homólogos eucariotas (manuscrito en preparación).

DISCUSIÓN





1. Implicación del C-terminal en la tetramerización de KcsA

En el Capítulo 1 comprobamos el papel del C-terminal en la oligomerización del canal. Para ello, se realizaron diversas deleciones del C-terminal (KcsA 1-125, KcsA Δ 125-160, KcsA Δ 120-160 y KcsA Δ 115-160) y se obtuvo con sorpresa la ausencia de tetramerización en KcsA Δ 120-160, y más críticamente en ausencia de la secuencia 120-124, ERRGH, que forma parte de la región de hélices cruzadas del C-terminal (Molina et al, 2004). También se observó que la estabilidad del tetrámero de KcsA frente a su disociación por temperatura se incrementa tras la reconstitución en lípidos, incluso en ausencia del C-terminal.

En total, se han detectado diversas regiones implicadas en la tetramerización de KcsA a lo largo de todo el canal, desde la región más extracelular que incluye la Y82 del vestíbulo extracelular (Meuser et al, 2001), pasando por la región del filtro de selectividad (Meuser et al, 2001), la región de hélices cruzadas del C-terminal que incluye los aminoácidos 120-124 detectados por nosotros (Molina et al, 2004), y recientemente, aminoácidos hidrofóbicos de regiones más distales del C-terminal (Kamnesky et al, 2014).

En el canal de potasio eucariota activado por voltaje, *Shaker*, homólogo a KcsA, la tetramerización está mediada por el llamado T1 o primer dominio de tetramerización (Kreusch et al, 1998). Zerangue et al (2000) proponen que la tetramerización tiene lugar en un proceso de múltiples pasos en el que primero se produce una rápida tetramerización de la región T1, y luego implica a los dominios transmembrana de las subunidades de los canales compatibles con T1 en estrecha proximidad para permitir la plena tetramerización del canal.

En principio, las nociones anteriores parecen coherentes con nuestros descubrimientos sobre el ensamblaje tetramérico de KcsA, salvo que es el segmento C-terminal de KcsA el que parece desempeñar el papel del segmento N-terminal T1 de *Shaker*. Otros canales de potasio diferentes de *Shaker* tienen sus C-terminales implicados en tetramerización, como la familia EAG ("Ether-a-gogo"; Jenke et al, 2003) o los canales de potasio Kir (rectificadores de entrada; Tinker et al, 1996).

El modelaje molecular de KcsA predice que la secuencia 120-124 del C-terminal de cada monómero de KcsA puede formar hasta 5 puentes de hidrógeno con aminoácidos del N- y C-terminal de subunidades adyacentes (Molina et al, 2004). Una de las interacciones más fuertes que predice dicho modelo es la interacción por puente de hidrógeno entre los aminoácidos E118 y R121 de subunidades adyacentes, dado que soporta 3 de las 5 interacciones predichas por el modelo. Posteriormente se comprobó que, efectivamente, la eliminación de dichas interacciones en el doble mutante KcsA E118C-R121C impide la tetramerización confirmando la predicción del modelo descrito en Molina et al (2004) y, en cambio, forma dímeros lo que sugiere que el tetrámero de KcsA podría ser un dímero de dímeros revelando dos etapas en el proceso de tetramerización (no mostrado).

Multitud de canales y receptores eucariotas se ensamblan como dímero de dímeros aunque el mecanismo de tetramerización se desconoce (Salussolia et al, 2013; Saedi et al., 1991; Blount et al., 1990; Green and Claudio, 1993; Doms et al., 1993; Tu and Deutsch, 1999) y los resultados obtenidos aquí pueden ofrecer luz en el mecanismo de biogénesis y tetramerización de canales y receptores eucariotas.

Recientemente, estudios de simulaciones de dinámica molecular muestran que estructuras tetraoligoméricas de haces helicoidales embebidas en una bicapa lipídica son más estables en estructuras compuestas por “dímero de dímeros” con un mínimo de dos contactos hidrofílicos fuertes entre un par de hélices adyacentes en el sistema de dímero a tetrámero, y sugieren que estos resultados son aplicables a estructuras más complejas de canales iónicos, proporcionando información sobre la estabilidad y ensamblaje de canales iónicos (Nquyen et al, 2013).

2. Hallazgo de una gran capacidad de modulación de la actividad de KcsA basada en el acoplamiento funcional de los canales

Cuanto más aprendemos sobre las distintas familias de los canales iónicos, más nos damos cuenta de que sus respuestas funcionales son a veces exquisitamente dependientes de las interacciones moleculares que realizan entre los mismos canales o con otros componentes celulares, cuyo papel en la regulación de los canales no puede ser siempre anticipado a partir de la caracterización “in vitro” de los canales purificados.

En el Capítulo 2 presentamos el hallazgo de una gran capacidad de modulación de la actividad de KcsA basada en la agrupación y el acoplamiento funcional de los canales, y se clasifica en dos principales patrones de actividad muy diferentes: LOP (del inglés “Low Open Probability pattern”) y HOP (del inglés “High Open Probability pattern”) (Molina et al 2006). Estos resultados podrían reconciliar la controversia existente en la diferente caracterización funcional de KcsA descrita previamente por otros grupos de investigación (grupo de Miller versus grupo de Schrempf).

El patrón LOP es el que se observa con más frecuencia en esta Tesis Doctoral y probablemente representa el modo más simple de agrupaciones de KcsA dado que sólo se detectan aperturas desde un canal individual hasta cuatro canales acoplados, siendo más frecuente las aperturas de dos canales acoplados. Las características del patrón LOP, es decir, muy baja probabilidad de apertura, activada por pH ácido, selectividad moderada por potasio y bloqueo por sodio coinciden esencialmente con los publicados previamente para KcsA reconstituida en bicapas planas (Meuser et al, 1999; Heginbotham et al, 1999; LeMasurier et al, 2001; Cuello et al, 1998). Tal equivalencia aparente parece coherente con los resultados aquí obtenidos debido a que la concentración de proteína que se incorpora en bicapas planas suele ser muy baja, y por lo tanto, el equilibrio de las agrupaciones con la concentración de proteínas debe estar desplazada a favorecer las agrupaciones más pequeñas. De hecho, las condiciones de baja concentración de proteína utilizadas en dichas condiciones de registro favorecen la aparición de actividad de tipo LOP (Chakrapani et al, 2007). Cabe destacar, sin embargo, que el evento predominante que se encuentra en nuestros patrones LOP corresponde al acoplamiento funcional de dos canales de KcsA y que la conductancia estimada es prácticamente idéntica a la publicada como la conductancia de un solo canal en bicapas planas (véase por ejemplo, LeMasurier et al, 2001). Por lo tanto, parece probable que fenómenos de acoplamiento similares podrían servir para explicar resultados previos (y discrepancias posteriores) sobre múltiples niveles de conductancia descritos ocasionalmente para KcsA (Schrempf et al, 1995; Meuser et al, 1999; Cuello et al, 1998; Meuser et al, 2001).

Se han detectado diferentes patrones de actividad de tipo HOP (sigmoïdal simétrica, rectificadora de entrada y en escalera) y, además de su característica de alta probabilidad de apertura de los canales, todos ellos tienen en común eventos de múltiples canales acoplados, agrupaciones grandes frecuentemente formadas a su vez por grupos de cinco canales acoplados que actúan de forma sincrónica dentro de la agrupación mayor, con apertura de los canales a pH neutro y pH ácido. Independientemente del número de canales acoplados en las aperturas de los patrones de tipo HOP, la amplitud de apertura mínima detectada parece idéntica a la observada en el patrón LOP, lo que sugiere que se utilizan las mismas unidades de construcción ("building blocks") en todas las posibles agrupaciones de KcsA, independientemente de su complejidad y comportamiento. Posteriormente a la publicación Molina et al (2006), la observación de que ambos tipos de actividad LOP y HOP están formados por unidades acopladas del mismo canal, nos llevó a determinar la curva I-V de canal único real teniendo en cuenta únicamente la amplitud mínima de las aperturas registradas obteniéndose que el canal individual es un canal óhmico con una conductancia única de 26 pS aproximadamente (Figura 1 de Avances Relevantes). Por tanto, las curvas I-V de amplitud de canal único aparente en LOP y HOP publicadas en Molina et al (2006) corresponden en realidad al promedio de canales acoplados en función del voltaje.

Las diferentes curvas I-V obtenidas en LOP y HOP indican que el acoplamiento funcional entre los canales podría afectar a los aminoácidos implicados en la probabilidad de apertura y en la voltaje-dependencia de los canales. De hecho, se compararon las propiedades de canal único que muestran canales independientes y canales acoplados en la actividad de tipo LOP, observándose que la probabilidad de apertura y su voltaje-dependencia son diferentes en canales acoplados y en canales independientes (no mostrado).

Por otra parte, debido a que las publicaciones existentes sobre la agrupación de canales muestran que a menudo se acompaña de acoplamiento funcional y de modulación de la actividad, nosotros interpretamos nuestro múltiple acoplamiento funcional y la mayor probabilidad de apertura en los patrones de tipo HOP como una consecuencia directa de la agrupación. De hecho, el patrón de actividad HOP de tipo escalera muestra cómo el número de canales abiertos en un determinado parche aumenta drásticamente durante el tiempo y la aplicación de voltaje, probablemente como consecuencia de la agrupación de los canales existentes en el parche. Existen otros canales en la bibliografía que muestran también actividad cooperativa entre canales con registros de tipo escalera, como los canales HCN (Dekker and Yellen, 2006).

Los registros de tipo escalera pueden proporcionar indicios de los elementos esenciales que favorecen o permiten que se produzca el acoplamiento funcional entre canales. En este sentido, una descripción más detallada de la dinámica de autoasociación de canales en los registros de tipo escalera muestra que la apertura de un nuevo nivel o canal requiere la presencia de una subconductancia (no mostrado). Esta subconductancia podría corresponder a cambios conformacionales o a interacciones entre los canales que hacen al canal capaz de abrirse. Existen precedentes similares en la bibliografía, como el receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) que también funciona en grupos acoplados funcionalmente y la formación de grupos de receptores de IP_3 requiere su transición al estado abierto (Tateishi et al, 2005). No sabemos si esto también podría ser el caso de KcsA pero, sin duda, un mecanismo similar podría explicar tal actividad.

En cuanto al cambio de sensibilidad al pH, nuestras observaciones en la actividad de tipo HOP tiene precedentes dado que se observó apertura de KcsA a pH neutro cuando simplemente se somete a un gradiente iónico transmembrana (Schrempf et al, 1995; Zakharian y Reusch, 2004a). Más sorprendentemente, el canal KcsA con actividad de tipo HOP parece haber perdido la capacidad de ser bloqueado por Na^+ , característica que se observa solamente en la actividad de tipo LOP. Tal hallazgo aparentemente controvertido, sin embargo, podría estar relacionado con las publicaciones existentes sobre una selectividad iónica y otras propiedades de KcsA alteradas cuando se reconstituye en diferentes condiciones (Schrempf et al, 1995; Meuser et al, 1999; Zakharian y Reusch, 2004b) o cuando se somete a tensiones extremas en bicapas planas (Nimigeay y Miller, 2002). También el receptor de IP_3 cambia sus propiedades cuando se agrupa (Rahman et al, 2009) y ocurre de forma similar en muchos otros canales y receptores, que muestran propiedades de gating diferentes cuando están agrupados (ver Tabla 6 del Apéndice).

3. El funcionamiento acoplado de los canales se correlaciona con la capacidad de agrupación de KcsA

El funcionamiento acoplado hallado en KcsA debería corresponderse con la observación de agrupaciones que expliquen el acoplamiento funcional de los canales y la observación experimental cumple con esa expectativa ya que, efectivamente, se detectan distintas agrupaciones de KcsA.

En el Capítulo 1 se demuestra el ensamblaje de KcsA en grupos de diferentes tamaños en solución de detergente y en vesículas lipídicas por diferentes metodologías que incluyen ultracentrifugación analítica, imagen de microscopía de fluorescencia mediante confocal, anisotropía de fluorescencia de KcsA marcada con Alexa 546, y resonancia de fluorescencia por transferencia de energía usando el par donador-aceptor Alexa 546 y Alexa 647 unido a KcsA. Mediante todas estas metodologías se comprobó que KcsA tiene una tendencia intrínseca a ensamblarse en grupos supramoleculares (Molina et al, 2006). Posteriormente, mediante métodos electroforéticos más simples como el BN-PAGE, PFO-PAGE y SDS-PAGE de KcsA entrecruzada, se comprobó que las agrupaciones de KcsA son predominantes frente al canal individual cuando se reconstituye en membranas lipídicas y se demostró así mismo la presencia de agrupaciones de KcsA *in vivo* en la membrana de *E coli* (Giudici et al, 2013).

De forma adicional se observó que tales agrupaciones parecen estar formadas a partir del canal tetramérico individual KcsA (T) y de dímeros de canales (2T) como los bloques de construcción elementales a través de los cuales se forman los grupos más grandes, que se ensamblan en un proceso reversible que no necesita la adición de lípidos ni de una membrana lipídica (Giudici et al, 2013). Ocurre de forma similar en VDAC donde los dímeros parecen ser los bloques de construcción de las agrupaciones más grandes (Ujwal et al, 2009).

Las agrupaciones de KcsA se disocian con detergente, principalmente hasta el canal tetramérico (T) dependiendo del tipo de detergente y del tratamiento. Por el contrario, el canal tetramérico es extremadamente resistente a los detergentes y otros agentes desnaturalizantes de proteínas (Valiyaveetil et al, 2002) y, por lo tanto, el canal tetramérico de KcsA podría considerarse un producto final "artefactual" de todos los tratamientos basados en detergentes, incluidos los

utilizados en la solubilización y purificación de la proteína a partir de lisados bacterianos. Esa es la razón por la que KcsA purificada en SDS-PAGE muestra el tetrámero (T) como el componente principal (Molina et al, 2004 y 2006; Heginbotham et al, 1997; Cortes y Perozo, 1997; Giudici et al, 2013). De hecho, la disociación por detergente de las agrupaciones de KcsA también constituye un inconveniente en las técnicas electroforéticas utilizadas aquí, ya que todas ellas utilizan detergente. En este respecto, se ha observado que el SDS es particularmente perjudicial para las interacciones entre los canales que sostienen la agrupación porque la disocia fácilmente, y el DDM o incluso el PFO, aunque también son perjudiciales, lo son en menor medida. Por lo tanto, los tamaños y la proporción estimada de agrupaciones de KcsA están probablemente subestimados debido a la disociación parcial inducida por detergente.

Por otro lado, existen multitud de evidencias de canales y receptores que concuerdan bien con la regulación de la actividad que se propone aquí. De acuerdo a observaciones en receptores de membrana, las agrupaciones en las que la actividad de uno de los receptores influencia el de sus vecinos, los cambios conformacionales originados en una molécula se propagan transformándose en un comportamiento alostérico intermolecular de toda la agrupación (Bray and Duke, 2004). De hecho, algunos de los mejores casos caracterizados en este sentido muestran que la actividad acoplada o cooperativa necesita y depende de la agrupación de los canales. Por ejemplo, los receptores de rianodina, canales de liberación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético y cardíaco, forman redes que muestran acoplamiento funcional como un importante mecanismo de regulación en el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción (Marx et al, 1998 y 2001; Laver et al, 2004). Otros casos en los que la agrupación y el acoplamiento funcional afectan la actividad del canal incluyen los receptores quimiotácticos procariontas (Skoge et al, 2006), los canales de potasio rectificadores de entrada de células gliales, Kir 4.1 (Horio et al, 1997), los canales de potasio activados por voltaje neuronales, Kv2.1 (Misonou et al, 2004 y 2005), los canales de cloruro reguladores de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, CFTR (Krouse y Wine, 2001), los receptores de acetilcolina (Schindler et al, 1984; Huh y Fuhrer, 2002; Keleshian et al, 2000), los receptores de serotonina (Herrick-Davis et al, 2005), el receptor de IP3 (Tateishi et al, 2005; Rahman et al 2009), el canal aniónico activado por voltaje de la membrana externa mitocondrial (VDAC; Manella et al, 1983), los canales iónicos activados por ATP como los P2X (Fujiwara y Kubo, 2004), la familia de los receptores acoplados a proteínas G, GPCR (Rios et al, 2001), incluyendo los P2Y (Lee y O'Grady, 2003) o la rodopsina (Mansoor et al, 2006), e incluso los canales de sodio responsables de la generación de los potenciales de acción neuronales (Naundorf et al, 2006). Estos y muchos más se incluyen en la Tabla 6 del Apéndice.

En este punto merece destacar el sorprendente hallazgo de que la dinámica de iniciación del potencial de acción observada en neuronas corticales de mamífero (su rápida iniciación y potenciales de inicio variables) está fuera del rango de comportamientos descritos por la teoría clásica de Hodgkin y Huxley que parte de la suposición de un comportamiento independiente de los canales de sodio (Naundorf et al, 2006); en cambio, un nuevo modelo basado en un comportamiento cooperativo de los canales de sodio reproduce la dinámica de iniciación del potencial de acción observada y experimentos in vitro confirman esta predicción, apoyando la hipótesis de que la dinámica de la iniciación del potencial de acción en las neuronas corticales se produce por la activación acoplada de los canales de sodio (Naundorf et al, 2006). Sin embargo, los detalles sobre la

naturaleza y los mecanismos implicados en la regulación de los procesos de ensamblaje/desensamblaje de estas agrupaciones biológicamente relevantes siguen siendo en gran parte desconocidos, y los datos que ofrece KcsA en esta Tesis Doctoral aportan luz en este tema.

La formación de agrupaciones de canales iónicos en íntimo contacto y su funcionamiento acoplado o cooperativo parece una estrategia razonable para garantizar una eficiente y óptima vía de señalización mediada por canales iónicos en respuesta a los estímulos apropiados.

Sin embargo, cabe señalar que nuestras observaciones “in vitro”, probablemente, corresponden a procesos de agrupación desregulados porque las posibles moléculas de anclaje necesitadas “in vivo”, en su caso, no estarían presentes en nuestras preparaciones purificadas de KcsA. En KcsA en particular se ha publicado que polifosfatos (PoliP) y polihidroxibutirato (PHB), que son materiales de reservorio abundantes en las células procariotas, interaccionan con KcsA formando complejos para la conducción de iones (Zakharian y Reusch, 2004b; Reusch, 1999). El equivalente en células eucariotas podrían ser los dominios PDZ, dado que son parte importante del sistema de anclaje molecular que no solamente posiciona correctamente unos canales o receptores con otros, sino que además, al hacerlo modula su actividad (Bezprozvanny y Maximov, 2001). Por lo tanto, los PoliP y PHB o compuestos similares, como alternativos procariotas a los dominios PDZ u otras proteínas de anclaje observados en la agrupación de otros canales (Marx et al, 2001; Raghuram et al, 2001; Marx et al, 1998), podrían proporcionar una pista sobre dónde buscar posibles moléculas inductoras, inhibidoras, estabilizantes, o capaces de modular la formación de agrupaciones. Hasta ahora, sin embargo, parece razonable suponer que la agrupación de KcsA, el funcionamiento acoplado, y la alta probabilidad de apertura de los canales a pH neutro característico de la actividad de tipo HOP puede ser más biológicamente significativo que la visión actualmente establecida para KcsA consistente en muy baja probabilidad de apertura y sólo a pH intracelular muy ácido, característico de la actividad de tipo LOP.

De hecho, también se comprobó que la acidificación extracelular o intracelular disocia las agrupaciones y desacopla funcionalmente los canales de KcsA (no mostrado). Generalmente se piensa que los protones tienen efectos inespecíficos transitorios debido a su propiedad de elevada difusión y a la existencia de amplios mecanismos tamponantes. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que los protones, bajo circunstancias muy concretas, podrían actuar como moléculas de señalización para procesos celulares específicos (Almanza et al, 2008). Por ello, y debido a que los protones ejercen multitud de acciones que afectan a la excitabilidad celular, se ha propuesto que los protones extracelulares conforman un sistema de señalización intercelular con una importante función como neuromoduladores, e incluso como neurotransmisores, en el Sistema Nervioso Central y Periférico (Mercado et al, 2005) y hay un especial interés en conocer el mecanismo de modulación de los protones en los diferentes canales y receptores.

En este sentido, se observó que la acidificación modula la actividad de KcsA mediante el desacoplamiento funcional y físico de las agrupaciones de canales. Este mecanismo de modulación podría ser extrapolable a otros canales y receptores modulados por pH, dado que muchos de ellos están modulados por acoplamiento funcional entre canales agrupados (ver Tabla 6 del Apéndice). Dada la novedad y posible relevancia de estos resultados no fueron incluidos en la publicación Molina et al (2006) para ser incluidos en una publicación posterior (manuscrito en preparación).

4. Importancia de la ratio lípido/proteína en la obtención de diferentes patrones de actividad

Se han detectado agrupaciones de KcsA "in vivo" (Hegermann et al, 2006) y, de hecho, podrían ser las responsables de los complejos patrones de actividad de este canal (Schrempf et al, 1995; Meuser et al, 1999). Sin embargo, el ensamblaje de grupos "in vitro" tras la reconstitución de la membrana de preparaciones purificadas de KcsA es un fenómeno dependiente de la concentración de proteína (Molina et al, 2006) y por lo tanto, las condiciones experimentales utilizadas en la reconstitución por los diferentes autores, en particular las relaciones de lípido/proteína utilizada que varía en más de un orden de magnitud, podrían influir en gran medida en la aparición de agrupaciones y en sus consecuencias funcionales.

De hecho, existe una clara correlación entre las diferentes relaciones molares lípido/proteína (L/P) utilizadas por diferentes autores en la reconstitución lipídica de KcsA y el tipo de actividad observada (LOP o HOP) y sus propiedades de selectividad. Cuanto mayor es la relación molar L/P en la reconstitución, mayor es la probabilidad de obtener actividad de tipo LOP y mayor es la selectividad K^+/Na^+ . Así, mediante extracción de protoplastos de *Streptomyces* y adición posterior de asolectina (1:1 en volumen) en ausencia de detergentes se obtiene actividad similar a nuestra actividad de tipo HOP y una extremadamente baja selectividad K^+/Na^+ de sólo 3 (Schrempf et al, 1995). En nuestras condiciones de reconstitución estándar se emplea una relación molar muy baja L/P 500 (Molina et al, 2006), que permite obtener aproximadamente un 50% de cada tipo de actividad (LOP y HOP), y obtenemos que el sodio bloquea en LOP pero no en HOP estando por determinar su tasa de permeabilidad K^+/Na^+ . Con relaciones molares intermedias como la L/P 2500 utilizada por el grupo de Schrempf en Meuser et al (1999) se obtiene actividad con propiedades intermedias entre LOP y HOP y una selectividad K^+/Na^+ de 11. En cambio, cuando utilizamos una mayor relación molar L/P 10000 (L/P 100 en peso) para los registros de corrientes macroscópicas de KcsA wt (no mostrado), así como con relaciones molares L/P muy elevadas como el rango de 100000-250000 utilizado por el grupo de Miller en LeMasurier et al (2001) o el grupo de Perozo (Chakrapani et al, 2007), se obtiene principalmente actividad de tipo LOP y una elevada selectividad $K^+/Na^+ >150$.

En nuestras preparaciones de liposomas gigantes utilizamos una elevada relación lípido/proteína, en torno a L/P 50000, pero teniendo en cuenta que en la reconstitución previa a la formación de L.G. utilizamos una relación molar L/P de 500, se hace evidente que la afinidad de KcsA por asociarse con otros canales KcsA para formar agrupaciones es mucho más alta que el de unir los fosfolípidos contenidos en la bicapa y, por tanto, la formación de agrupaciones debe estar favorecida bajo nuestras condiciones experimentales.

Por tanto, los resultados aquí obtenidos podrían reconciliar la controversia previa observada por diferentes grupos de investigación en la caracterización de la actividad de KcsA, dado que las diferentes condiciones de reconstitución de la proteína hace que unos investigadores obtengan la proteína más disociada dando actividad principalmente de tipo LOP, mientras que otros investigadores obtienen la proteína más agrupada dando principalmente actividad de tipo HOP, con sus diferentes propiedades.

5. Determinantes moleculares implicados en la oligomerización y agrupación de KcsA

El hallazgo de que KcsA, uno de los canales iónicos estructuralmente más simples, muestre un comportamiento complejo basado en la agrupación y el acoplamiento funcional refuerza la idea de que las agrupaciones supramoleculares de los canales iónicos y las interacciones que las mantienen unidas pueden ser más importantes de lo que originalmente se había pensado para la comprensión de los procesos biológicos que median. En tal empeño, KcsA puede ser de nuevo un excelente modelo para identificar los motivos estructurales responsables de las interacciones entre los canales que posibilitan las agrupaciones, así como para establecer los mecanismos por los que estas interacciones conducen al acoplamiento funcional entre los canales.

La agrupación dependiente de la concentración en soluciones de proteínas y coloides se ha atribuido a una combinación de fuerzas atractivas de corto alcance y fuerzas repulsivas electrostáticas de largo alcance (Stradner et al, 2004). Los N- y C-terminales de KcsA son ricos en aminoácidos con carga, y por lo tanto, parecen candidatos potenciales para actuar como determinantes moleculares importantes para la formación de agrupaciones y el comportamiento acoplado.

En cuanto a los posibles dominios de KcsA implicados en la agrupación, nos ofrecen información los efectos del SDS que publicamos previamente. Anteriormente publicamos que el SDS se une a sitios "no anulares" entre las subunidades de la proteína estabilizando la estructura tetramérica de los canales de KcsA individuales (Triano et al, 2010). Las interacciones hidrofóbicas parecen ser críticas, ya que se necesitan cadenas acílicas de 9 a 14 carbonos (C9 a C14) para la estabilización (Triano et al, 2010). En el Capítulo 3, mediante BN-PAGE también encontramos que se necesita una cadena acílica mayor de ocho átomos de carbono para desestabilizar las agrupaciones de KcsA (Giudici et al 2013) mostrando un antagonismo claro entre i) la capacidad del SDS para unirse a los sitios no anulares y estabilizar la estructura tetramérica de KcsA y ii) su capacidad para desestabilizar las agrupaciones.

De estos estudios se concluye que los sitios no anulares median interacciones entre canales implicadas en la formación de agrupaciones y que la unión de moléculas en tales sitios disocia las agrupaciones. La observación de moléculas de lípido cristalizadas en los sitios no anulares de KcsA sugiere que también las moléculas de lípido podrían disociar las agrupaciones de KcsA.

Como apoyo a estas conclusiones, se comprobó que KcsA en ausencia del N- o del C-terminal continúa agrupándose y funcionando acoplado, tanto en LOP como en HOP, tras la reconstitución en lípidos, indicando que los determinantes moleculares necesarios para la actividad acoplada están en la región transmembrana, donde se sitúan los sitios no anulares (ver Avances Relevantes).

6. Modulación de la actividad y agrupación de KcsA por lípidos aniónicos

6.1 El exceso de lípidos aniónicos disocia las agrupaciones y desacopla funcionalmente los canales de KcsA

Estudios funcionales de KcsA comprobaron que el fosfolípido negativo es necesario para la actividad de KcsA (Heginbotham et al., 1998). Dado que la actividad de KcsA se modula por acoplamiento funcional entre canales y su agrupación macromolecular (Molina et al, 2006), se decidió estudiar si los fosfolípidos aniónicos eran capaces de modular la agrupación macromolecular de KcsA y su acoplamiento funcional.

Tanto "in vivo" (Hegermann et al, 2006) como "in vitro" (Molina et al, 2006; Giudici et al, 2013; Raja y Vales, 2009; Seeger et al, 2009), KcsA se ensambla en grupos supramoleculares, que son probablemente las formas predominantes en las que este canal está presente en las membranas bacterianas (Molina et al, 2006; Giudici et al, 2013). En el Anexo mostramos que, tanto en un sistema micelar mixto compuesto por lípido y detergente como en bicapas lipídicas (soportadas sobre mica), la presencia de fosfolípidos aniónicos modula el ensamblaje y desensamblaje de dichas agrupaciones de KcsA. Así, bajas proporciones de fosfolípidos aniónicos permiten la asociación de KcsA en grupos, mientras que altas concentraciones producen la disociación de los grupos. Por otra parte, tales condiciones de alta o baja proporción de fosfolípidos aniónicos en liposomas gigantes que contienen KcsA, aumenta la frecuencia de aparición de los patrones de actividad de tipo LOP o de tipo HOP, respectivamente, en los registros de patch-clamp. Por lo tanto, los efectos de los fosfolípidos aniónicos en el ensamblaje y desensamblaje de las agrupaciones y en la aparición de patrones de actividad de tipo HOP y LOP son aparentemente correlativos y sugieren que la actividad de tipo HOP surge a partir de grupos grandes de canales, mientras que la actividad de tipo LOP se origina principalmente a partir de canales de KcsA principalmente no agrupados que interactúan con fosfolípidos. Cabe señalar aquí que las variables experimentales tales como la presencia de detergente, lípidos así como la ratio lípido/proteína utilizados en la reconstitución, influyen en gran medida en el ensamblaje de las agrupaciones de KcsA y, por lo tanto, la comparación de los resultados de las diferentes aproximaciones experimentales utilizadas aquí sólo se debe hacer en términos cualitativos.

En cuanto a la formación de agrupaciones, se comprobó el efecto de los lípidos aniónicos mediante entrecruzado con glutaraldehído (no mostrado) de forma alternativa a los experimentos de "blue-native" mostrados en el Anexo (Molina et al, enviado), debido a que ésta metodología podría alterar las agrupaciones por la solubilización parcial en detergente que sufren las muestras, mientras que el entrecruzado es una sencilla metodología ampliamente utilizada que detecta agrupaciones de proteínas en membranas intactas sin solubilizar. Por una parte, el entrecruzado confirmó los efectos de los lípidos aniónicos en las agrupaciones de KcsA detectados por el "blue-native", dado que también detectó que las agrupaciones se disocian con el aumento de la concentración de lípido aniónico (no mostrado); y por otra parte, detectó también otros efectos adicionales que la metodología de "blue-native" impide detectar (probablemente por la solubilización de las muestras en el detergente DDM). Se detectó que bajas concentraciones de lípidos aniónicos aumentan la proporción y el tamaño de las agrupaciones de KcsA en comparación a las presentes en KcsA

solubilizado, así como en comparación a las presentes en asolectina (no mostrado). Esto concuerda con el aumento de la proporción de sellos con actividad de tipo HOP a baja concentración de lípido aniónico con respecto a la obtenida en asolectina.

En cuanto al efecto sobre su actividad, de forma adicional a lo mostrado en el Anexo (Molina et al, enviado), se observó que la alta concentración de lípido aniónico, además de reducir la proporción de sellos con actividad de tipo HOP, aumenta la frecuencia de aperturas y el número de canales acoplados en las aperturas de tipo LOP, y la actividad de tipo HOP es más inestable frente al voltaje, llegando a transformarse ocasionalmente en actividad de tipo LOP tras la aplicación de rampas de voltaje sucesivas (no mostrado). Estas tres características de la actividad también aparecen en KcsA sin C-terminal y parecen estar asociadas entre sí como consecuencia de la disociación o reducción del tamaño de las agrupaciones.

El aumento de la frecuencia de aperturas y del número de canales acoplados en las aperturas de tipo LOP causa un incremento en la probabilidad de apertura y en la corriente total de este tipo de sellos similar a la obtenida por otros autores (Weingarh et al, 2013; Iwamoto and Oiki, 2013; Marius et al, 2008) en el estudio del papel de los lípidos aniónicos en el aumento de la actividad del canal. Sin embargo, este efecto de los lípidos aniónicos en el incremento de la actividad de tipo LOP es insignificante en comparación con la reducción de la actividad de tipo HOP, y globalmente, resulta en un descenso de la corriente.

6.2 La competencia de las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína en el sitio no anular determina la agrupación y el acoplamiento funcional de KcsA

El efecto del aumento de la concentración de los lípidos aniónicos en la disociación de las agrupaciones y el desacoplamiento funcional de la actividad de KcsA se explica cuando modelamos al canal KcsA interactuando con lípidos aniónicos, o bien, con otro canal (Anexo y Figura 1). Afortunadamente, los modelos de interacción están parcialmente documentados por datos de cristalografía de rayos X en ambos casos, en el complejo fosfolípido aniónico-KcsA por la propia estructura cristalizada de KcsA (Zhou et al, 2001), y en la interacción entre canales por un transportador de K^+ de estructura similar a KcsA, TrkH, que cristaliza como dímero (Cao et al, 2011), proporcionando un apoyo experimental a nuestros modelos.

Existen múltiples evidencias de que los sitios no anulares del canal KcsA individual interactúan con lípidos aniónicos, y nosotros hemos modelado dicha interacción en KcsA utilizando los datos cristalográficos, con la puerta intracelular cerrada, como se muestra en el Anexo (Figura 1A). Además, aunque no se incluyó en el artículo, también modelamos dicha interacción en KcsA con la puerta intracelular abierta, que simula una apertura de KcsA pH-dependiente que caracteriza la actividad de tipo LOP (Figura 1b). Para ello, se modeló KcsA en la estructura del canal de potasio MthK (Molina et al, 2008), que muestra la flexión o “bending” de la región intracelular del M2 (flecha en Figura 1B) detectada en la apertura del canal individual inducida por el pH (Jiang et al, 2002; Cuello et al, 2010).

Por otro lado, se modeló la interacción de dos KcsA abiertos simulando canales acoplados estructuralmente como los componentes de una agrupación de múltiples canales, pero se modeló sólo la interacción entre dos canales para mayor claridad. Tal y como se describe en el Anexo, se proponen dos modelos de interacción entre canales, uno obtenido mediante “docking” entre canales de KcsA (Figura 1C) modelados con la puerta intracelular abierta (Molina et al, 2008) y otro por superposición con el dímero cristalizado del transportador de potasio, TrkH (Figura 1D). Como resultado se obtuvo que, en ambos modelos, los canales encajan perfectamente uno con otro y la zona de interacción incluye la zona no anular de ambos canales, que en canales individuales interacciona con el lípido aniónico, de forma que la interacción entre canales es incompatible con la presencia de lípido aniónico en el sitio no anular.

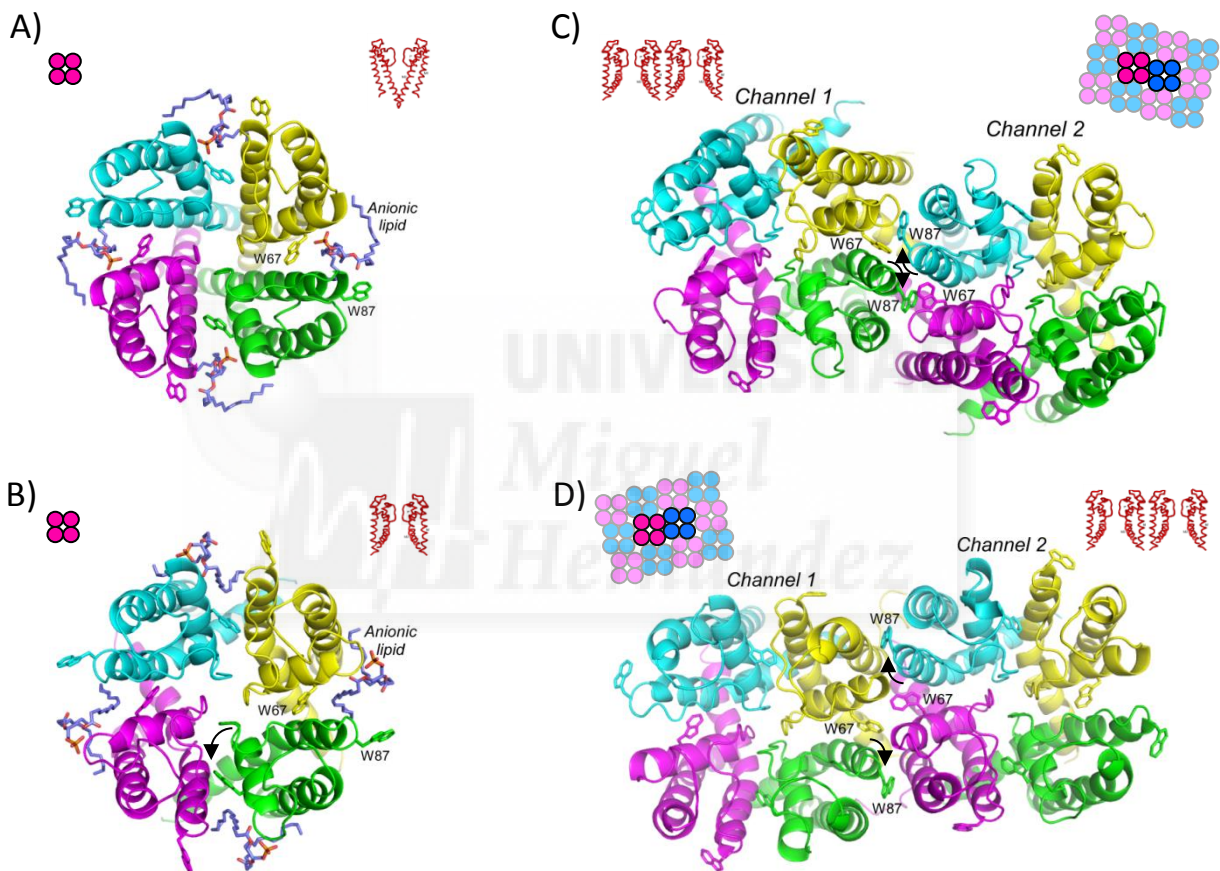


Figura 1. Modelos de KcsA interaccionando con lípidos aniónicos (PA) en el sitio no anular o con otro KcsA. A) Modelo de KcsA con la puerta intracelular cerrada (PDB: 1K4C) interaccionando con PA (Anexo). **B)** Modelo de KcsA con la puerta intracelular abierta basado en MthK (Molina et al, 2008) interaccionando con PA. **C)** Modelo de interacción entre dos KcsA (MthK) obtenido por “docking” (Anexo). **D)** Modelo de interacción entre dos KcsA (MthK) obtenido por superposición sobre el dímero cristalizado de TrkH (Anexo). En cada figura se muestra en pequeño un esquema de cada canal con sus cuatro subunidades visto desde arriba, tanto en canal aislado (**A** y **B**), como formando parte de una agrupación (**C** y **D**), y visto desde el lateral, en este último se muestran dos subunidades de cada canal para mayor claridad. Se destaca el W67 de la hélice del poro y el W87 del M2 de cada subunidad. Las flechas en **C** y **D** indican el movimiento de apertura del M2 en contacto con el canal adyacente que produce un aumento de la distancia entre la hélice del poro y el M2 que flanquean al sitio no anular entre 1 y 2 Amstrongs.

Si miramos los modelos desde la cara extracelular, en el modelo de “docking” los canales interaccionan en sentido horario, de forma que la hélice del poro de un canal encaja en el sitio no anular entre la hélice del poro y el M2 del canal adyacente, donde las múltiples interacciones entre los canales están lideradas en la región extracelular por el W87 de un canal que interacciona con el W67 del canal adyacente (Figura 1C); en cambio, en el modelo de superposición, los canales interaccionan en sentido anti-horario, de forma que ahora es el M2 de un canal el que encaja en el sitio no anular del canal adyacente, donde las múltiples interacciones entre los canales están lideradas en la región extracelular por el W67 que interacciona con otro W67 del canal adyacente (Figura 1D).

Ambos modelos de interacción entre canales son diferentes dado que la región que interacciona con el sitio no anular es diferente, pero de forma interesante, en ambos modelos, los canales interaccionan de forma simétrica uno con otro y producen el mismo fenómeno, el aumento del hueco del sitio no anular por flexión del M2 en su región extracelular (flechas en Figura 1C y D), y la salida del W67 hacia el canal adyacente.

Esto explica que un exceso de lípido aniónico pueda romper las interacciones entre los canales, desestabilizando las agrupaciones y el acoplamiento funcional entre los canales de KcsA, dando así, el resultado observado de que a mayor proporción de lípido aniónico, menor proporción de agrupaciones, menor porcentaje de sellos con actividad de tipo HOP acoplado, y menor estabilidad frente al voltaje de la actividad de tipo HOP resultando en una mayor inactivación de los canales. Los modelos de interacción corroboran así que la actividad de tipo HOP se obtiene en grupos grandes de canales, que en su región no anular extracelular contactan principalmente con otros canales, mientras que la actividad de tipo LOP se obtiene en canales de KcsA principalmente individuales o en grupos de pocos canales, que en su región no anular extracelular contactan principalmente con fosfolípidos aniónicos

7 Los modelos de interacción permiten proponer una hipótesis que explica la actividad de tipo LOP, la actividad de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales de KcsA

La observación en detalle de los modelos de interacción revela que la interacción en el sitio no anular, tanto del lípido aniónico como de otro canal, afecta directamente a la triada de inactivación W67-E71-D80 que gobierna la actividad del canal (Figura 2).

La actividad del canal KcsA resulta de un equilibrio concertado entre dos puertas definidas (Blunck et al, 2006). La puerta intracelular está formada por la región de hélices cruzadas del C-terminal, que se desestabiliza a pH ácido desplazando el equilibrio hacia su conformación abierta. Por otro lado, la puerta extracelular en el filtro de selectividad, gobernada por la triada W67-E71-D80, define principalmente la probabilidad de apertura del canal y puede variar su conformación de equilibrio desde el estado permeante hacia un estado no permeante, causando inactivación del canal. Ambos, el estado conformacional y las respuestas funcionales de KcsA parecen fuertemente moduladas por su medio circundante (Triano et al, 2010; Heginbotham et al, 1999; Imai et al, 2012; Marius et al, 2008), probablemente, a través de una alteración de uno o ambos equilibrios de “gating”.

Hasta ahora, se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la apertura y cierre de las dos puertas. Por un lado, aunque todavía controvertido, se propone que las interacciones electrostáticas no específicas entre los lípidos aniónicos y la porción N-terminal de la proteína favorecen la conformación abierta de puerta intracelular del canal (Iwamoto y Oiki, 2013), resultando en un aumento de la actividad. Por otra parte, se ha propuesto que las interacciones específicas de lípidos aniónicos con los sitios de unión no anulares de KcsA modulan la función del canal iónico a través de su influencia en la puerta extracelular (Weingarth et al, 2013; Marius et al, 2008), aunque no hay una explicación clara para tal efecto.

En el Anexo se muestra que la competencia de interacciones lípido-proteína o proteína-proteína en los sitios no anulares de KcsA constituye un elemento central de la modulación de la actividad de KcsA, que determina, tanto la ocurrencia de agrupaciones como cambios en el comportamiento de “gating” como resultado de interferir con la triada de inactivación W67-E71-D80, que a su vez influye en la conformación del filtro de selectividad. La triada W67-E71-D80 forma una red de puentes de hidrógeno que modula la inactivación de tipo C ejerciendo un papel crítico en la dinámica y estabilidad conformacional del filtro de selectividad de KcsA, que puede servir como un modulador general del “gating” del filtro de selectividad en otros miembros de la familia de canales de potasio (Cordero-Morales et al, 2011). En el Anexo se introduce cómo las interacciones predichas por los modelos de interacción lípido-proteína y proteína-proteína en el sitio no anular, respaldados por datos cristalográficos, podrían modular el estado de la triada explicando la actividad de tipo LOP, de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales. Así, el estado asociado o semi-asociado de la triada W67-E71-D80 en los modelos de interacción con lípidos aniónicos explica las aperturas inestables en estado prácticamente inactivado característico de la actividad de tipo LOP; mientras que su estado disociado estable en los modelos de interacción entre canales explica las aperturas estables de la actividad de tipo HOP así como el mecanismo de acoplamiento funcional entre canales de KcsA. Para poner a prueba nuestra hipótesis se realizaron mutaciones de los aminoácidos implicados comprobándose que, efectivamente, corroboran los modelos de interacción.

7.1 Los modelos de interacción lípido-proteína explican la actividad de tipo LOP

La actividad de tipo LOP son aperturas pH-dependientes de canales individuales o en grupos pequeños con una P_o muy baja que se abren en ráfagas inestables entre largos periodos en estado cerrado. En el canal de KcsA cristalizado individual las regiones no anulares extracelulares interaccionan con lípidos aniónicos, y los modelos diseñados en esta Tesis de interacción con lípidos aniónicos en la zona no anular impiden la disociación de la triada W67-E71-D80 manteniéndola asociada o semi-asociada explicando la extremadamente baja P_o de la actividad de tipo LOP.

Así, en el modelo de interacción con lípidos basado en la estructura cristalizada de KcsA con la puerta intracelular cerrada (Anexo; PDB: 1K4C; Figura 2A,B), el lípido interacciona con las argininas R64 y R89 y, más importante, mantiene al W67 interaccionando con E71 y D80, lo que estabiliza la triada W67-E71-D80 que induce el estado inactivado del filtro de selectividad.

La interacción electrostática entre los fosfolípidos aniónicos y los aminoácidos cargados positivamente en la secuencia KcsA constituyen la base para la unión de los lípidos a los sitios no

anulares. Por lo tanto, la sustitución de R64 o R89 por aminoácidos no cargados debe desfavorecer la estabilización de los fosfolípidos aniónicos en dichos sitios y de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, se espera que tales mutantes muestren un patrón alterado de la agrupación de canales y de su actividad. Efectivamente, el mutante KcsA R64A no muestra disociación de las agrupaciones con el aumento de la proporción de lípidos aniónicos observado por BN-PAGE. Por el contrario, el mutante KcsA R89A todavía muestra disociación parcial de las agrupaciones en respuesta a los lípidos aniónicos, más notablemente a PA que a PG, lo que sugiere que la R64 tiene mayor interacción con los lípidos aniónicos que la R89. Esto concuerda con la mayor implicación que muestra la R64 en su interacción con el lípido en los modelos de interacción en el sitio no anular (Figura 2A-D).

El grupo de Perozo ha propuesto que el mecanismo de apertura de KcsA en ráfagas activado por pH, característico de la actividad de tipo LOP, se debe a la reorientación de la cadena lateral de E71. Así, el voltaje positivo reorienta a E71 hacia el lado intracelular del canal y lo aleja de D80 debilitando la triada, de forma que el D80 puede “flipar” y producir la apertura inestable de la triada W67-E71-D80 que promueve la desestabilización del estado inactivado del filtro de selectividad. En cambio, voltajes negativos reorientan E71 hacia D80, reforzando la interacción de la triada y por tanto la inactivación del canal (Cordero-Morales et al, 2006b; Cordero-Morales et al, 2011). Pero, a diferencia de la interacción por puente de hidrógeno entre E71 y D80, muestran que el puente de hidrógeno entre el W67 y el D80 está conservado entre la mayoría de los canales de K⁺ (W434-D447 en *Shaker*; W366-D379 en Kv1.2) y constituye otra interacción crítica que determina la tasa y extensión de la inactivación de tipo C (Cordero-Morales et al, 2011).

Nuestro modelo de KcsA con la puerta intracelular abierta basado en MthK (Molina et al, 2008, Figura 2C y D), se utilizó para comprobar el estado de la triada en la conformación del canal que simula la actividad de tipo LOP dado que simula una apertura pH-dependiente. Se observó que concuerda con el mecanismo de modulación por voltaje propuesto por el grupo de Perozo (Cordero-Morales et al, 2006-b y 2011), dado que muestra el D80 preferentemente en su orientación “flipada” en la que deja de interactuar con E71 que permitiría la apertura del canal, pero muestra la triada semi-asociada, dado que el D80 mantiene su interacción con el W67 lo que explica que el canal permanezca principalmente en el estado cerrado característico de la actividad de tipo LOP. En este modelo con la puerta intracelular abierta, el lípido aniónico está menos encajado en el sitio no anular que en el modelo con la puerta intracelular cerrada y se desplaza sensiblemente hacia la hélice del poro, de forma que deja de interactuar con R89, situada en el M2, e interactúa débilmente con R64 y T61, ambos en la hélice del poro. La R89 interactúa ahora con D80 contribuyendo a estabilizar la posición “flipada” de éste último. Otros grupos, efectivamente, han detectado un puente salino entre D80 y R89 de subunidades adyacentes que estabiliza el tetrámero, no presente en la estructura cristalizada (Guidoni et al, 1999). Además, en este modelo, la R64 presenta una posición inestable alternante entre la posibilidad de interactuar con D80 o con el lípido (Figura 2C y D, flecha). Esta posición alternante de la R64 unido al desplazamiento del lípido y a la reorientación del E71 inducida por el voltaje positivo podría debilitar la interacción de D80 con W67, permitiendo breves salidas del W67 que abrirían la triada de forma fugaz e inestable, explicando la apertura inestable en ráfagas característica de la actividad de tipo LOP. Esto explica la mayor probabilidad de apertura a voltajes positivos que a voltajes negativos, que produce la característica rectificación de salida en las rampas de voltaje de la actividad de tipo LOP.

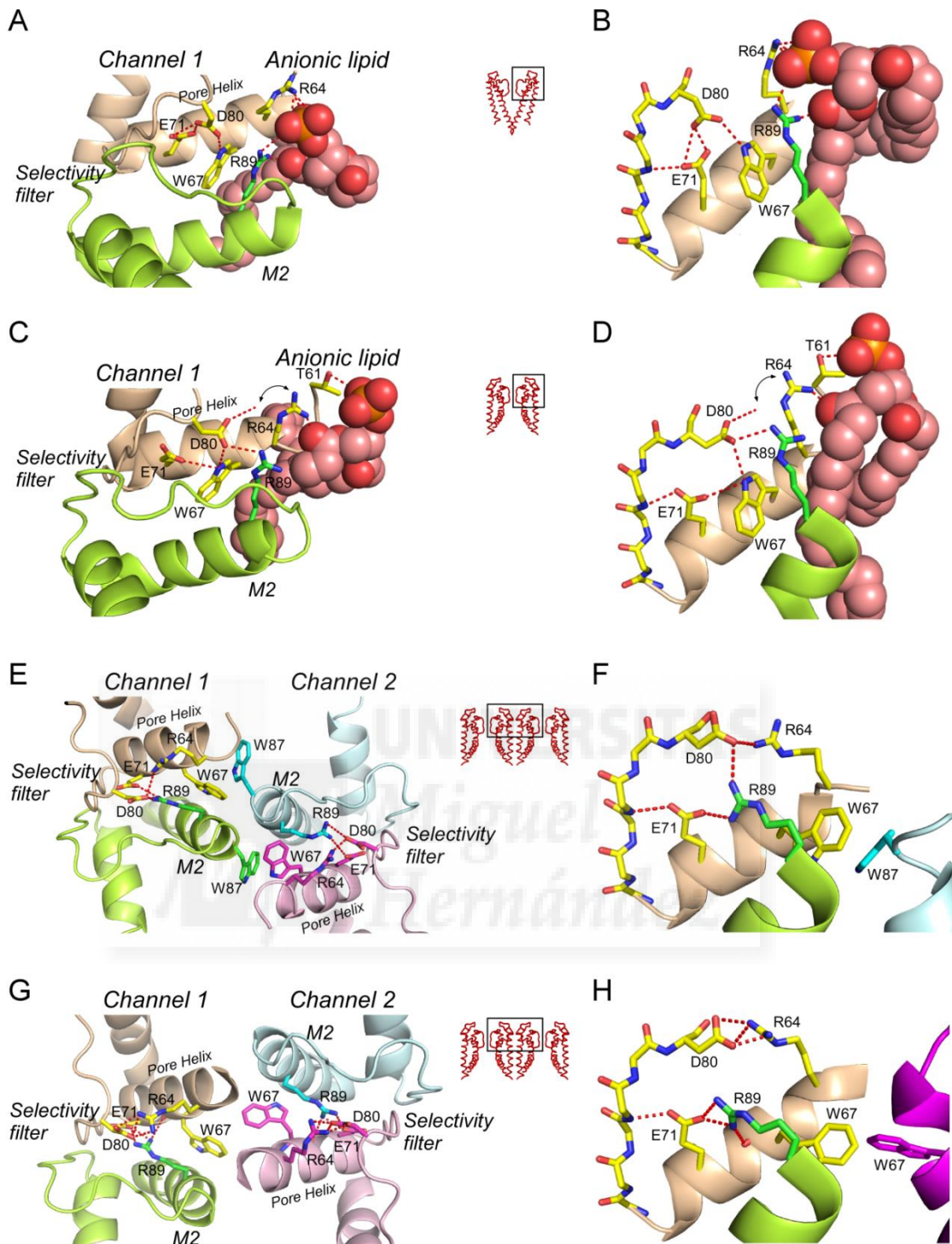


Figura 2. Los modelos de interacción lípido-proteína y proteína-proteína en el sitio no anular explican la actividad de tipo LOP, de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales de KcsA. Detalles de los modelos de KcsA interactuando con el fosfolípido DPPA (**A, B, E y F**) o con otro KcsA (**C, D, G y H**) en el sitio no anular. Centro: esquema del canal individual o dos canales. Para mayor claridad, se muestran dos subunidades de cada canal y se encuadra la parte ampliada a derecha e izquierda; Izquierda: vista superior extracelular; Derecha: vista lateral de la triada de gating. **A y E**) Modelo de KcsA cristalizado con la puerta intracelular cerrada (PDB=1K4C) interactuando con DPPA. **B y F**) KcsA modelado en la estructura de MthK la puerta intracelular abierta (Molina et. Al, 2008) interactuando con DPPA. **C y G**) Modelo de interacción entre dos canales de KcsA realizado mediante docking del modelo en (**B**). **D y H**) Modelo de interacción entre dos canales de KcsA realizado mediante superposición del modelo en (**B**) en el cristal de TrkH (ver Mat. y Mét. de Molina et al, enviado; Anexo).

7.2 Los modelos de interacción proteína-proteína explican la actividad de tipo HOP

Por otra parte, la actividad de tipo HOP son aperturas pH-independientes de grupos grandes de canales supuestamente acoplados por contacto directo entre ellos que permanecen principalmente en estado abierto. Los dos modelos diseñados de interacción entre canales, el obtenido por “docking” y el obtenido por superposición con el dímero cristalizado de TrkH (Figuras 2E-H), contactan a lo largo de la región transmembrana que incluye la región no anular provocando la disociación completa y estable de la triada W67-E71-D80, lo que induce la conformación no inactivante del filtro de selectividad y la elevada probabilidad de apertura característica de la actividad de tipo HOP.

Según ambos modelos de interacción entre canales, la interacción de la región no anular de un canal con un segundo canal adyacente aumenta entre 1 y 2 Amstrongs la distancia entre el carbono alfa de P63 en la hélice del poro y el carbono alfa de W87 en el M2 que flanquean al sitio no anular (Figuras 1 y 2). La interacción con el canal adyacente favorece la salida del W67 provocando su disociación estable de E71 y D80. Además, las argininas R64 y R89 realizan ahora interacciones estables con E71 y D80, donde sobretodo la R89 entra hacia el filtro y se interpone entre E71 y D80 contribuyendo a estabilizar la posición disociada entre E71 y D80 y fijando la posición de E71. Por tanto, la interacción con el canal adyacente podría inducir y estabilizar la salida del W67 y la entrada de la R89, provocando la disociación estable de la triada y fijando la posición de E71, que explica las características de la actividad de tipo HOP como es la estabilidad de las aperturas, la elevada probabilidad de apertura y la mayor estabilidad frente al voltaje.

En los modelos correspondientes de la Figura 2 se muestra sólo la interacción entre dos canales para mayor claridad, donde sólo uno de los cuatro sitios no anulares de un canal contacta con el canal adyacente y, por tanto, sólo una de las cuatro triadas en cada canal está afectada por el canal adyacente; pero la actividad de tipo HOP corresponde a grupos grandes de canales donde cada canal tetamérico contacta con canales en sus cuatro sitios no anulares estabilizando las cuatro triadas del filtro de selectividad permitiendo, así, la apertura estable del filtro de selectividad característica de la actividad de tipo HOP.

7.3 Los modelos de interacción proteína-proteína explican el acoplamiento funcional entre canales de KcsA

Los modelos de interacción entre canales permiten proponer una hipótesis que explica cómo los canales podrían afectarse mutuamente dando lugar al funcionamiento sincronizado o acoplado entre ellos. Ambos modelos de interacción entre canales son diferentes dado que la región que interacciona con el sitio no anular es diferente, pero de forma interesante, en ambos modelos, los canales interaccionan de forma simétrica uno con otro y producen el mismo fenómeno, el aumento del hueco del sitio no anular por flexión del M2 en su región extracelular y la salida del W67 hacia el canal adyacente.

Ambos modelos permiten proponer una misma hipótesis del mecanismo de acoplamiento funcional entre canales de KcsA, dado que, en ambos modelos, la interacción con el canal adyacente

induce la apertura estable de la triada W67-E71-D80 mediante la salida del W67 y la entrada de la R89 de forma directa y recíproca en ambos canales (Figura 2E-G). De esta forma, la interacción entre canales adyacentes estabiliza directa y simultáneamente el estado abierto de la triada y del filtro de selectividad de ambos canales explicando el funcionamiento acoplado de los canales. La interacción entre los múltiples canales de una agrupación donde cada canal tetramérico contacta con canales en sus cuatro sitios no anulares estabilizaría las cuatro triadas del filtro de selectividad a la vez permitiendo la apertura estable y coordinada del filtro de selectividad, mediante un mecanismo todavía desconocido, de todos los canales de la agrupación que explica la actividad de alta probabilidad de apertura y acoplada de múltiple canales que caracteriza la actividad de tipo HOP.

7.4 La mutagénesis dirigida corrobora la hipótesis que explica la actividad de tipo LOP, de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales de KcsA

En los párrafos anteriores, planteamos la hipótesis de que los diferentes patrones de actividad y de agrupaciones del canal observados en presencia de concentraciones crecientes de fosfolípidos aniónicos podrían explicarse sobre la base de las interacciones diferenciales que implican aminoácidos clave, como R64, R89 y W67, que tienen que ver la integridad de la triada de inactivación W67-E71-D80 y, por tanto, sobre las propiedades del filtro de selectividad .

Para comprobar nuestra hipótesis que explica la actividad de tipo LOP, de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales de KcsA se estudió la presencia y estabilidad de la actividad de tipo HOP y la presencia de actividad acoplada de KcsA con mutaciones en los principales aminoácidos que los modelos predicen implicados en los modelos de interacción con lípidos: R64A y R89A, y en los modelos de interacción entre canales: R89A, W67F y E71A.

En ausencia de las argininas R64 y R89 (en los mutantes R64A y R89A), que los modelos de interacción predicen que interaccionan con el lípido aniónico, el canal muestra una elevada probabilidad de apertura a nivel de canal único ($NP_o > 0,5$). Esto concuerda con la menor atracción de lípido aniónico por el sitio no anular, dado que podría permitir la salida del W67 produciendo la rotura de la triada, lo que a su vez provoca la apertura del filtro de selectividad explicando el aumento de la P_o .

En cuanto al acoplamiento funcional, el mutante KcsA R64A presenta una actividad acoplada de tipo HOP similar a KcsA wt y, al igual que éste, la actividad de tipo HOP es principalmente estable frente al voltaje aplicado en rampas sucesivas (no mostrado). Esto, efectivamente, concuerda con la ausencia de disociación de las agrupaciones en el mutante R64A detectado mediante “blue-native” (Anexo) que otorga un papel principal a la R64 en la interacción con lípidos aniónicos. En ausencia de la R64, el lípido aniónico no se ve atraído por el sitio no anular evitando la disociación de las agrupaciones y manteniéndose una actividad acoplada estable.

Pero a diferencia del mutante R64A, el mutante R89A presenta un evidente desacoplamiento funcional de los canales a pesar de estar agrupados, según muestra el “blue-native”. La ausencia de acoplamiento funcional en el mutante R89A indica que, efectivamente, este aminoácido está

también implicado en el mecanismo de acoplamiento funcional entre un canal y otro, tal y como predicen los modelos de interacción entre canales.

Lo mismo ocurre en los mutantes de los otros aminoácidos que los modelos predicen afectados por la interacción entre canales en el sitio no anular, es decir, los mutantes W67F y E71A. Ambos mutantes también muestran una actividad principalmente desacoplada (no mostrado). Esto corrobora el papel de estos aminoácidos en la apertura estable de la actividad de tipo HOP inducida por interacción con el canal adyacente y en el acoplamiento funcional, tal y como predicen ambos modelos de interacción entre canales de KcsA.

Todos los mutantes que muestran actividad desacoplada también muestran que su actividad es inestable frente al voltaje aplicado en rampas sucesivas (no mostrado). El acoplamiento funcional entre canales otorga estabilidad frente al voltaje. Dado que E71 es el sensor de voltaje de KcsA (Cordero-Morales et al, 2006b), esta estabilidad podría estar relacionada con la interacción entre R89 y E71 que predicen los modelos de interacción entre canales.

Tal y como se esperaba, los canales que presentan mutaciones en los aminoácidos que forman parte de la triada de inactivación W67-E71-D80, como W67F y E71A, muestran una elevada probabilidad de apertura ($N_{Po} > 0,5$) sobretodo a voltajes positivos, mucho mayor que la obtenida para KcsA wt ($N_{Po} < 0,1$). Este aumento de la probabilidad de apertura se debe a la ruptura de la triada W67-E71-D80 que induce una conformación no inactivante del filtro de selectividad, tal y como demostró el grupo de Perozo (Cordero-Morales et al, 2006 y 2011). Nosotros denominamos a este tipo de actividad, un patrón de actividad de tipo "HOP desacoplado", que resulta similar al que muestra el grupo de Perozo en dichos mutantes.

El tercer aminoácido componente de la triada, el D80 no se pudo mutar porque al parecer su alteración impide obtener un canal funcional, aunque la mutación conservativa D378E en Kv2.1, equivalente a D80 en KcsA, afectó a la estabilidad del estado abierto (Chapman et al, 2006).

Por último, cabe señalar que la actividad de los mutantes R89A, W67A y E71A mostraron curvas I/V con rectificación de salida, en lugar de la rectificación de entrada o casi comportamiento óhmico característico de la actividad de tipo HOP acoplado observado en KcsA wt (Molina et al, 2006) o el mutante R64A. La rectificación de salida es un rasgo distintivo de la actividad de canal único de KcsA en canales individuales (Meuser et al, 1999; LeMasurier et al, 2001; Molina et al, 2006), y por lo tanto, constituye una evidencia más que apoya que los registros de estos mutantes corresponden a canales "desacoplados" funcionalmente que, a pesar de formar agrupaciones, se abren de forma independiente.

Las mutaciones de los aminoácidos implicados reproducen los efectos de los lípidos aniónicos y desacoplan funcionalmente los canales corroborando la hipótesis de los modelos de interacción. Las mutaciones reproducen los efectos de la elevada proporción de lípido aniónico, así, las mutaciones que reducen la proporción de sellos de tipo HOP, también reducen el acoplamiento funcional entre canales y también reducen la estabilidad de la actividad frente al voltaje. Esto confirma que estos efectos están asociados entre sí y corrobora que la actividad de tipo HOP de

KcsA, caracterizada por elevado número de canales acoplados con elevada P_o y estable frente al voltaje, se debe a la interacción entre canales.

Todas las evidencias de arriba aparentemente completan un escenario de acuerdo con nuestra hipótesis en la que la competencia de interacciones lípido-proteína o proteína-proteína en los sitios no anulares de KcsA determinan tanto la ocurrencia de agrupaciones como los cambios en la actividad resultantes de interferir con la tríada inactivación W67-E71-D80, que a su vez afecta a la conformación del filtro de selectividad. En otras palabras, los canales KcsA "agrupados" tienen diferente dinámica y estabilidad conformacional en el filtro de selectividad que los canales KcsA "individuales", unidos a fosfolípidos.

En resumen, la mutagénesis corrobora la hipótesis que explica la actividad de tipo LOP, la actividad de tipo HOP y el acoplamiento funcional entre canales de KcsA planteada a partir de los modelos de interacción lípido-proteína y proteína-proteína. Así, la unión del fosfolípido aniónico en el sitio no anular impide la formación de agrupaciones y mantiene la tríada W67-E71-D80 asociada, que induce la conformación inactivante del filtro de selectividad, resultando en canales individuales o de apertura independiente propensos a inactivarse (actividad de tipo LOP). Por el contrario, la interacción con el canal adyacente podría inducir la salida del W67 y la entrada de R89 que interacciona con E71 y se interpone entre E71 y D80, en lugar del W67, provocando la disociación completa y estable de la tríada W67-E71-D80, que induce la conformación no inactivante del filtro de selectividad. Esto resulta en canales agrupados con apertura acoplada estable, incapaces de inactivarse fácilmente (actividad de tipo HOP). La interacción entre múltiples canales adyacentes induce la disociación estable de las tríadas W67-E71-D80 de las cuatro subunidades de forma directa y recíproca entre los múltiples canales adyacentes (mediante una interacción horaria o mediante una interacción anti-horaria entre los canales), que provoca la apertura simultánea acoplada del filtro de selectividad de todos canales mediante un mecanismo desconocido todavía.

El hecho de que los canales con los aminoácidos de la tríada mutados presenten actividad principalmente desacoplada indica que la tríada W67-E71-D80 está implicada en el mecanismo de acoplamiento funcional. Dado que la tríada W67-E71-D80 modula la inactivación de tipo C de KcsA (Cordero-Morales et al, 2006 y 2011), la implicación directa de los aminoácidos de la tríada en el mecanismo de acoplamiento funcional sugiere que la inactivación de tipo C podría estar asociada al desacoplamiento funcional de los canales.

7.5 Similitud entre KcsA y los Kir en la modulación de la triada de inactivación

Los cambios inesperados en las propiedades conocidas de KcsA cuando está en un patrón HOP a diferencia de cuando está en LOP, como la pH-dependencia de su apertura, el bloqueo por sodio, o la voltaje-dependencia de la curva I-V, podrían surgir de la modificación o la participación directa de los determinantes moleculares correspondientes a las interacciones entre canales y / o los cambios conformacionales implicados en el proceso de agrupación.

De forma interesante, se ha observado en un canal Kir que la alteración de las interacciones entre aminoácidos equivalentes a los que configuran la triada de inactivación en KcsA, cambian la selectividad, el bloqueo y las propiedades de rectificación del canal (Dibb et al, 2003).

Así, en el canal quimera Kir3.1/Kir3.4 comprueban que el puente salino formado entre E139-R149 de Kir3.1 y E145-R155 de Kir3.4 (equivalentes a E71 y D80 en KcsA), confiere rigidez al filtro de selectividad restringiendo la flexibilidad de esqueleto carbonado del lazo formado por los 10 aminoácidos que engloba el puente salino en cada subunidad a modo de cuerda de arco, donde el motivo GYG queda en la parte más estrecha del poro, de forma que el canal es altamente selectivo a K^+ y muestra rectificación de entrada por bloqueo por poliaminas (putrescina y espermina). En cambio, la ruptura del puente salino por mutagénesis (E145Q) aumenta la flexibilidad del lazo y aumenta el diámetro del filtro de selectividad permitiendo la permeabilidad de otros cationes, incluyendo poliaminas que produce un cambio en la rectificación del canal.

La ruptura de la interacción E71-D80 en KcsA también aumenta la flexibilidad del filtro, según detectó el grupo de Perozo en el mutante no inactivante E71A (Cordero-Morales et al, 2006). Dicho grupo detectó grandes reorganizaciones del esqueleto carbonado del filtro de selectividad junto con cambios en la posición y ocupación de los iones de K^+ , y sugieren que el estado conductor del filtro de selectividad puede adoptar un amplio rango de conformaciones, donde la estructura cristalizada del mutante E71A con la triada de inactivación en estado abierto (D80 en posición flipada) representa una conformación conductora intermedia. Concluyen que el filtro de selectividad puede sufrir cambios conformacionales mucho más grandes que los descritos inicialmente.

8. Flexibilidad del filtro. El filtro tiene estructuras diferentes en el canal aislado y agrupado que podrían explicar el cambio de selectividad K^+/Na^+ observado entre LOP y HOP

El bloqueo por sodio intracelular es una reconocida propiedad clásica de los canales de potasio que en KcsA ha causado cierta controversia. El grupo de C. Miller obtuvo bloqueo por sodio a voltajes positivos con una permeabilidad relativa K^+/Na^+ de 150 (Heginbotham et al, 1999); mientras que el grupo de H. Schrempf no obtenía bloqueo, mostrando una permeabilidad relativa K^+/Na^+ de sólo 11 (Meuser et al, 1999) o incluso 3 en preparaciones de vesículas de protoplastos de micelios de *Streptomyces* (Schrempf et al, 1995; para más info sobre *Streptomyces* ver Apéndice 1).

Se ha descrito que las propiedades de KcsA definidas por el cristal (Doyle et al, 1998; Zhou et al, 2001) no coinciden con las determinadas en estado abierto del filtro de selectividad (Meuser et al, 1999). Así, caracterizaciones electrofisiológicas y de dinámica molecular han detectado que: 1) los iones de potasio pasan por el filtro del canal abierto en un estado altamente hidratado ($nH_2O \geq 6$); 2)

que no es tan selectivo al K^+ porque la selectividad K^+/Na^+ es solo de 11; y 3) que el filtro debe tener un diámetro de unos 6 Å, mayor que el cristalizado (aprox. 2 Å), porque pasan por él compuestos amonio hasta del tamaño del trimetilamonio, mientras que el tetrametilamonio lo bloquea (Meuser et al, 1999). Por todo ello, el grupo de Schrempf concluyó que el cristal refleja las propiedades del canal en estado cerrado, pero no en estado abierto (Meuser et al, 1999).

Nosotros hemos observado que el canal se bloquea y se desacopla con sodio cuando está en conformación LOP, es decir, principalmente cerrado, pero no cuando está en conformación HOP, es decir, principalmente abierto con alto número de canales acoplados. Por tanto, algo debe cambiar en el filtro cuando los canales están abiertos y agrupados que permite la conducción del sodio. Por tanto, ¿qué es lo que cambia en el filtro de selectividad, que cuando los canales están agrupados y abiertos, el sodio no bloquea, sino que pasa por el filtro?

Un candidato podría ser un pequeño cambio en la V76, cuya sustitución por alanina en el aminoácido correspondiente de *Shaker* (V443) produce un canal no selectivo (Heginbotham et al, 1994). Por otro lado, Krishnan et al (2008) mantienen que la T75 controla la selectividad K^+/Na^+ al observar que cuando se muta a alanina y cisteína, el Na^+ en lugar de desestabilizar KcsA, lo estabiliza térmicamente, por lo que se puede extrapolar que el canal cambia su selectividad y conduce Na^+ .

Nuestros datos indican que el filtro tiene una estructura diferente en estado cerrado (LOP) y en estado abierto (HOP). Dado que la actividad de tipo LOP corresponde a canales individuales o grupos pequeños de canales que interaccionan principalmente con lípidos aniónicos, y la actividad HOP a grupos grandes de canales que interaccionan principalmente con otro canal, nuestros resultados indican que las propiedades de conducción y selectividad cambian en función de las interacciones lípido-proteína o proteína-proteína que se establezcan. Nuestro modelo de "docking" entre dos canales de KcsA abiertos aporta datos que podrían explicar por qué el sodio no bloquea cuando el canal está abierto de forma estable (HOP).

En el cristal del canal con la puerta intracelular cerrada (Doyle et al, 1998, PDB 1BL8; Zhou et al, 2001, PDB 1K4C) aparece una red de aminoácidos aromáticos que rodean al filtro de selectividad fijando su diámetro: la Y78 que contacta mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals con W67 y W68 de la hélice del poro. Esto se puede ver en una sección perpendicular al filtro de selectividad, visto desde el citoplasma, como muestran en la Figura 8 de Doyle et al, 1998 (Figura 3A).

Pero existen muchas evidencias de flexibilidad del filtro de selectividad, que indican que el filtro cambia en estado abierto (Meuser et al, 1999; Cordero-Morales et al, 2006). Además, el cristal de KcsA E71A (Cordero-Morales et al, 2006; PDB 2ATK), donde el canal tiene la puerta intracelular en un estado abierto intermedio (como los autores reconocen), detecta una mayor flexibilidad del filtro y muestra que el W67 puede reorientarse entre dos rotámeros con energías similares, apoyado por el descenso en los "factores β " del W67 en el cristal del mutante E71A (Cordero-Morales et al, 2006).

En nuestro modelo de "docking" entre canales de KcsA con las puertas intracelular y extracelular abiertas (basado en MthK), la posición de las T75 es similar a la encontrada en KcsA con la puerta intracelular cerrada; pero en cambio, la Y78 ha variado de posición con respecto a los W67 y W68, ya que no está en disposición de formar puentes de hidrógeno con el W68. Al igual que en el

crystal del mutante E71A abierto, comprobamos que el W67 puede cambiar el rotámero sin impedimento alguno, pasando de estar mirando hacia el filtro de selectividad, a mirar hacia el W87 del canal adyacente en las agrupaciones permitiendo mayor flexibilidad al filtro de selectividad, y que además, en esa posición puede interactuar con el W87 del canal adyacente. Aquí no parece que la Y78 sea capaz de formar puentes de hidrógeno con W68, ya que están lejos (5.3 Å) y no parece tener la geometría más idónea para ello (Figura 3B). En el modelo de interacción entre canales realizado por superposición con TrkH ocurre de forma similar (no mostrado). Por tanto, el W67 orientado hacia el W87 del canal adyacente podría permitir un desplazamiento de las Y78 aumentando el diámetro del filtro. Dicho aumento del diámetro al agruparse los canales alteraría la conformación de la T75, entre otros aminoácidos del filtro, permitiendo posiblemente el paso de iones de sodio y potasio hidratados y explicaría el mayor diámetro (unos 6 Å), la menor selectividad entre ambos iones, y el paso de moléculas tan grandes como el trimetilamonio detectado por el grupo de Schrempf (Meuser et al 1999), así como la ausencia de bloqueo por sodio de nuestros registros de tipo HOP.

En resumen, nuestros datos obtenidos por modelaje y por electrofisiología sugieren que el filtro tiene una estructura diferente en estado individual, principalmente cerrado (LOP), y en estado agrupado, principalmente abierto (HOP), y muestran una plasticidad del poro en función de su estado de agrupación, de forma que la agrupación podría inducir el aumento del diámetro del filtro de selectividad explicando los cambios de selectividad detectados en LOP y en HOP.

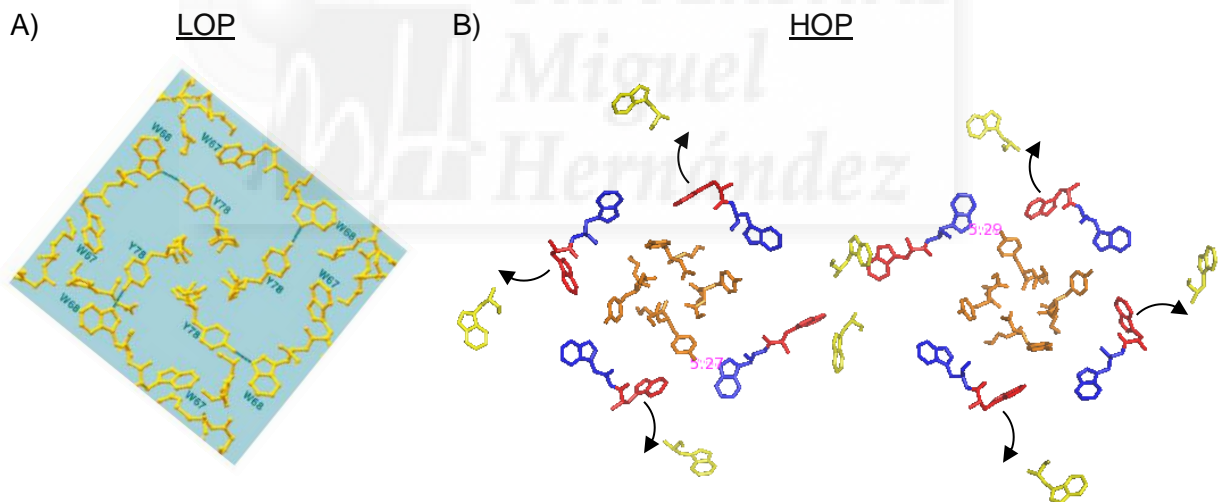


Figura 3. Diferente estructura del anillo aromático del filtro en LOP y en HOP. A) Red de aminoácidos aromáticos que rodean al filtro de selectividad en el cristal de KcsA individual fijando su diámetro: la Y78, que contacta mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals con W67 y W68 de la hélice del poro. Tomado de Doyle et al, 1998 (PDB 1BL8). **B)** Red de aminoácidos aromáticos que rodean al filtro de selectividad en el modelo de docking de dos KcsA agrupados: la Tyr 78 (en naranja) ha variado de posición con respecto a los W, y no está en disposición de formar puentes de H con el W68 (en azul), ya que están lejos (5.3 Å). Esta estructura podría permitir el aumento del diámetro del poro, si los cuatro W67 (en rojo) se voltean para interactuar con los W87 (en amarillo) de canales adyacentes.

9. El “docking” entre canales de 6TM sugiere que la hipótesis de modulación de la actividad por interacción con el canal adyacente podría aplicarse también a canales de 6TM

El mecanismo de apertura y cierre de KcsA está gobernado por una red de puentes de hidrógeno formada por la triada W67-E71-D80, que ejerce un papel crítico en la dinámica y estabilidad conformacional del filtro de selectividad. Observaciones similares en *Shaker* y Kv1.2 sugieren que podría ser un modulador general de la apertura y cierre del filtro de selectividad a través de la superfamilia de los canales de potasio (Cordero-Morales et al, 2011). Además, existen múltiples evidencias de que los canales eucariotas también cambian su actividad cuando están agrupados (Tabla 6 del Apéndice). Esto implica que el mecanismo de estabilización del estado abierto inducido por el canal adyacente que proponemos en esta Tesis Doctoral podría estar conservado a través de la evolución, resultando ser un mecanismo de apertura, posiblemente, más generalizado de canales y receptores de membrana.

Por ello, una vez realizados los modelos de interacción entre canales de KcsA, de cuatro segmentos transmembrana, se comprobó si podrían interaccionar de forma similar canales de seis segmentos transmembrana (6TM) que caracteriza a muchos canales eucariotas. Para ello, se llevó a cabo modelado de interacción por docking de forma similar al realizado en KcsA en dos ejemplos de canales cristalizados de 6TM: el canal de potasio eucariota Kv1.2, cristalizado con la puerta intracelular abierta (Long et al, 2005; Figura 4A) y el canal de potasio procarriota MlotiK1, un canal homólogo a los Kv con 6TM, cristalizado con la puerta intracelular cerrada (Clayton et al, 2008; Figura 4A).

Efectivamente, el resultado de “docking” entre dos canales 6TM (eucariotas como Kv1.2 o procarriotas como MlotiK1) muestra que encajan bastante bien y predice que también son capaces de formar agrupaciones de canales acoplados similares a KcsA (Figura 4B y C). Según el docking, los canales Kv1.2, cristalizados en estado abierto, interaccionan en sentido horario; mientras que los canales MlotiK1, cristalizados en estado cerrado, interaccionan en sentido anti-horario. Según nuestros modelos, tanto los canales Kv1.2 como los MlotiK1 podrían ser capaces de acoplarse físicamente, de forma que el “gating” del filtro de selectividad podría estar modulado por el canal adyacente de una forma similar a KcsA. Esto implica que el mecanismo de acoplamiento funcional y de estabilización de la conformación abierta del filtro de selectividad a través de la interacción con el canal adyacente podría ser extensivo a canales de 6TM, tanto procarriotas como eucariotas.

No existe evidencia en la bibliografía de que estos canales funcionen de forma acoplada, pero las múltiples evidencias de que los canales eucariotas también cambian su actividad cuando están agrupados (Tabla 6 del Apéndice), hace pensar que sea también el caso de estos canales. Si, efectivamente ese fuera el caso, el mecanismo de acoplamiento funcional entre estos canales es desconocido, pero la diferente disposición del segmento transmembrana S4 en ambos canales cerrado y abierto puede ofrecer una pista.

Ambos canales (Kv1.2 y MlotiK1) muestran diferencias en la orientación del segmento transmembrana S4, que contiene los aminoácidos con carga positiva, responsables del sensor de voltaje (Figura 4A). Kv1.2, que está abierto, tiene los aminoácidos cargados del S4 mirando hacia el hacia el lípido, en una posición aparentemente inestable, mientras que MlotiK1, que está cerrado,

tiene los aminoácidos cargados del S4 mirando hacia la propia proteína (Clayton et al, 2008; Figura 4A). Con estos canales existe la pregunta abierta de ¿por qué las cargas del S4 en el canal abierto (Kv1.2) están mirando hacia el lípido, en una posición en teoría inestable, y en cambio en el canal cerrado (MlotiK1) están mirando hacia el propio canal? y ¿qué papel juega la diferente orientación del S4 en estado abierto y cerrado? (Clayton et al, 2008).

El “docking” entre canales podría darnos la respuesta. El S4 de Kv1.2, cuya posición cristalizada con los residuos cargados mirando hacia el lípido no se entiende, según el modelo de “docking” interacciona con el canal adyacente, con el que podría estabilizar sus cargas y modular así la actividad de los canales. El S4 parece interactuar con el canal adyacente en estado abierto, pero no en estado cerrado dado que el S4 en MlotiK1 interacciona con el propio canal (Figura 4B y C). Por tanto, el modelo de modulación de la actividad a través de la interacción con los canales adyacentes podría aplicarse también a canales eucariotas.

Dada la recientemente descubierta organización de la membrana plasmática en “patchwork membrane” o membrana en multidominios auto-organizados (Spira et al, 2012; Mueller et al, 2012), apoyado por la detección de multitud de canales cuya agrupación modula su actividad (Tabla 6 del Apéndice), es esperable que el acoplamiento estructural y funcional entre canales de membrana sea un mecanismo de organización generalizado.

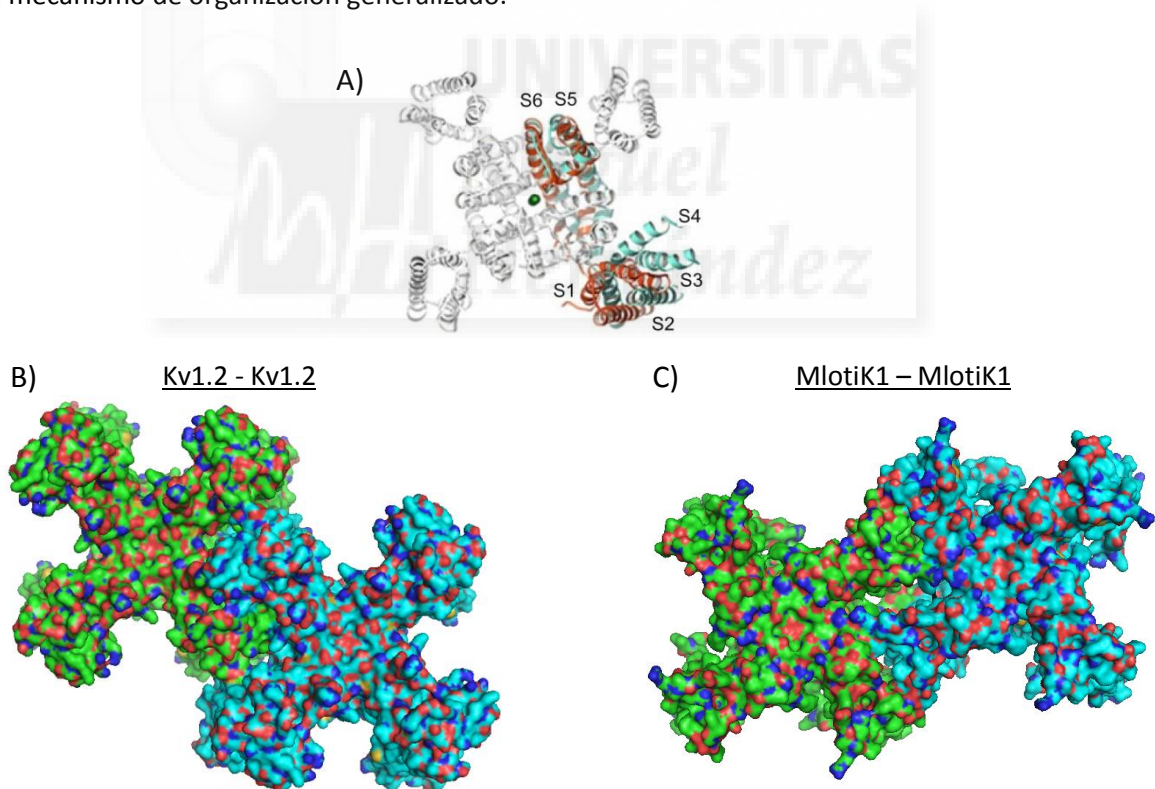


Figura 4. El “docking” entre canales de 6TM predice que también son capaces de formar agrupaciones de canales acoplados. **A)** Estructura cristalizada del canal procariota MlotiK1 visto desde el lado extracelular (en blanco y rojo) y una subunidad del canal eucariota Kv1.2 (en cyan) superpuestas vía la región del poro. Las esferas verdes representan K^+ (tomado de Clayton et al, 2008). **B)** Docking entre dos canales eucariotas Kv1.2 (PDB 2A79; Long et al, 2005). **C)** Docking entre dos canales procariotas MlotiK1 (PDB 3BEH; Clayton et al, 2008).

10. *La modulación de la actividad de KcsA por agrupación y por lípidos se correlaciona con evidencias en otros canales y con el modelo emergente de "patchwork membrane" indicando que puede ser un fenómeno generalizado en las proteínas de membrana*

Efectos en la actividad de los canales relacionados con la agrupación así como con los lípidos también se han observado en otros canales, tanto procariotas, como los canales mecanosensibles MscL (Ursell et al, 2007; Powl et al, 2008; Grage et al, 2011), los canales de gramicidina A (Goforth et al, 2003), la rodopsina (Botelho et al, 2006), o receptores quimotácticos de *E. coli* (Skoge et al, 2006); como eucariotas, como los canales de sodio (Naundorf et al, 2006), el receptor de potencial transitorio TRPM8 (Morenilla-Palao et al, 2009), el receptor de acetilcolina (Poveda et al., 2002; Fernández-Carvajal et al, 2006; Morales et al, 2006), etc. (ver Tabla 6 del Apéndice), y aunque se han proporcionado diversos mecanismos para explicarlo, es posible que fenómenos similares a los revelados en esta Tesis Doctoral puedan también estar detrás de algunas de dichas observaciones.

De hecho, cada vez hay más evidencias que apoyan la idea de que las proteínas de membrana, en lugar de ser componentes aislados que flotan en un ambiente de lípidos fluidos, como el propuesto por el modelo de "mosaico fluido", en cambio, están ensambladas en complejos supramoleculares que participan en una variedad de funciones celulares cooperativas.

Así, la unión de canales eucariotas a través de dominios PDZ provoca el aumento de la Po de los canales. Existen proteínas solubles que tienen dominios PDZ o SH2 que unen proteínas de membrana (como el canal de potasio *Shaker*) mediante el reconocimiento de tirosinas fosforiladas en el extremo C-terminal de estas proteínas de membrana. Y últimamente se está comprobando que estos dominios no sólo agrupan las proteínas de membrana en un lugar concreto, sino que además aumentan la probabilidad de apertura y de forma concertada, es decir, los canales están acoplados estructural y funcionalmente, abriéndose y cerrándose a la vez (Bezprozvanny and Maximov, 2001).

Uno de los mejores ejemplos caracterizados actualmente de conjunto de proteínas que funcionan de forma acoplada en eucariotas lo constituye el acoplón. El acoplón se ha denominado como el conjunto de proteínas de membrana que interaccionan entre sí y que forman unidades funcionales de liberación de Ca^{2+} intracelular en el acoplamiento excitación-contracción, tanto en músculo cardíaco como esquelético. Forman parte del acoplón los receptores de rianodina, los receptores de dihidropiridina, y proteínas de membrana que unen calsecuestrina en el interior del retículo sarcoplásmico, como la triadina o la juntina. Las acoplopatías son una nueva categoría de patologías que afectan al acoplón y alteran su funcionamiento (Rios et al, 2015).

Al igual que en KcsA, se han cristalizado lípidos formando parte integral de la estructura del canal-quimera Kv1.1-Kv2.1 situados justo entre el sensor de voltaje S4 y el linker S4-S5, que transmite el movimiento del sensor de voltaje al módulo del poro que abre o cierra el canal (Long et al, 2007). La situación tan estratégica de los lípidos haciendo interacciones específicas con el canal se ha postulado que probablemente influya en la estructura y función del canal, y de hecho, se ha publicado que la eliminación de la cabeza polar de los fosfolípidos inmoviliza al sensor de voltaje de Kv2.1 (Xu et al, 2008).

De la misma forma, se ha sugerido que el segmento M4 del receptor de acetilcolina, que también forma agrupaciones y funciona en dímeros acoplados funcionalmente (Keleshian et al, 2000), funciona como un sensor lipídico traduciendo las propiedades de la bicapa en una alteración funcional del receptor (daCosta and Baenziger, 2009).

La microscopía de molécula única ha revelado microdominios de la membrana plasmática creados por redes proteína-proteína (Douglass and Vale, 2005); la microscopía electrónica de membranas celulares muestra que todas las proteínas de membrana están agrupadas (Lillemeier et al, 2006); y recientemente se ha comprobado que las proteínas de membrana se distribuyen de forma no homogénea en patrones que van desde grupos separados hasta redes casi continuas fuertemente influenciadas por la composición lipídica de la membrana plasmática, es la denominada "patchwork membrane" donde además, las proteínas con secuencias transmembrana similares o idénticas tienden a colocalizar y la asociación de las proteínas de la membrana plasmática tiene un impacto en su actividad (Spira et al, 2012). Este modelo emergente de membrana auto-organizada en multi-dominios denominado modelo de "patchwork membrane" está sustituyendo al anterior modelo de membrana en "mosaico fluido" (Mueller et al, 2012).

Este modelo emergente de una membrana autoorganizada en multi-dominios o "patchwork membrane" y evidencias de otros canales concuerda bien con la regulación de la actividad que se propone en esta Tesis Doctoral basada en la competencia lípido-proteína y proteína-proteína. Aquí, además se propone que esta regulación de la actividad se produce en sitios de interacción no anulares específicos, y todas las pruebas anteriormente citadas sugieren que éste podría ser un fenómeno generalizado entre las proteínas de membrana.

11. Inactivación de tipo N de KcsA por el péptido inactivante de Shaker, ShB

11.1 Interacciones y estructura del péptido inactivante en horquilla β cuando se une a su diana de inactivación en el canal

En la Publicación 4 se muestra que el canal de potasio procariota KcsA es capaz de mostrar inactivación rápida, o de tipo N, mediante la aplicación del péptido sintético, ShB, que tiene la secuencia del péptido inactivante del canal de potasio eucariota *Shaker* B. Se observó que la inactivación de KcsA está asociada al desacoplamiento funcional de los canales y muestra características similares a la inactivación rápida producida por el péptido ShB originalmente descrita en *Shaker* y otros canales de K^+ de origen eucariota (Molina et al, 2008). Esta similitud enfatiza la conservación a través de la evolución de los dominios funcionales importantes en estos canales y confirma a KcsA como un excelente modelo para el estudio de los canales de potasio (Figura 5).

Para conocer las interacciones y la estructura que adopta el péptido inactivante cuando se une a su diana en el canal iónico para inducir la inactivación se realizó STD-RMN (resonancia magnética nuclear por diferencia de transferencia de saturación) y se comparó con el péptido no inactivante ShB-L7E detectándose diferencias claras en la unión de ambos péptidos a KcsA. Como resultado, el péptido ShB muestra siete aminoácidos que interactúan con la diana: los orto y meta protones de la Y8 (que realizan la interacción más fuerte); el CH_4 del anillo imidazol de la H16; los protones metilo de V4, L7 y L10; y los protones del grupo amino de la cadena lateral de K18 y/o K19. En cambio en el no inactivante ShB-L7E desaparecen las interacciones de K18 y K19, la interacción de la Y8 es más débil y se intensifican las interacciones de V4 y L10, indicando que la mutación L7E altera la unión del péptido al canal KcsA y la topología de los átomos del péptido en el sitio de unión al canal (Molina et al, 2008).

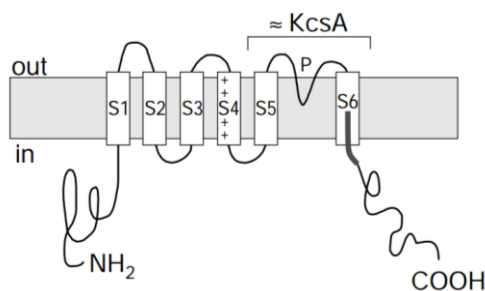


Figura 6. Modelo de topología de membrana de una subunidad del canal de K^+ *Shaker* que muestra la zona donde se une el péptido (línea gruesa). Tal y como se indica, las regiones S5-P-S6 corresponden a la secuencia homóloga con el canal de K^+ KcsA. (Tomado de del Camino et al, 2000)

Además de las interacciones que el péptido inactivante establece con su diana en el canal iónico para inducir la inactivación, el STD-RMN permite dilucidar la estructura que adopta el péptido cuando se une a su diana, a través de la obtención de NOEs de transferencia (del inglés, Nuclear Overhauser Effect). Desafortunadamente, no se pudieron obtener NOEs de transferencia con el péptido inactivante ShB cuando se une al canal KcsA y por tanto no se pudo hallar su estructura mediante éste método. Para solventar éste problema se utilizaron medidas de espectroscopía de

infrarrojo por transformada de Fourier utilizando péptidos marcados con C13 y afortunadamente, aunque no es del todo concluyente debido a cierto solapamiento espectral, los resultados sugieren que el péptido ShB, y no el mutante no inactivante ShB-L7E, adopta una estructura en horquilla β cuando se une al canal KcsA (Molina et al, 2008).

Los resultados obtenidos mediante STD-RMN parecen apoyados por el “docking” del péptido ShB estructurado en horquilla β interactuando con un modelo de canal abierto KcsA, dado que predice la ocurrencia de interacciones muy similares a las observadas experimentalmente. Según el modelo de interacción, el péptido estructurado en horquilla β entra en un bolsillo hidrofóbico del canal formado principalmente por las F103 y T107 de las cuatro subunidades, sólo 8-9 Å por debajo de la base del filtro de selectividad. El modelo de “docking” predice que los aminoácidos V4, L7, Y8 y L10 de la región hidrofóbica del péptido ShB interactúan con las F103 y T107 de KcsA; mientras que las H16 y K18 podrían interactuar con los E118 y E120 de KcsA (Molina et al, 2008).

En conclusión, se determinó que el péptido ShB adopta estructura en horquilla β cuando se une a su diana de inactivación en el canal y esta estructura está asociada a su capacidad para producir la inactivación dado que el péptido no inactivante ShB-L7E difiere del ShB en las interacciones que realiza con el canal y no adopta dicha estructura en horquilla β .

En la actualidad se están llevando a cabo experimentos de STD-RMN con péptidos inactivantes que permitan obtener NOEs de transferencia para dilucidar la conformación exacta del péptido en su diana de inactivación. Esto permitirá el desarrollo de fármacos mediante la obtención de moléculas moduladoras que imiten o impidan su efecto.

Así, se ha utilizado el péptido inactivante mutante ShB-Y8K que muestra 12 veces menos afinidad de unión al canal que el péptido ShB, con la esperanza de que tal disminución en la afinidad esté acompañada por un aumento en la tasa de disociación, de forma que permita obtener NOEs de transferencia y con ello, determinar la estructura del péptido en su diana de inactivación. Como resultado, al igual que el péptido original ShB, el péptido ShB-Y8K está poco estructurado en solución y muestra sólo señales débiles de NOEs de transferencia (no mostrado); en cambio, su unión al canal KcsA reconstituido en membrana provoca la aparición de fuertes NOEs intra-moleculares que llevan a la conclusión de que el péptido se pliega como una horquilla β en su estado unido al canal (no mostrado). La mayor parte de estos aminoácidos que interactúan aparecen agrupados en un lado de la estructura y coinciden en gran medida con los identificados previamente en la interacción entre el canal KcsA y el péptido inactivante ShB (Molina et al, 2008).

Previamente, nuestro grupo halló que la sustitución de la Y8 por su estereoisómero D-tirosina que rompe la estructura secundaria del péptido ShB impide realizar su actividad inactivante, indicando que el péptido necesita adoptar la estructura en horquilla β en su unión con la diana para ejercer la inactivación del canal (Encinar et al, 2003). Y por otro lado, recientemente se ha publicado la estructura cristalizada de KcsA con TBA revelando el sitio de unión del bolsillo hidrofóbico, que parece implicar la I100 y la F103 y la base del filtro de selectividad compuesto por la T74 y T75 (Lenaeus et al, 2014) y coincide básicamente con nuestro modelo de unión de KcsA con el péptido ShB. Un sitio de unión similar con TBA se detectó previamente también por el grupo de MacKinnon (Zhou et al, 2001).

Los datos aportados aquí sobre los aminoácidos del péptido implicados en la inactivación del canal (es decir, en la interacción directa con el canal), así como de su localización y distancias espaciales relativas (determinado a partir de la estructura del péptido unido al canal) proporcionan también la base para el diseño racional de moduladores de los canales iónicos. Por otra parte, debido a que los péptidos inactivantes son promiscuos por su capacidad de inactivación de muchos canales diferentes y dado que la unión con el canal implica a múltiples puntos de interacción, parece factible que las mutaciones o deleciones de tales puntos deben dar lugar en un futuro a posibles fármacos capaces de lograr la selectividad hacia un gran número de canales activados por voltaje.

11.2 La inactivación de tipo N en KcsA muestra características muy similares al mecanismo de inactivación de tipo C

La posible implicación de la F103 en la diana de interacción del péptido inactivante ShB en el vestíbulo intracelular de KcsA junto a la asociación de la inactivación rápida al desacoplamiento funcional de los canales sugiere que el mecanismo de inactivación rápida o de tipo N podría compartir la misma vía de propagación alostérica hacia el filtro de selectividad que la inactivación de tipo C, pero acelerada por la interacción del péptido ShB en su diana.

En conjunto, estos resultados muestran características muy similares a la inactivación de tipo C de KcsA, que se caracteriza por **1)** una vía de propagación de cambios conformacionales iniciados en la F103 del vestíbulo intracelular a consecuencia de la apertura del inner gate que se transmiten hacia el filtro de selectividad produciendo la inactivación de tipo C (Cuello et al, 2010a y b), en concreto, estructuras cristalizadas de KcsA con el inner gate en diferente grado de apertura muestran que la flexión y rotación del TM2 en el inner gate provoca el movimiento de la F103 que se inclina hacia los aminoácidos T74 y T75 de la hélice del poro y hacia la I110 de la subunidad vecina, favoreciendo la interacción entre los aminoácidos de la triada W67-E71-D80 que desestabiliza el filtro de selectividad y provoca su entrada en el estado no conductor característico de la inactivación de tipo C (Cuello et al, 2010a; Cordero-Morales et al, 2006 y 2007); y **2)** la implicación directa de los aminoácidos de la triada en el mecanismo de acoplamiento funcional detectado en esta Tesis Doctoral sugiere que la inactivación de tipo C podría estar asociada al desacoplamiento funcional de los canales (Anexo).

Por tanto, los resultados permiten proponer una hipótesis del mecanismo de inactivación rápida o de tipo N por el péptido inactivante de *Shaker*, que podría ser extrapolado a sus homólogos eucariotas, que muestra características muy similares al conocido mecanismo de la inactivación de tipo C de KcsA y otros canales de potasio.

Existen datos en la bibliografía que apoyan la observación de que la inactivación de tipo N podría compartir la misma vía de propagación que la inactivación de tipo C. Así, la subunidad Kv β 1.1 acelera la inactivación tipo-N de los canales Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.4 y la tipo-C del canal Kv1.5; y las subunidades Kv β 1.2 y Kv β 1.3 aceleran tanto la inactivación tipo N como la C de los canales Kv1.4 (Hanlon and Wallace, 2002; Pourrier et al, 2003).

Esta hipótesis del mecanismo de inactivación rápida planteada en detalle engloba los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral y abre un camino para comprobarla en un futuro, así como hallar los determinantes moleculares clave que ejercen el efecto activante, de posible aplicación terapéutica para enfermedades que cursan con excitabilidad.

12. *Símil de los canales iónicos con un engranaje*

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que los canales de KcsA se abren de forma óptima en grupos de canales que interaccionan entre sí con apertura sincronizada o acoplada como si de un engranaje se tratara.

En el símil de los canales en contacto como un engranaje, los lípidos anulares se podrían corresponder con la grasa que facilita que el engranaje funcione correctamente, y los lípidos no anulares o un exceso de lípidos en sitios no anulares se podría corresponder con el exceso de grasa que causa que el engranaje resbale y el movimiento de una rueda no se transmita correctamente a la siguiente.



Figura 6. Símil de los canales iónicos con un engranaje.

Los canales, al igual que las ruedas, deben posicionarse correctamente entre sí para transmitir el movimiento de unos a otros de forma simultánea y eficiente. Una interacción no óptima entre los canales causaría que el movimiento de apertura de un canal no se transmita eficientemente al canal adyacente y se produzca un retraso en la apertura de éste, como el que observamos en los registros de tipo escalera. En este posicionamiento óptimo parecen contribuir los triptófanos mediante su interacción con los lípidos o con las proteínas adyacentes que se corresponderían con los dientes del engranaje, que transmiten el movimiento de una rueda a la siguiente, como la apertura de un canal se transmite al canal adyacente. La aplicación de péptido inactivante cierra los canales con actividad de tipo HOP en saltos de 20 pA, indicando que los canales se cierran de cinco en cinco, como un engranaje eficiente en el que con la aplicación de un freno en una sola rueda, dejan de moverse todas. El péptido inactivante sería el “freno” en este símil.

Ejemplos bien conocidos de proteínas de membrana y canales que funcionan como auténticas “máquinas moleculares” bien engranadas lo constituyen el flagelo bacteriano (Zhao et al, 2014) y el acoplón, conjunto de proteínas de membrana que forman las unidades funcionales de liberación de Ca^{2+} intracelular en el acoplamiento “excitación-contracción” de músculo cardíaco y esquelético (Ríos et al, 2015).

13. *Las subconductancias observadas en la actividad de los canales iónicos podrían corresponder a aperturas basadas en el acoplamiento funcional de los canales*

Desde un principio se ha asumido que los canales se abren de forma independiente (Sigworth, 1981), interpretando las subconductancias observadas en la actividad de los canales iónicos como aperturas parciales del poro, o incluso como procedentes de un canal compuesto por varias vías paralelas de conducción de iones (“co-canales”) (Krouse et al, 1986; Hunter and Giebisch, 1987); y en cambio, no se ha contemplado la posibilidad de que correspondan a aperturas de varios canales acoplados en su apertura.

La primera observación de corrientes de canal único fue realizada por Neher y Sakmann en 1976 y correspondía a corrientes del receptor de acetilcolina en fibras denervadas de músculo de rana. Las corrientes aparecían como pulsos rectangulares de igual amplitud. Con el incremento de la resolución en tiempo y amplitud de la técnica de patch-clamp (Hamill et al, 1981) se reconoció que las corrientes de canal único son más complejas. Así, Hamill y Sakmann (1981) observaron, en células de músculo de rata, que el receptor de acetilcolina mostraba múltiples conductancias de menor amplitud que el estado abierto principal. Las llamaron “subconductancias”. Además observaron que las subconductancias tenían mayor ruido que los estados completamente abierto y cerrado. Posteriormente, se han observado subconductancias en registros de alta resolución de otros múltiples canales iónicos, como canales de sodio, de potasio, de cloruro, etc.

Dado que los canales están formados por subunidades, donde cada una contribuye a la formación del poro, Chapman et al (1997) propusieron la hipótesis de que los niveles de subconductancia de los canales de potasio corresponde a conformaciones heteroméricas del poro, que producen aperturas parciales del poro del canal en el que algunas, no todas, las subunidades están en estado abierto. El número de subconductancias se relacionó, así, con el número de subunidades activadas (Chapman et al, 1997).

Esta hipótesis ha sido testada posteriormente mediante la construcción de un dímero en tándem que une dos subunidades de canales de potasio con sensores de voltaje de diferentes umbrales de activación. Fuertes despolarizaciones del potencial de membrana producían el comportamiento binario característico abierto-cerrado, mientras que despolarizaciones entre los umbrales de activación de las diferentes subunidades producían la apertura frecuente de dos niveles de conductancia intermedios entre el estado abierto y cerrado observado a mayores despolarizaciones. Estos dos niveles de subconductancia se asociaron con la activación de una y dos subunidades (Chapman y VanDongen, 2005).

En general, los niveles de subconductancias son mucho más frecuentes a potenciales denominados de la región umbral, donde la probabilidad de apertura del canal es pequeña. Bajo estas condiciones, sólo una o dos subunidades hacen la transición al estado activo. Esto lleva a proponer una hipótesis razonable que dice que los niveles intermedios son el resultado de canales que tienen una menor conductancia debido a que la vía de conducción de iones está formada sólo por una o dos de las subunidades en lugar de las cuatro requeridas para la conductancia completa. Los ajustes revelaron que el mejor modelo requiere que las subconductancias sean canales

parcialmente activados donde uno o dos sensores están activados y las constantes de velocidad de apertura y cierre dependen del número de subunidades activadas (Bezanilla, 2005).

Zheng y Sigworth (1997, 1998) describieron niveles intermedios de subconductancias en mutantes del canal de potasio *Shaker* y encontraron que dichos subniveles tenían diferente selectividad que el estado completamente abierto del canal.

Además, Zheng y Sigworth (1998) proponen por primera vez la existencia de dos puertas de activación en el canal de potasio *Shaker*, una relacionada con el filtro de selectividad y otra relacionada con el haz de hélices del S6 intracelular. Dos evidencias principales sugerían la existencia de la puerta del filtro de selectividad. En primer lugar, la observación del grupo de Sigworth de que el mutante de *Shaker* W434F produce un canal predominantemente en estado inactivado por inactivación de tipo C (Yang et al, 1997). El W434 en *Shaker* equivale al W67 en KcsA y su mutación W67F también provoca que el canal se inactive rápidamente (Cordero-Morales et al, 2011), además muestra actividad principalmente desacoplada, según observamos en esta Tesis Doctoral (Anexo). Y en segundo lugar, como se dice en Blunck et al (2006), las indicaciones más fuertes de un mecanismo de apertura y cierre en el filtro de selectividad es la existencia de niveles de subconductancias al inicio de las aperturas y durante la desactivación de drk1 (Chapman et al, 1997) y en el mutante de *Shaker* T442S (Zheng and Sigworth, 1997, 1998), donde T442 equivale a T75 en KcsA. Posteriormente Blunck et al (2006) detectan, efectivamente, dos puertas de conducción en el canal de potasio KcsA.

Los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral sobre la apertura y cierre de la puerta extracelular de KcsA, apoyados por múltiples evidencias de la bibliografía, sugieren que lo que en un origen se ha interpretado como "subconductancias" en muchos canales o receptores, en una buena parte de los casos podrían corresponder en realidad a aperturas de varios canales acoplados funcionalmente.

Teniendo esta posibilidad en mente, tras realizar una revisión extensa y en detalle de la bibliografía existente sobre el origen de las subconductancias en diferentes canales, desde que por primera vez fueran observadas por Hamill y Sakmann (en 1981) gracias a la mejora de la resolución de la técnica de patch-clamp (Hamill et al, 1981), así como de bibliografía que incluye registros de canales iónicos a nivel de canal único, se llega a la conclusión de que la mayoría de los registros se podrían interpretar a través de una apertura acoplada de los canales, mediante dos mecanismos principales: **1)** En la mayoría de los casos, no se puede descartar que lo que se interpreta como diferentes subconductancias correspondan en realidad a aperturas de varios canales acoplados, y **2)** en otros casos, donde las subconductancias podrían, efectivamente, corresponder a aperturas parciales de un canal debidas a las subunidades activadas en estado abierto, no se puede descartar que dichas aperturas parciales no sean inducidas por la interacción con canales adyacentes acoplados funcionalmente.

Un ejemplo destacado del primer caso, en el que las subconductancias podrían corresponder en realidad a la apertura de varios canales acoplados, lo vemos en el propio canal de potasio *Shaker*, donde se detectó que las subconductancias tienen selectividades iónicas diferentes a la conductancia principal (Zheng y Sigworth 1997, 1998), al igual que nosotros observamos bloqueo por sodio en LOP pero no en HOP.

Y un ejemplo del segundo caso, en el que las subconductancias podrían corresponder a aperturas parciales de un canal inducidas por las subunidades que contactan con canales adyacentes, lo constituyen los propios registros de tipo escalera de KcsA (Molina et al, 2006). Aquí observamos que los canales se abren sucesivamente uno tras otro y, visto en detalle, se observa que la apertura completa de un nuevo canal depende de la presencia de una subconductancia (ver Avances relevantes), que podría corresponder a la activación de una o dos subunidades del canal adyacente, en concordancia con los datos de Chapman y VanDongen (2005), pero que comprobamos que está asociada al acoplamiento funcional entre los canales.

Además, hay ejemplos que apoyan que las subconductancias proceden de aperturas parciales del poro, por conformaciones heteroméricas de las subunidades del canal de potasio (Chapman y VanDongen, 2005), que se pueden explicar incluso mejor por el acoplamiento funcional entre los canales, donde la conformación abierta de cada subunidad podría ser inducida por un canal adyacente.

Dadas las múltiples evidencias actuales de agrupación y acoplamiento funcional de proteínas de membrana (Tabla 6 del Apéndice), estas dos interpretaciones del origen de las “subconductancias” basadas en el acoplamiento funcional de los canales (bien correspondientes a varios canales acoplados, o bien correspondientes a aperturas parciales del filtro por acoplamiento de una o varias subunidades con canales adyacentes) podrían explicar más casos de “subconductancias” que la interpretación clásica de subestados basados en una apertura independiente de los canales.

Desde un principio, en la historia de la interpretación de las corrientes de canal único se ha asumido que los canales y receptores se abren de forma independiente (Sigworth, 1981), y ello ha llevado a desarrollar metodologías para aislar los canales y estudiar su actividad de canal único. Pero la creciente evidencia de que los canales en general podrían funcionar acopladamente o estar modulados por la interacción directa con otros canales sugiere que el estudio de la actividad de los canales individuales podría dar lugar a una interpretación errónea de muchos resultados sobre el funcionamiento de los canales iónicos. Este tema es importante, dado que las diferentes ecuaciones que se están utilizando para el análisis de canales iónicos en general (Apéndice 3), se han desarrollado asumiendo una apertura independiente de los canales y, por lo tanto, podrían no ser totalmente aplicables si se tiene en cuenta el funcionamiento acoplado de los canales iónicos.

En este punto merece destacar el sorprendente hallazgo de que la dinámica de iniciación del potencial de acción en algunas neuronas es demasiado rápida para ser explicada por un comportamiento independiente de los canales de sodio, como postula la teoría clásica de Hodgking-Huxley (Naundorf et al, 2006); en cambio, un nuevo modelo basado en un comportamiento cooperativo de los canales de sodio reproduce la dinámica de iniciación del potencial de acción observada y experimentos in vitro confirman esta predicción, apoyando la hipótesis de que la dinámica de la iniciación del potencial de acción en las neuronas corticales se produce por la activación acoplada de los canales de sodio (Naundorf et al, 2006).

Y por último, dada la recientemente descubierta organización de la membrana plasmática en “patchwork membrane” o membrana en multidominios auto-organizados (Spira et al, 2012; Mueller

et al, 2012), apoyado por la detección de multitud de canales cuya agrupación modula su actividad (Tabla 6 del Apéndice), es esperable que el acoplamiento estructural y funcional entre canales de membrana sea un mecanismo de organización generalizado.



14. *Traslación de los resultados en moléculas moduladoras, dianas y estrategias farmacológicas para el diseño de moléculas moduladoras de canales iónicos*

La investigación traslacional consiste en facilitar la transferencia del conocimiento generado por la investigación básica en aplicaciones clínicas que redunden en beneficio de la salud y de la calidad de vida, y esta Tesis Doctoral realiza varias contribuciones en ese sentido.

El conocimiento generado en la realización de esta Tesis Doctoral sobre la modulación funcional del canal de potasio procarriota, KcsA, uno de los canales de potasio de referencia para entender cómo funcionan los canales eucariotas, nos ha permitido descubrir moléculas que nos permiten modular los canales, activándolos o inactivándolos a voluntad, y revelar posibles dianas y estrategias para diseñar moléculas que permitan modular los canales (ver Avances Relevantes).

Dado que el funcionamiento acoplado de KcsA podría ser un mecanismo generalizado en el funcionamiento de canales y receptores de membrana, como los que están siendo objeto de estudio para el desarrollo de nuevos fármacos por su importante papel como diana farmacológica, las moléculas descubiertas y las estrategias reveladas para modular los canales de KcsA podrían tener una importante aplicación en canales, receptores y proteínas de membrana eucariotas en la búsqueda de nuevos fármacos en beneficio de la salud y de la calidad de vida.

Se han obtenido dos tipos de moléculas moduladoras, una estrategia farmacológica, y una diana farmacológica que nos permitirían modular la actividad de canales y proteínas de membrana:

1-Molécula moduladora: Péptido activador de canales de potasio, pendiente de patente, que aplicado tópicamente podría tratar la artritis reumatoide en corto plazo, así como prevenir daños en las articulaciones y mejorar la movilidad de personas que ejercitan mucho, como deportistas. Además, podría ser un fármaco neuroprotector ideal para el tratamiento de enfermedades con hiperexcitabilidad celular o neurodegenerativas como: dolor, epilepsia, hipertensión pulmonar y arterial, diabetes, esquizofrenia, etc, carentes de tratamiento efectivo en la actualidad.

2-Estrategia farmacológica: Diseño de péptidos inhibidores o activadores, basados en la prevención de la interacción no deseada de proteínas que produce determinadas patologías. Estos péptidos, basados en la metodología de los péptidos anticlusters (ver Avances Relevantes), podrían ser los cabezas de serie que podrían ser desarrollados como posibles tratamientos específicos o como estrategias preventivas para las patologías basadas en la agregación de proteínas, como las enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington, etc), cáncer, dolor, artritis reumatoide, aterosclerosis, patologías auditivas, asma, neumonía, para promover la regeneración axonal, prevención de cataratas, Diabetes de tipo II, etc.

3-Diana farmacológica: Sitios no anulares específicos de canales y proteínas de membrana, de posible unión a lípidos aniónicos, como posibles dianas moduladoras de la actividad de canales y proteínas de membrana en general a través de la modulación de su agrupación y su acoplamiento funcional.

4-Molécula moduladora: Moléculas (lípidos o péptidos) específicas de sitios no anulares de canales y proteínas de membrana en general, potencialmente moduladores de su actividad.



CONCLUSIONES/

CONCLUSIONS





CONCLUSIONES

1-Se determinó que la región de hélices cruzadas del C-terminal, y más críticamente la secuencia 120-124, ERRGH, está implicada en la tetramerización de KcsA. El modelaje molecular predice que esta región podría establecer hasta 5 enlaces por puente de hidrógeno con el N- y C-terminal de la subunidad adyacente.

2-Se ha descrito la capacidad de modulación de la actividad de KcsA mediante la agrupación y el acoplamiento funcional de los canales. Mediante patch-clamp de parche escindido de liposomas gigantes que contenían KcsA purificado se han obtenido dos principales patrones de actividad diferentes: uno que denominamos de tipo LOP (del inglés, Low Opening Probability), que muestra muy baja probabilidad de apertura y las características típicas descritas para KcsA en bicapas planas, como su rectificación de salida, bloqueo por Na^+ intracelular y su dependencia de pH ácido intracelular para su apertura; y otro que denominamos de tipo HOP (del inglés, High Opening Probability), que muestra elevada probabilidad de apertura, bien con actividad simétrica a voltajes positivos y negativos, o bien con rectificación de entrada, que se abre a pH ácido y neutro y no se bloquea por Na^+ .

3-La diversidad funcional observada se correlaciona con la observación de agrupaciones de canales de KcsA. Así, todos los tipos de actividad LOP y HOP parecen estar compuestos por diferentes agrupaciones del canal unitario KcsA, que resulta ser un canal óhmico de 26 pS aprox. Los eventos del patrón LOP corresponden a aperturas de canales individuales o acopladas de grupos pequeños de menos de cinco canales, siendo predominantes las aperturas de dos canales acoplados. Los eventos del patrón HOP corresponden a aperturas acopladas frecuentemente de cinco canales acoplados dentro de una agrupación mayor.

4-Se obtienen agrupaciones de KcsA solubilizado incluso en detergente, pero las agrupaciones pasan a ser predominantes frente a los canales individuales cuando se reconstituyen en membranas, incluyendo liposomas gigantes, donde algunos de los grupos son lo suficientemente grandes (hasta varias micras de tamaño) para ser observados por microscopía confocal. El detergente produce disociación reversible de las agrupaciones, siendo el dímero de canales bastante resistente a su disociación en canales individuales indicando que los canales individuales junto con los dímeros son, probablemente, los bloques básicos de construcción de grupos más grandes.

5-Los cambios en las propiedades de conducción (P_o , dependencia con el voltaje) y selectividad (K^+/Na^+) del canal cuando está aislado (LOP) y cuando está acoplado en agrupaciones (HOP) indican que el filtro de selectividad tiene una estructura diferente en uno u otro estado, que sugiere una plasticidad del poro en función de su estado de agrupación.

6-En cuanto a los dominios de la proteína implicados en la agrupación de KcsA, hemos observado la disociación de los mismos por alquilsulfatos como el SDS. Dado que estas moléculas se unen a sitios no anulares localizados entre las subunidades del canal, estos resultados indican que los sitios no anulares también median interacciones entre canales implicadas en la formación de agrupaciones.

7-La competencia entre interacciones lípido-proteína y proteína-proteína en el sitio no anular determina la agrupación y los patrones de actividad de KcsA mediante la modulación de la triada de inactivación W67-E71-D80 y su relación con el filtro de selectividad. Así, la interacción con lípidos aniónicos, donde la R64 está fuertemente implicada, impide la formación de agrupaciones resultando en canales individuales o principalmente unidos a lípido, y permite la asociación de la triada de inactivación W67-E71-D80 que induce la conformación no conductora del filtro de selectividad y deja al canal propenso a inactivarse, como se observa en la actividad de tipo LOP. Por el contrario, la interacción con otros canales desplaza al W67 de la triada de inactivación, y permite la internalización de la R89 para interactuar con E71 y D80. Esto predice una disociación completa y estable de la triada que induce la conformación conductora del filtro de selectividad y resulta en canales agrupados que no se inactivan, como se observa en la actividad de tipo HOP.

8-Los estudios de mutagénesis y de modelado molecular indican una implicación directa de los aminoácidos de la triada de inactivación W67-E71-D80 en el mecanismo de acoplamiento funcional, de forma que la inactivación de tipo C podría estar asociada al desacoplamiento funcional de los canales. Así, la disociación estable de las triadas de una forma directa y recíproca entre los múltiples canales agrupados, podría explicar el acoplamiento funcional observado.

9-El contacto directo entre canales en la agrupación induce la estabilización del estado abierto del filtro de selectividad que otorga la elevada P_o a pH neutro fisiológico del patrón de actividad de tipo HOP de KcsA. Por tanto, estos resultados sugieren que el estímulo nativo específico que abre el canal KcsA en condiciones fisiológicas podría ser el contacto de KcsA con otros canales KcsA.

10-La inactivación rápida o de tipo N del canal procariota KcsA por el péptido inactivante del canal de potasio eucariota *Shaker* B, el péptido ShB, confirma la homología estructural de KcsA con el canal de potasio *Shaker*, y muestra que el mecanismo de inactivación rápida incluye, además, el desacoplamiento funcional de los canales.

11-Mediante espectroscopía de infrarrojo se determinó que el péptido ShB adopta estructura en horquilla β cuando se une a su diana en el canal, y que dicha estructura en horquilla β es necesaria para producir la inactivación rápida. Los datos de STD-RMN indican que el epítipo con el que el péptido ShB interactúa con su diana en KcsA está formado, en su región hidrofóbica, por los protones orto y meta de la Y8 y los protones metilo de la V4, L7 y L10; y en su región polar, por el C4H del anillo imidazol de la H16 y los protones amino de la cadena lateral de la K18 y/o K19. Además, el “docking” del péptido ShB en horquilla β con el vestíbulo intracelular de un modelo de KcsA abierto para simular el complejo inactivante péptido/canal, predice interacciones que concuerdan con las observaciones experimentales anteriores y sugiere que la diana de interacción contiene un bolsillo hidrofóbico formado principalmente por el anillo aromático de la F103 y la T107 situado justo debajo del filtro de selectividad.

12-La agrupación y el acoplamiento funcional de KcsA observado en esta Tesis Doctoral, respaldado por la revisión bibliográfica de numerosos canales y receptores aparentemente afectados por un fenómeno similar, así como por la detección de la organización general de la membrana en grupos de proteínas, denominada “patchwork membrane”, indica que el fenómeno de agrupación y acoplamiento funcional pudiera ser una propiedad intrínseca de los canales iónicos y receptores de membrana en general.

CONCLUSIONS

1-The lack of the cytoplasmic C-terminal domain of KcsA, and most critically the 120-124 sequence stretch ERRGH, impairs tetrameric assembly of channel subunits in a heterologous *E. coli* expression system. Molecular modelling of KcsA predicts that, indeed, such sequence stretch provides intersubunit interaction sites by hydrogen bonding to amino acid residues in N- and C-terminal segments of adjacent subunits.

2-The activity of KcsA is modulated through the clustering and functional coupling of the channels. We have observed two main different activity patterns by patch clamping excised membrane patches from reconstituted giant liposomes containing purified KcsA. The first and more frequent pattern has a characteristic low channel opening probability (LOP pattern) and exhibits many other features reported for KcsA reconstituted into planar lipid bilayers, including an outward rectification, blockade by Na⁺, and a strict dependence on intracellular acidic pH for channel opening. The second activity pattern is characterized by a high channel opening probability (HOP pattern), with different voltage dependence, either showing symmetrical activity to positive and negative voltages or inward rectification, channel opening at neutral and acidic pH, and lack of Na⁺ blockade.

3-The above functional diversity occurs correlatively to the heterogeneous supramolecular assembly of KcsA into clusters. The gating event in the LOP pattern corresponds to individual channels, which turns out to be an ohmic channel of about 26 pS, or to the positive coupling of small clusters containing more often two coupled channels. The predominant gating event in the HOP pattern corresponds to the positive coupling of mostly five channels operating within a larger cluster.

4-Clusters were found even in detergent-solubilized KcsA, but become a predominant phenomena upon reconstitution into membranes, including giant liposomes, where some of the clusters are large enough (up to micrometer size) to be observed by confocal microscopy. Detergent produces reversible dissociation of clusters, being the dimer of channels quite resistant to dissociation into single channels. This indicates that the single channels along with channel dimers are likely the basic building blocks of larger clusters.

5-Changes in conduction properties (Po, voltage-dependence) and selectivity (K⁺/Na⁺) of the channel when isolated (LOP) and when assembled into large clusters (HOP) indicates that the selectivity filter has a different structure in both states, and suggests a pore plasticity depending on their degree of clustering.

6-As to the proteins domains involved in clustering, we have observed disassembly of KcsA clusters by SDS-like alkyl sulfates. As these amphiphiles bind to inter-subunit, “non-annular” sites on the protein, these observations suggest that such sites also mediate channel–channel interactions leading to cluster assembly.

7-Competition between lipid-protein and protein-protein interactions at the non-annular sites of KcsA determines both, the occurrence of clustering and the changes in gating behaviour. The latter changes seemingly result from interfering with the assembly of the W67-E71-D80 inactivation triad and

its bearing on the selectivity filter. Thus, the interaction with the anionic phospholipid, in which R64 is heavily involved, impedes cluster assembly resulting in individual, mostly lipid-bound channels, and leaves W67, E71 and D80 residues free to form the inactivation triad that leaves the channel prone to inactivate, as in the LOP pattern of channel activity. On the contrary, channel-channel interaction in cluster assemblies displaces W67 from the inactivation triad and allows R89 to enter into the channel core by interacting with E71 and D80. This predictably stabilizes the dissociation of the triad, which induces the conductive conformation of the selectivity filter, resulting in clustered channels quite unable to inactivate, as in the HOP activity pattern.

8-Mutagenesis and molecular modelling studies suggest a direct involvement of the inactivation triad W67-E71-D80 in the functional coupling mechanism, indicating that C-type inactivation could be associated with functional uncoupling of channels. Thus, the stable dissociation of triads in a reciprocal basis between multiple adjacent channels, could explain the observed functional coupling of the clustered channels.

9-Direct contact between clustered channels induces the stabilization of the selectivity filter in the open state to produce the high P_o at physiological pH of the HOP activity pattern in KcsA. Therefore, these results suggest that the specific native KcsA stimulus that opens the channel under physiological conditions is the contact of KcsA with other KcsA channels.

10-The effects of the inactivating peptide from the eukaryotic *Shaker* B K^+ channel (the ShB peptide) on the prokaryotic KcsA channel confirm the structural homology of KcsA with *Shaker* potassium channel and, in addition, show that N-type inactivation in KcsA includes functional uncoupling of channels gating.

11-Fourier transform infrared spectroscopy of KcsA suggests that the ShB peptide adopts a β -hairpin structure when bound to its target in the KcsA channel and that such β -hairpin structure should be required to produce the inactivation. Saturation transfer difference (STD) NMR methods indicate that the binding epitope with which the ShB peptide interacts when bound to KcsA, involves the ortho and meta protons of Y8; the C4H in the imidazole ring of H16; the methyl protons of V4, L7, and L10 and the side chain amine protons of one, if not both, the K18 and K19 residues. In addition, docking such a β -hairpin structure into the intracellular vestibule of an open model of KcsA to simulate the inactivating peptide/channel complex predicts interactions well in agreement with the experimental observations and suggests that the target of the ShB peptide includes a hydrophobic pocket formed mainly by the aromatic ring of F103 and T107 situated just below of the selectivity filter.

12-Clustering and functional coupling of KcsA described in this thesis, along with numerous reports on the literature on other channels and receptors apparently affected by a similar phenomenon, along with the proposal of the general membrane organization in clustered proteins, called "patchwork membrane", indicates that the phenomenon of clustering and functional coupling could be a general feature intrinsic to ion channels and membrane receptors.

REFLEXIÓN FINAL





REFLEXIÓN FINAL

Esta Tesis Doctoral se inició con la puesta a punto de los sistemas de expresión, purificación y reconstitución del canal de potasio KcsA; se comenzó con el estudio de la tetramerización de KcsA; seguidamente se llevó a cabo su caracterización funcional, mediante medidas de patch-clamp en parche escindido de membrana de liposomas gigantes que contenían KcsA purificado, observándose una sorprendente capacidad de modulación de su actividad funcional por agrupación y acoplamiento funcional; se continuó con la determinación de elementos claves implicados en la agrupación y el acoplamiento funcional; se determinó el papel de los lípidos aniónicos en la modulación de su actividad mediante una competencia de interacciones lípido-proteína y proteína-proteína ofreciendo una hipótesis que explica el mecanismo de gating de la actividad de tipo LOP, de tipo HOP y el acoplamiento funcional; y finalmente se estudió la inactivación de KcsA por el péptido inactivante de *Shaker* concluyéndose con el descubrimiento de posibles nuevos fármacos, dianas y estrategias farmacológicas.

La conclusión más importante de esta Tesis Doctoral radica en el descubrimiento de que los canales se abren de forma óptima a pH fisiológico cuando están altamente agrupados y acoplados funcionalmente, y en cambio, cuando están individuales o en grupos pequeños necesitan pH ácido para poder abrirse con una extremadamente baja probabilidad de apertura. Esto indica que el estímulo nativo que abre KcsA en condiciones fisiológicas podría ser el estar rodeado de otros KcsA.

La propiedad intrínseca de agrupación y acoplamiento funcional de KcsA observado en esta Tesis Doctoral, respaldado por la revisión bibliográfica de numerosos canales y receptores afectados por el mismo fenómeno, así como por la detección de la organización de la membrana en grupos de proteínas organizados, denominada "patchwork membrane", indica que el fenómeno de agrupación y acoplamiento funcional pudiera ser una propiedad generalizada intrínseca de los canales iónicos y receptores de membrana.

El canal individual se ha considerado clásicamente como la unidad funcional, dado que supuestamente contiene todos los elementos necesarios para poder funcionar. Pero, dado que un canal individual de KcsA no es capaz de abrirse de forma estable, sino que necesita de canales adyacentes que estabilicen su apertura, se puede decir que la unidad funcional necesita de retroalimentación para ser completamente funcional. Por tanto, la unidad funcional podría no ser un canal individual, sino que podría ser una red de canales, donde cada subunidad de cada canal interacciona con un canal adyacente.

Existen muchas evidencias de agrupación y acoplamiento funcional entre canales de membrana, pero el mecanismo de acoplamiento entre los canales es desconocido. Aquí, nosotros somos los primeros que proponemos un mecanismo de interacción proteína-proteína mediante el cual la interacción de una proteína podría modular la actividad de la proteína adyacente.

La siguiente conclusión importante es el evidente cambio de las propiedades de conducción (P_o , sensibilidad al pH, dependencia con el voltaje) y selectividad (K^+/Na^+) del canal cuando está aislado (LOP) y cuando está agrupado (HOP). Este cambio implica una flexibilidad del filtro de

selectividad, una plasticidad del poro en función de su estado de agrupación, de forma que la agrupación podría inducir el aumento del diámetro del filtro de selectividad explicando los cambios de selectividad detectados en LOP y en HOP. Un efecto similar se ha detectado en los canales Kir, donde la ruptura de los aminoácidos equivalentes a la triada aumenta la flexibilidad del poro aumentando el diámetro del filtro de selectividad que provoca un cambio en la selectividad y en la rectificación de los canales (Dibb et al, 2003).

Una reflexión importante es el hallazgo de que todos los mecanismos de modulación de los canales de KcsA conocidos hasta ahora (mediante iones, pH, lípidos o péptidos) parecen ejercer su efecto mediante un mismo fenómeno: el acoplamiento o desacoplamiento de los canales que produce la activación o inactivación de los mismos.

La evidencia posterior del hallazgo que apunta a que todas las proteínas de membrana, incluyendo canales y receptores, están agrupados indica que este mecanismo de acoplamiento funcional podría ser más generalizado de lo que comúnmente se piensa.

Esto tiene implicaciones importantes en el estudio de los canales iónicos, dado que las ecuaciones que se utilizan para la interpretación de las corrientes iónicas están basadas en la asunción de que los canales se abren de forma independiente, y este estudio junto con las múltiples evidencias de la bibliografía muestra que podría no ser así.

Los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral sobre el gating de la puerta extracelular de KcsA, apoyados por las múltiples evidencias de la bibliografía de agrupación y acoplamiento funcional de proteínas de membrana, sugieren que lo que en un origen se ha interpretado como "subconductancias" de los canales en general debidas a aperturas parciales del poro en la apertura independiente de los canales, podrían corresponder en realidad a aperturas basadas en el acoplamiento funcional de los canales, en unos casos, correspondientes a varios canales acoplados, y en otros casos, correspondientes a aperturas parciales del filtro por acoplamiento de una o varias subunidades con canales adyacentes.

Se alerta, por tanto, la necesidad de tener en cuenta la posibilidad del funcionamiento acoplado de los canales, tanto en las ecuaciones aplicadas como en el análisis e interpretación de los registros de corrientes y de los resultados en la actividad y comportamiento de los canales, receptores y proteínas de membrana en general, en lugar de asumir un funcionamiento independiente de los canales.

Por ello, acabo la reflexión final de esta Tesis Doctoral enfatizando la necesidad de estudiar las proteínas de membrana, no como moléculas individuales, sino como moléculas agrupadas, dado que es preferentemente así como se encuentran en su entorno natural. Dicho estudio debería aplicarse a las diversas tecnologías y técnicas de estudio de las proteínas de membrana, tanto a nivel estructural (cristalización, etc.) como funcional (electrofisiológico, etc.), así como tenerse siempre en cuenta en la interpretación de los resultados.

El “milagro” de la vida

La extrema rapidez con la que acontecen los procesos biológicos en los organismos vivos, observados en su máxima expresión, por ejemplo, en el desarrollo de un feto, o en el propio pensamiento, implican una serie de reacciones moleculares en las que están implicados los canales iónicos a tal velocidad que es difícil pensar que dependan de la apertura al azar de los canales iónicos.

En cambio, la formación de agrupaciones de canales iónicos en íntimo contacto y su funcionamiento acoplado o cooperativo parece una estrategia razonable para garantizar una eficiente y óptima vía de señalización mediada por canales iónicos en respuesta a los estímulos apropiados.

Ya lo decía Leonardo da Vinci (1452-1519) en sus *“Principios para el desarrollo de una mente completa: Estudiar la ciencia del arte. Estudiar el arte de la ciencia. Desarrollar tus sentidos, especialmente aprender a ver. Darse cuenta de que todo está conectado con todo lo demás.”*





PERSPECTIVAS FUTURAS





PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir de los datos obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral, en primer lugar, se prevee la transformación en artículos científicos de muchos de los resultados incluidos en el apartado de Avances Relevantes, la mayoría de los cuales están ya como manuscritos en preparación; y en segundo lugar, se abren nuevas líneas de investigación, tanto básica para contribuir al conocimiento del funcionamiento y la modulación de los canales iónicos, como traslacional, aplicada a la generación de moléculas bioactivas susceptibles de patente.

En primer lugar, se resume los manuscritos en preparación cuya publicación podría llevarse a cabo en breve:

- 1) La publicación de los resultados que muestran que la acidificación modula la actividad de KcsA mediante el desacoplamiento funcional y físico de las agrupaciones de canales.
- 2) La publicación de los resultados sobre el estudio del papel del N- y el C-terminal en la agrupación y actividad acoplada de KcsA.
- 3) La publicación de los resultados de comprobación de la hipótesis del mecanismo de gating que explica la actividad de tipo HOP y el funcionamiento acoplado de KcsA.
- 4) La publicación de una posible nueva estrategia farmacológica de modulación funcional de canales, receptores y proteínas de membrana específicos basada en péptidos anticluster.
- 5) La publicación y posible patente del descubrimiento de un péptido activante de canales de potasio que podría ser la base para el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades que cursan con hiperexcitabilidad celular.
- 6) La publicación del descubrimiento de una etapa de activación inicial en el mecanismo de inactivación rápida por el péptido inactivante de *Shaker B*, ShB.

Y en segundo lugar, se resumen las líneas futuras de investigación surgidas a partir de los datos obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral:

- 1) Las observaciones en la diferente sensibilidad al pH y al bloqueo por Na^+ entre los patrones HOP y LOP indican que algunas de las típicas propiedades publicadas de KcsA pueden cambiar bastante dramáticamente cuando está en conformación HOP. Por ello, nuestros resultados no otorgan a la estructura cristalizada de KcsA un papel relevante para explicar la conducción de K^+ porque comprobamos una plasticidad del poro en función del estado de agrupación del canal.

Estos resultados sugieren que las propiedades de conducción varían en función del acoplamiento funcional de los canales y no se corresponde con una estructura fija del filtro de selectividad. Así, las interacciones entre canales adyacentes en agrupaciones con actividad de tipo HOP estabilizan el filtro de selectividad de forma que responde de forma diferente a los iones presentes en el medio. Es importante hallar qué tipo de interacciones cambian en el filtro de selectividad como

consecuencia de la agrupación de los canales para poder entender mejor las propiedades de conducción y selectividad de los canales.

Por ello, caracterizar en un futuro la actividad de tipo LOP y HOP en presencia de diferentes moléculas e iones, y la mutagénesis dirigida de aminoácidos del filtro de selectividad permitirá una mejor caracterización de las propiedades de conducción y selectividad de los canales.

- 2) Cristalizar KcsA en estado agrupado en un entorno lipídico. Nuestros datos obtenidos por modelaje y por electrofisiología sugieren que el filtro tiene una estructura diferente en estado individual (LOP) y en estado agrupado (HOP), y muestran una plasticidad del poro en función de su estado de agrupación, de forma que la agrupación podría inducir el aumento del diámetro del filtro de selectividad explicando los cambios de selectividad detectados en LOP y en HOP. La cristalización de KcsA en estado agrupado en un entorno lipídico permitirá hallar las propiedades de conducción y selectividad del canal agrupado.
- 3) Comprobación de la hipótesis del mecanismo de gating de tipo HOP y del acoplamiento funcional propuesto en esta Tesis Doctoral, así como el posible papel del D80 y la Y82 en la transmisión de la apertura de la triada W67-E71-D80 al estado abierto no inactivante del filtro de selectividad. Mediante mutagénesis dirigida y la cristalización bidimensional de KcsA en membrana de lípidos funcionales se podrá discernir si se produce la interacción “horaria” entre los canales predicha por el modelo de docking o la interacción “antihoraria” predicha por el modelo basado en TrkH. Múltiples evidencias de agrupaciones entre canales eucariotas, como la detección de la “patchwork membrane” (Spira et al, 2012), la predicción del docking entre canales eucariotas y la implicación de la triada también en el gating de canales eucariotas (Cordero-Morales et al, 2011) sugiere que el mecanismo que explica la estabilización del estado abierto y el acoplamiento funcional en KcsA podría ser extensivo a canales eucariotas.
- 4) Dilucidar con más exactitud las regiones y aminoácidos de los N- y C-terminales implicados en la interacción entre canales que estabilizan el acoplamiento funcional.
- 5) Desarrollo de la prometedor estrategia farmacológica de modulación funcional de canales basada en moléculas anticluster específicas de canales, receptores y proteínas de membrana eucariotas. Resultados preliminares desarrollados durante esta Tesis Doctoral muestran que péptidos anticluster diseñados para interferir en la región de interacción sugerida por los modelos entre canales de KcsA son capaces de disociar las agrupaciones y reducir la actividad de KcsA por desacoplamiento funcional de los canales.

La amplia bibliografía existente de evidencias de agrupaciones entre canales, receptores y proteínas de membrana eucariotas (Lillemeier et al, 2006; Spira et al, 2012) indica que las interacciones entre canales, receptores o proteínas de membrana podrían ser utilizadas como una nueva diana farmacológica, y el desarrollo de moléculas anticluster específicas de cada canal, receptor o proteína de membrana como una posible nueva estrategia para el descubrimiento de fármacos (manuscrito en preparación).

De hecho, péptidos equivalentes a los péptidos anticluster de esta Tesis Doctoral han permitido comprobar que la formación de agrupaciones es necesaria para la función del transportador

humano de aniones orgánicos (hOAT1). El transportador humano, hOAT1, que juega un papel crítico en la disposición corporal de fármacos de importancia clínica, como los anti-HIV, anti-tumorales, antibióticos, anti-hipertensivos, y anti-inflamatorios, existe en la membrana plasmática como homooligómero, posiblemente trímeros u oligómeros de mayor orden de magnitud (Hong et al, 2005). Posteriormente, el mismo grupo comprobó (mediante crosslinking con BS3 visualizado en SDS-PAGE y mediante coimmunoprecipitación) que un péptido con la secuencia de un segmento transmembrana del propio transportador impide la formación de agrupaciones, su transporte a la membrana y su actividad (Duan et al, 2011).

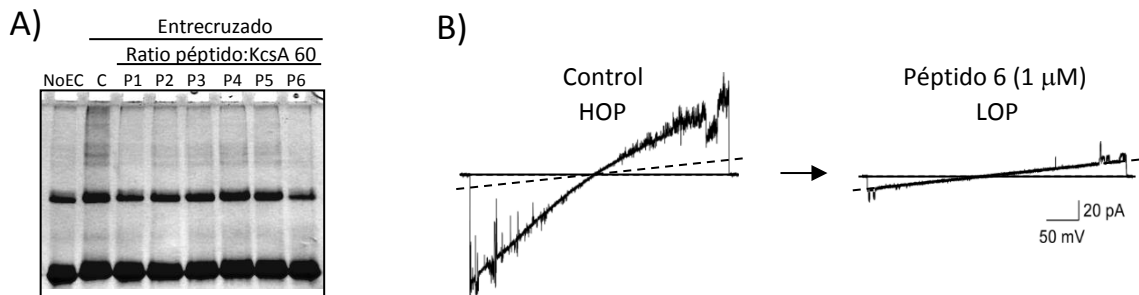


Figura X. Los péptidos anticluster disocian las agrupaciones y desacoplan funcionalmente los canales de KcsA. A) SDS-PAGE al 7,5 % de KcsA reconstituido en asolectina (L/P 500) y entrecruzada con 0,005% de glutaraldehído en presencia de péptidos anticluster (numerados de P1 a P6) a una relación molar péptido:KcsA (tetrámero) de 60. “noEC” = proteína sin entrecruzar; “C” = control, KcsA entrecruzada sin péptidos. **B)** Registros de KcsA en asolectina mediante rampas de voltaje procedentes de un mismo sello en ausencia (izquierda) y en presencia de 1 μM de péptido 6 (derecha). Rampas registradas en el rango de ± 200 mV. Las líneas discontinuas indican el nivel cerrado de los canales.

- 6) El trasplante de KcsA en membranas de ovocitos abre un camino alternativo al sistema de patch-clamp utilizado en esta Tesis para estudiar la actividad de tipo HOP de KcsA a pH 7 fisiológico y el efecto de moléculas potencialmente moduladoras, como los péptidos anticluster o análogos a los lípidos aniónicos, que, a diferencia del patch-clamp, pueden ser fácilmente aplicados tanto en la cara extracelular como intracelular.

De hecho, en etapas tempranas de la realización de esta Tesis Doctoral se comprobó la actividad de KcsA reconstituido en vesículas de asolectina y transplantado en membranas de ovocitos. Para ello, se siguió un protocolo similar al optimizado para el receptor de acetilcolina (Morales et al., 1995). Mediante inmunoblot anti-HIS se detectó en la membrana de ovocitos y se comprobó la obtención de corrientes a pH 7 supuestamente procedentes de KcsA tras la aplicación de un protocolo de voltajes despolarizantes. La creencia inicial de que KcsA sólo se abría a pH ácido hizo desestimar estos experimentos.

- 7) Diseño de péptidos inhibidores diversos, basados en la prevención de la interacción no deseada de proteínas, que producen determinadas patologías. Estos péptidos, basados en la metodología de los péptidos anticluster serían los cabezas de serie que podrían ser aplicados como posibles tratamientos específicos o como estrategias preventivas para las patologías basadas en la agregación de proteínas, como las enfermedades neurodegenerativas, cáncer, dolor, artritis reumatoide, aterosclerosis, patologías auditivas, asma, neumonía, para promover la regeneración axonal, prevención de cataratas, Diabetes de tipo II, etc.

Se ha demostrado que las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), implican la formación de agregados de proteínas patogénicas que pueden propagarse de célula a célula, de forma similar a las enfermedades priónicas (como la enfermedad de las vacas locas y su homólogo humano, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), en los que proteínas mal plegadas perjudiciales se propagan a través de largas distancias y causan que otras moléculas se plieguen inadecuadamente (Pecho-Vrieseling, et al, 2014). Se están buscando tratamientos capaces de bloquear la propagación, o incluso estrategias preventivas en el caso de que la propagación se produzca extracelularmente, mediante la inmunización de los pacientes contra la proteína patógena (Taylor, 2014)

- 8) Los datos aportados aquí sobre los aminoácidos del péptido inactivante ShB implicados en la inactivación del canal (es decir, en la interacción directa con el canal), así como de su localización y distancias espaciales relativas (determinado a partir de la estructura del péptido unido al canal) proporcionan la base para el diseño racional de moduladores de los canales iónicos. Por otra parte, debido a que los péptidos inactivantes son promiscuos por su capacidad de inactivación de muchos canales diferentes y dado que la interacción con el canal implica a múltiples puntos de interacción, parece factible que las mutaciones o deleciones de tales puntos deben dar lugar en un futuro a posibles fármacos capaces de lograr la selectividad hacia un gran número de canales activados por voltaje.
- 9) Los resultados estructurales, electrofisiológicos y de modelaje del péptido inactivante ShB unido a su diana en el vestíbulo intracelular de KcsA permiten plantear la hipótesis del mecanismo de inactivación rápida o de tipo N basada en un acoplamiento activación e inactivación, donde los principios mecánicos del acoplamiento en su propagación hacia el filtro de selectividad podrían ser los mismos que en la inactivación de tipo C, a través de la F103 y provocando la asociación de la triada W67-E71-D80 que facilita la entrada del filtro de selectividad en el estado no conductor asociado al desacoplamiento funcional de los canales, tanto en KcsA como en sus homólogos eucariotas, pero acelerados por la presencia del péptido inactivante. Esta hipótesis del mecanismo de inactivación rápida planteada en detalle abre un camino para comprobarla en un futuro.
- 10) El péptido activante de canales de potasio descubierto en esta Tesis Doctoral ha sido valorado muy positivamente por la Oficina Española de Patentes y Marcas, y hallar los determinantes moleculares clave que ejercen el efecto activante facilitará su posible patente, de posible aplicación terapéutica para enfermedades que cursan con excitabilidad (pendiente de patente).

APÉNDICES





1. La bacteria *Streptomyces lividans*

El canal de potasio objeto de estudio de esta Tesis Doctoral se aisló de la bacteria *Streptomyces lividans* (Schrempf et al, 1995), denominándose “Potassium Channel of *Streptomyces* A”, KcsA.

Streptomyces lividans son bacterias gram-positivas habitantes del suelo con un complejo ciclo de vida que implica crecimiento micelial y formación de esporas asexuales. “Streptomyces” significa “Hongos doblados o enroscados” debido a que en un principio se clasificaron erróneamente como hongos, dada su similitud. Forman parte de las actinobacterias, importantes por su producción de compuestos fármacos que incluyen agentes antitumorales, inmunosupresores, fungicidas y sobre dos tercios de los antibióticos producidos por microorganismos disponibles actualmente. Se incluye en el Orden Actinomycetales (o Actinomycetos), suborden Streptomycineae (o Estreptomicinos), la familia Streptomycetaceae (o Estreptomicetos), el género *Streptomyces* (o Estreptomicos). *Streptomyces coelicolor* es el modelo representativo de los Actinomycetos.

El Instituto Sanger completó la secuencia del genoma de *Streptomyces coelicolor* en el año 2002 en colaboración con el Prof. David Hopwood del Centro John Innes. El cromosoma es de 8,667,507 pares de bases de longitud con un contenido en G+C del 72.1% y se predice que contiene 7825 genes que codifican a proteína.

El ciclo de vida de los Estreptomicetos (Figura 1) se inicia por la germinación de esporas. Esto produce la extensión de hifas ramificadas, que lleva a la formación de una red extendida de filamentos, el micelio. En ausencia de nutrientes, se elevan hifas aéreas, en las que se produce la formación de septos. Los compartimentos resultantes contienen DNA genómico y se desarrollan en esporas. Condiciones de sequía o frío provocan que las esporas permanezcan en una etapa durmiente que dura mientras los nutrientes no estén disponibles. (Para más información, ver la revisión de Kutzner, 1981).

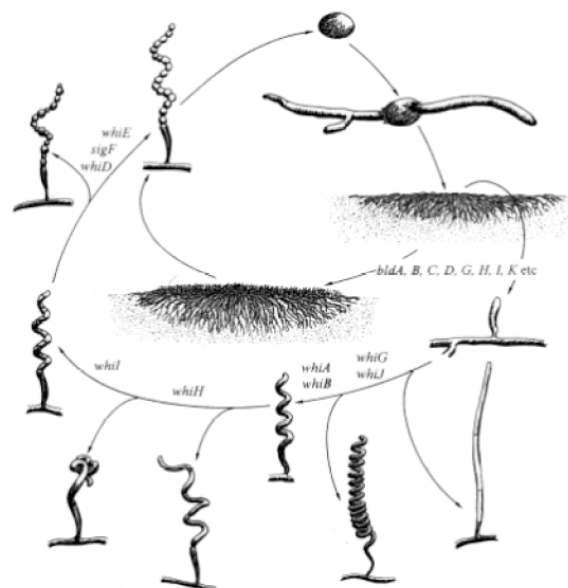
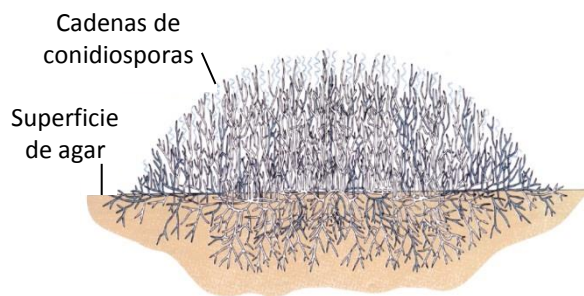
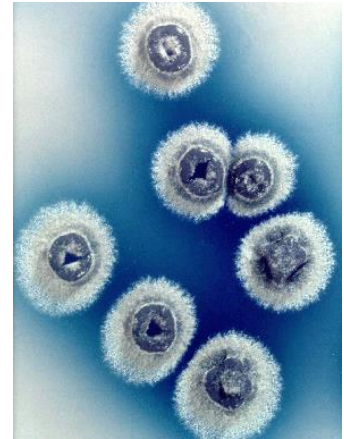


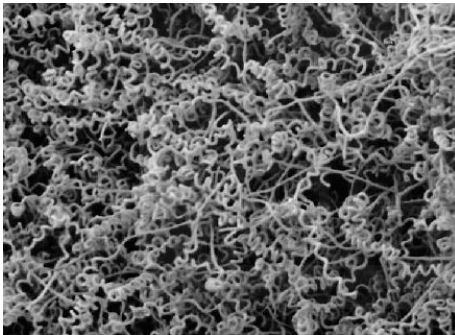
Figura 1. Ciclo de vida de los Estreptomicetos

Galería de fotos de *S. coelicolor* y *S. lividans*

Colonias de *Streptomyces coelicolor* con micelios aéreos y esporas. El área de la foto representa unos 2x3 cm. Los halos azules alrededor de las colonias es actinorrodina secretada. La actinorrodina es un antibiótico (no usado en clínica) que es azul en condiciones alcalinas y rojo en condiciones ácidas. La actinorrodina es un poliquétido hecho de múltiples condensaciones de acetato por una poliquétido sintetasa de Tipo II (Centro John Innes, Departamento de Fotografía).



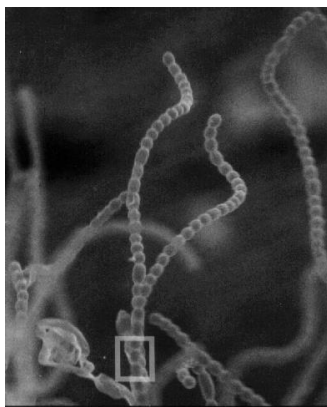
Colonia de Actinomicetos



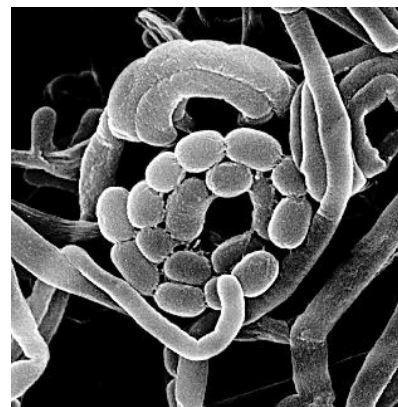
Micelio aéreo rizado de *Streptomyces coelicolor* (diámetro 1 μm ; Micrografía electrónica, Mark Buttner, Kim Findlay, Centro John Innes).



Micelio joven vegetativo de *Streptomyces* creciendo en medio líquido *broth* (diámetro 1 μm ; microscopio claro, Gabriella Kelemen, Centro John Innes).



Hifas aéreas de *Streptomyces lividans* (diámetro 1 μm ; Micrografía electrónica)



Micelio aéreo y esporas de *Streptomyces coelicolor*. El micelio y las esporas tienen aprox. 1 μm de ancho, típico de bacterias y mucho más pequeñas que las hifas y esporas fúngicas. (Micrografía electrónica, Mark Buttner. Kim Findlay. Centro John Innes).

2. Estructura y propiedades de los aminoácidos

Estructura general de los aminoácidos

Los aminoácidos son las unidades estructurales básicas de las proteínas. La estructura general de un α -aminoácido (Figura 1) se establece por la presencia de un carbono central (alfa) unido a un grupo carboxilo (-COOH; rojo en la figura), un grupo amino (-NH₂; verde), un átomo de hidrógeno (en negro) y la cadena lateral (R; azul).

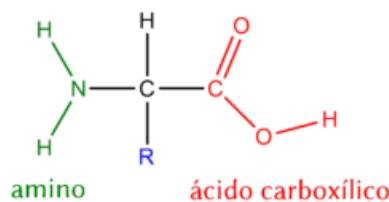


Figura 1. Estructura de un aminoácido

"R" representa la cadena lateral específica para cada aminoácido. Tanto el carboxilo como el amino son grupos funcionales susceptibles de ionización dependiendo de los cambios de pH, por eso ningún aminoácido en disolución se encuentra realmente en la forma representada en la figura, sino que se encuentra ionizado (Figura 2).

A pH bajo (ácido), los aminoácidos se encuentran mayoritariamente en su forma catiónica (con carga positiva), mientras que a pH alto (básico) se encuentran en su forma aniónica (con carga negativa). Para valores de pH intermedios, como los propios de los medios biológicos, los aminoácidos se encuentran habitualmente en una forma de ion dipolar o zwitterión (con un grupo catiónico y otro aniónico).



Figura 2. Formas ionizadas de los aminoácidos

Estereoquímica

En todos los aminoácidos, excepto la glicina, el carbono α está unido a cuatro sustituyentes diferentes (grupo amino, carboxilo, cadena lateral (R) e hidrógeno). Debido a esto, el carbono α ($C\alpha$) constituye un centro quiral (sitio donde es posible tener dos configuraciones diferentes, que son imágenes especulares no superponibles, llamadas enantiómeros). Los enantiómeros se pueden distinguir porque rotan de manera diferente el plano de la luz polarizada. Todos los aminoácidos que forman parte de las proteínas son enantiómeros L. Algunos D-aminoácidos se encuentran en péptidos sintetizados fuera de los ribosomas (Figura 3).

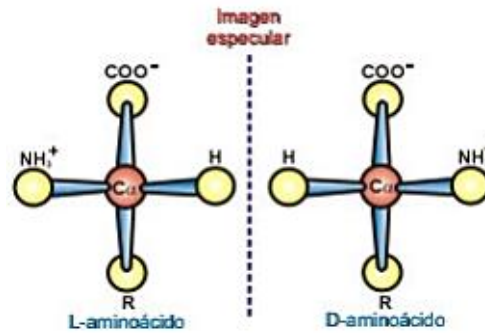


Figura 3. Enantiómeros de los aminoácidos.

Propiedades ácido-base

Todos los aminoácidos tienen por lo menos dos grupos ionizables, y por lo tanto, su carga neta depende del pH del entorno. Los grupos carboxilo del C α tienen valores de pKa entre 1.8 y 2.8, siendo más ácidos que los ácidos monocarboxílicos simples. Los valores de pKa de los grupos amino varían entre 8.8 y 10.6. A pH neutro, los aminoácidos en disolución se encuentran como iones dipolares (zwitteriones), es decir, el grupo amino se encuentra protonado y el grupo carboxilo disociado (Figura 1). Los aminoácidos ácidos y básicos también tienen grupos ionizables en su cadena lateral, sus valores de pKa se indican en la Figura 5. Para ilustrar la dependencia de la carga neta de un aminoácido con respecto al pH del entorno, se considerará al aminoácido histidina.

Además de los grupos carboxilo y amino en el C α , (valores de pKa de 1.8 y 9.2, respectivamente), la histidina tiene un anillo de imidazol en su cadena lateral con un valor de pKa de 6.0. Por lo tanto, la carga neta (la suma de las cargas positivas y negativas) cambia de +2 a -1 a medida que se incrementa el pH. A pH de 7.6, la carga neta es cero aunque la molécula contiene dos grupos casi completamente ionizados bajo estas condiciones.

Al valor de pH donde la carga neta es cero, se llama punto isoeléctrico (Figura 4).

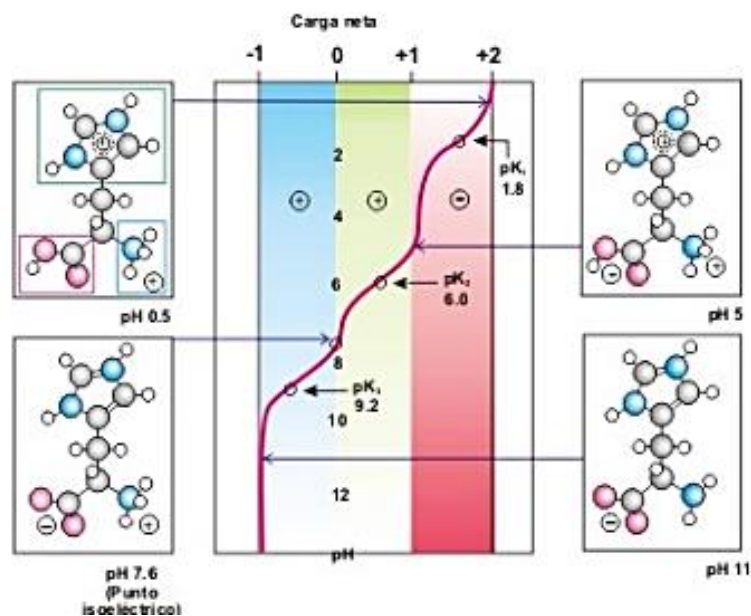
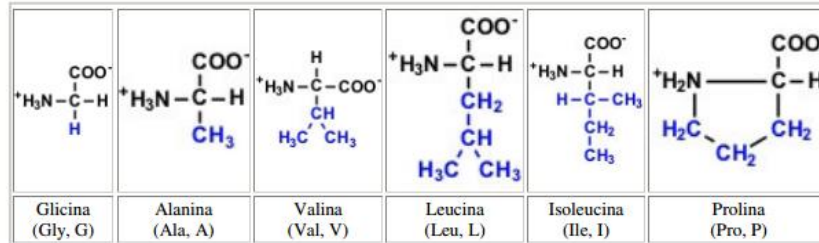


Figura 4. Curva de titulación de la histidina.

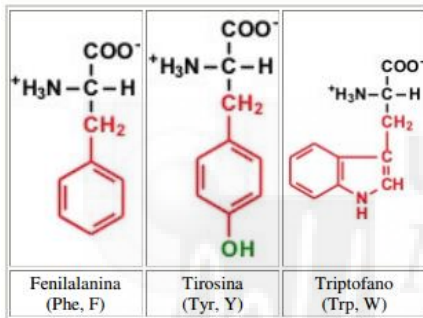
Estructura

Los veinte tipos de cadenas laterales de los aminoácidos que conforman las proteínas, varían en tamaño, forma, carga, capacidad de formar puentes de hidrógeno y reactividad química. La clasificación de aminoácidos se hace con base en la estructura y polaridad de sus cadenas laterales (Figura 5).

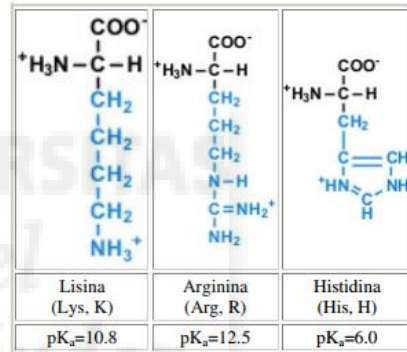
Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas



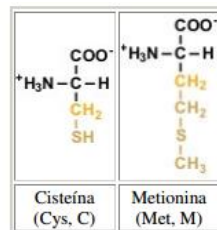
Aminoácidos con cadenas laterales aromáticas



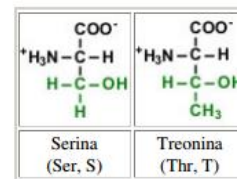
Aminoácidos con cadenas laterales básicas



Aminoácidos con cadenas laterales azufradas



Aminoácidos con cadenas laterales hidroxiladas



Aminoácidos con cadenas laterales ácidas y sus amidas respectivas

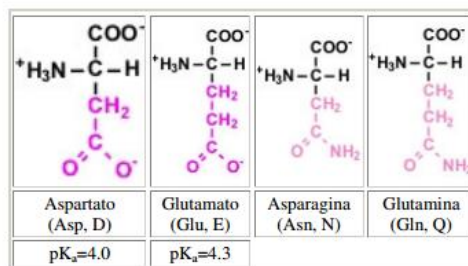


Figura 5. Estructura de los aminoácidos



3. Interacciones moleculares

Uno de los triunfos de la química del siglo XX ha sido explicar las propiedades de los elementos químicos en términos de sus estructuras atómicas. Los protones tienen cargas positivas y los electrones negativas. Así, el núcleo de un átomo, compuesto de protones y neutrones, posee una carga positiva (igual a su número atómico) que está compensada por las cargas negativas de la nube electrónica que lo rodea. Los electrones son añadidos progresivamente en diferentes niveles de energía o esferas. Así, la primera esfera contiene hasta 2 electrones (1 electrón tiene el hidrógeno, y 2 electrones el helio y átomos más grandes), la segunda esfera hasta 8 electrones (1 electrón tiene el litio, 2 el berilio, 3 el boro, 4 el carbono, etc), y así en sucesivas esferas.

El enlace químico entre átomos separados implica solo los electrones de la esfera más externa; estos son conocidos como electrones de valencia.

Se forma un enlace covalente cuando dos átomos comparten dos electrones de valencia, y los electrones compartidos completan la esfera externa de ambos átomos. Un ejemplo es la molécula de agua, donde un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno comparten sus electrones de valencia completando las esferas externas de ambos átomos:

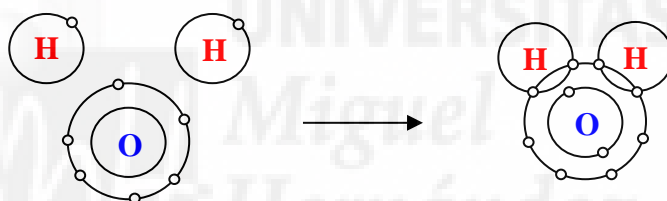


Figura 1. El enlace covalente en la molécula de agua.

El enlace iónico, en cambio, se forma cuando un átomo cede un electrón a otro átomo para completar ambos sus esferas externas. El átomo que cede el electrón, pierde una carga negativa y queda con carga positiva, y el átomo que gana el electrón queda con carga negativa. Ambos átomos son ahora iones y se crea una fuerte atracción electrostática entre ellos, que hace energéticamente favorable su estado de ionización. Un ejemplo es el cloruro sódico, donde el ión sodio cede un electrón y es por tanto el catión, y el ión cloro, que lo gana, es el anión:

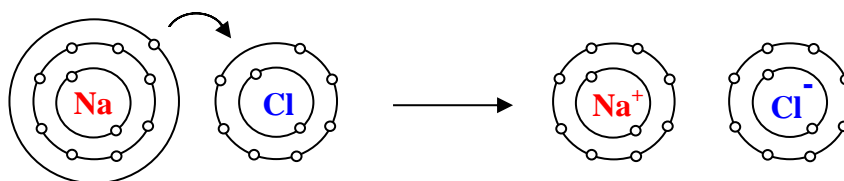


Figura 2. El enlace iónico en la molécula de cloruro sódico.

Hasta ahora hemos visto interacciones interatómicas. Estas interacciones pueden formar además dipolos moleculares, generando una molécula polar. Un ejemplo de dipolo es la molécula de agua, Aquí, los dos pares de electrones compartidos están dirigidos hacia el átomo de oxígeno,

acumulando más carga negativa en un lado de la molécula que en el otro. Se ha formado un dipolo, una molécula polar. Los dipolos moleculares generados en las interacciones interatómicas dan lugar a interacciones intermoleculares.

Una interacción intermolecular es la interacción ión-dipolo. Ocurre cuando son atraídos un ión positivo y la región negativa de un dipolo, o un ión negativo y la región positiva de un dipolo. La interacción dipolo-dipolo es una atracción entre los dipolos de moléculas adyacentes.

Una interacción intermolecular de gran importancia en la química de los sistemas vivos es el puente de hidrógeno. Los átomos de oxígeno, nitrógeno y flúor atraen fuertemente a los electrones, son muy electronegativos. Cuando un átomo de hidrógeno forma un enlace covalente con uno de estos átomos, los dos electrones que forman el enlace se sitúan más cerca del átomo electronegativo. Esto deja al átomo de hidrógeno con una carga positiva parcial, y es entonces capaz de atraer otro par de electrones de valencia de otro átomo de oxígeno, nitrógeno o flúor adyacente:

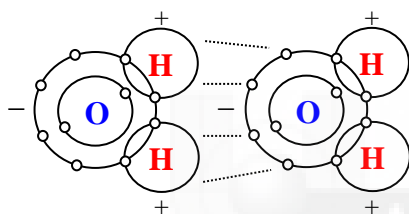


Figura 3. El puente de hidrógeno entre moléculas de agua.

Tipo	Energía de interacción (kJ/mol)
Enlace covalente	200-800
Enlace iónico	40-400
Puente de hidrógeno	10-30
Puente hidrofóbico	10-30
van der Waals	3-10
Ión-dipolo	3-10
Dipolo-dipolo	0.5-3

Tabla 1. Energías de interacción molecular (Freifelder, 1985)

Los puentes de hidrógeno son muy importantes en la determinación de la estructura tridimensional de moléculas de proteínas, como por ejemplo, de la estructura α -hélice, presente en la mayoría de los canales iónicos. Muchas sustancias son solubles en agua porque pueden formar puentes de hidrógeno con ella.

Las sustancias que no pueden formar puentes de hidrógeno (como el benceno) no son muy solubles y tienden a agruparse juntas en un ambiente acuoso. La fuerza de atracción entre tales moléculas se denomina puente hidrofóbico.

Unas interacciones intermoleculares mucho más débiles son las fuerzas de van der Waals. Se generan debido a la atracción entre los dipolos permanentes o temporales de moléculas adyacentes. La posición de los electrones en las esferas externas de los átomos es cambiante y pueden formar dipolos temporales, incluso en moléculas que no forman dipolos de forma permanente. Así, un dipolo permanente o temporal en una molécula puede inducir un dipolo temporal de sentido opuesto en su vecina, y ambos dipolo se atraen uno a otro. Cuanto mayor sea el tamaño de las moléculas, mayor serán las fuerzas de van der Waals entre ellas.

Las fuerzas relativas de los diferentes tipos de interacción molecular se indica en la Tabla 1 mediante sus energías de interacción (o entalpías de interacción). Así, la entalpía de una interacción es la energía liberada en su formación o la energía requerida para romperla, a presión constante.

4. Conceptos eléctricos

La existencia de carga eléctrica es uno de los rasgos fundamentales del universo. Las cargas individuales son partículas subatómicas individuales: son unitarias y pueden ser positivas o negativas. Las cargas del mismo signo se repelen y las de distinto signo se atraen. La fuerza de atracción entre cargas de distinto signo significa que se requiere una apreciable cantidad de energía para separarlas, y por tanto, se libera energía cuando se les permite estar juntas otra vez. El estado normal de la materia es ser eléctricamente neutra, con igual número de cargas positivas y negativas.

4.1 *Electricidad*

La electricidad estática es la acumulación de un exceso de carga eléctrica positiva o negativa en alguna región, producido por la separación de electrones de sus átomos. La cantidad de carga, Q , se mide en culombios (C). La carga positiva de un ión de sodio o potasio (la carga elemental, e_0) es $1.602 \times 10^{-19} C$, y un culombio corresponde a la carga en 6.24×10^{18} iones univalentes. La carga en un mol de iones univalentes viene dado por la constante de Faraday, F , que es igual al número de Avogadro, N_A (el número de iones, átomos o moléculas en un mol, 6.022×10^{23}) multiplicado por la carga de cada uno de ellos:

$$\begin{aligned} F &= N_A e_0 \\ &= 6.022 \times 10^{23} \times 1.602 \times 10^{-19} \\ &= 96500 \text{ coulombios/mol} \end{aligned}$$

La corriente eléctrica es el flujo de cargas de un lugar a otro. La corriente I es igual a dQ/dt , la tasa de cambio de carga con el tiempo. Se mide en amperios (A). Una corriente de un culombio por segundo es un amperio:

$$\begin{aligned} I &= dQ/dt \\ 1A &= 1C/1s \end{aligned}$$

Si la corriente a través de un canal de potasio fuese un picoamperio (1 pA o 10^{-12} A), entonces el número de iones de potasio por segundo que fluye a su través será de $6.24 \times 10^{18} \times 10^{-12}$, 6.24 millones.

La corriente sólo fluye de un punto a otro si hay una diferencia de potencial (V o E) entre los dos puntos y una vía conductora entre ellos. La diferencia de potencial se mide en voltios (V). Cuando un culombio se mueve a través de una diferencia de potencial de un voltio, la energía liberada es de un julio (J).

La ley de Ohm

La corriente que fluye a través de un conductor con una diferencia de potencial concreta está determinada por la resistencia del conductor, como fue establecido por Ohm en 1827. La ley de Ohm

dice que el potencial V (en voltios) es igual a la corriente I (en amperios) multiplicado por la resistencia R :

$$V = IR \quad ; \quad I = V/R$$

La unidad de la resistencia es el ohmio (Ω). Lo recíproco de la resistencia es la conductancia, G , medida en siemens (S).

$$I = VG$$

En condiciones ideales, la corriente que fluye a través de un conductor es linealmente proporcional al potencial, y la conductancia es una constante, independiente del voltaje, como promulga la ley de Ohm. En cambio, a veces la conductancia varía con la diferencia de potencial. Si la conductancia cambia cuando cambia la dirección de la corriente, tal que conduce más en una dirección que en sentido contrario, entonces se llama *rectificación*.

Dos placas de material conductor separadas por un aislante forman un capacitor. Si se aplica una diferencia de potencial a través del capacitor, se crea o almacena una cantidad de carga Q en las placas. Esta carga es proporcional a la diferencia de potencial, y la constante de proporcionalidad es la capacitancia, C :

$$Q = VC$$

Cuando el voltaje aplicado a través del capacitor es cambiante, las cargas se crean en una placa y fluyen hacia la otra, creando una corriente a través del capacitor, tal que:

$$I = CdV/dt$$

Donde dV/dt es la tasa de cambio del voltaje con el tiempo.

Las membranas celulares son aislantes finos entre soluciones conductoras, y por tanto, tienen una capacitancia. La capacitancia de un capacitor es proporcional al área de las placas de las que está hecha. Así, la capacitancia de una zona de la membrana celular es proporcional a su área. Por tanto, si la capacitancia por unidad de área es C_m y el área de la membrana es a , entonces la capacitancia C viene dada por:

$$C = aC_m$$

4.2 *Movimiento de iones a través de canales de membrana y Funciones de ajuste utilizadas en el análisis de canales iónicos*

En este apartado se incluyen las ecuaciones que describen el movimiento de iones a través de la membrana y los canales iónicos, que son base de la electrofisiología de la técnica de patch clamp utilizada en esta Tesis Doctoral.

La membrana plasmática es la barrera al movimiento de iones, y los canales iónicos son las proteínas integrales de membrana que permiten el paso de los iones a su través, de una forma selectiva y regulada. La dirección en la que se mueven está determinada por el gradiente electroquímico. En cambio, la velocidad a la que los iones se mueven a través de la membrana está determinada por varios factores:

1. la magnitud del gradiente electroquímico.
2. la naturaleza del ión y las características de los canales iónicos (permeabilidad y selectividad)
3. el número de canales iónicos presentes por unidad de área de membrana.
4. la proporción de canales abiertos.

El gradiente electroquímico

Determina la dirección en que se mueven los iones de un lado a otro de la membrana a través de un canal. Si suponemos dos compartimentos que contienen diferente concentración de una sal de potasio. El compartimento 1 tiene mayor concentración que el 2 y ambos están separados por una membrana que tiene varios canales catiónicos, de forma que dejan pasar los iones positivos de potasio, pero no los aniones. Si los canales se abren, los iones de potasio fluirán a favor de su gradiente de concentración, desde el compartimento 1 hacia el 2. Los iones de potasio acumulan así sus cargas positivas en el compartimento 2, mientras el 1 contiene las cargas negativas. Se crea así una diferencia de potencial entre los dos compartimentos. Esta diferencia de potencial ahora afecta al movimiento de los iones de potasio: el exceso de carga positiva en el compartimento 2 tiende a reconducirlos hacia el compartimento 1. Este sistema alcanza un equilibrio cuando el gradiente de concentración, que dirige los iones en un sentido, se balancea con el gradiente eléctrico, que dirige los iones en el sentido contrario. La diferencia de potencial entre ambos compartimentos en este punto es el potencial de equilibrio para el ión de potasio (V_K).

La ecuación de Nernst

El valor del potencial de equilibrio para cualquier ión, x , puede ser calculado a partir de una ecuación, que fue derivada de los principios básicos de la termodinámica por el químico-físico alemán Walter Nernst en 1888, es la ecuación de Nernst. Por ello, al potencial de equilibrio de un ión también se le denomina potencial de Nernst. La ecuación de Nernst describe la condición donde existirá equilibrio entre la energía asociada con el voltaje de membrana (V) y la energía asociada con un gradiente de concentración de una especie iónica x .

$$V(x) = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[x]_1}{[x]_2}$$

donde R es la constante de los gases ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta ($^{\circ}\text{K}$; $-273 \text{ }^{\circ}\text{C}$), z es el número de cargas del ión ($+2$ para iones de calcio, -1 para iones de cloro, p.ej.) y F es la constante de Faraday (96500 C mol^{-1}). $[x]_1$ y $[x]_2$ son las concentraciones del ión x en los dos compartimentos. $V(x)$ es el potencial en voltios del compartimento 2 medido con respecto al compartimento 1.

Las ecuaciones de Goldman-Hodgkin-Katz

La selectividad es la comparación de las permeabilidades del canal a diferentes iones. La permeabilidad es la tasa a la que una especie particular iónica pasa a través del canal abierto bajo condiciones estándar.

Hodgkin y Katz en 1949, desarrollaron dos expresiones ampliamente utilizadas que permiten hallar la permeabilidad absoluta de un ión y la relación de permeabilidades entre los diferentes iones. Para desarrollar estas expresiones, se basaron en la teoría de campo constante que David Goldman postuló en 1943, como modelo para el movimiento de iones a través de la membrana plasmática. Goldman asumió que la membrana era homogénea en su naturaleza y que los iones la cruzan independientemente unos de otros, moviéndose a una tasa proporcional a la que tienen libres en solución, y asumió que el gradiente eléctrico a través de la membrana era lineal.

La ecuación que permite hallar la permeabilidad absoluta de un ión es la llamada ecuación de corriente de Goldman-Hodgkin-Katz, y dice que la corriente que lleva el ión x es igual a su permeabilidad, P_x , multiplicada por una función no lineal del voltaje:

$$I_x = P_x z_x^2 \frac{EF^2}{RT} \frac{[x]_i - [x]_o e^{(-z_x FE/RT)}}{1 - e^{(-z_x FE/RT)}}$$

Esta ecuación permite calcular la permeabilidad absoluta del ión a partir de la medida de su corriente, I_x , si se conoce la concentración intracelular $[X]_i$ y extracelular $[X]_o$ del ión y el potencial de membrana, E .

Otra ecuación es la llamada ecuación de voltaje de Goldman-Hodgkin-Katz, y permite calcular la relación de permeabilidad entre los diferentes iones a partir del potencial de inversión, es decir, el potencial de membrana al cual no fluye corriente neta, si las concentraciones de los iones son conocidas. Si los iones permeantes son Na^+ , K^+ y Cl^- , la ecuación es:

$$E_{inv} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K]_o + P_{Na} [Na]_o + P_{Cl} [Cl]_i}{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_o}$$

donde E_{inv} es el potencial de inversión o potencial al nivel de cero corriente; P_K , P_{Na} y P_{Cl} son los coeficientes de permeabilidad para los iones de potasio, sodio y cloro. La ecuación permite calcular la ratio de permeabilidad, no permeabilidades absolutas, a partir de medidas de potenciales de inversión en concentraciones iónicas conocidas.

Si solo permea un ión, el E_{inv} será el potencial de Nernst para ese ión. Con varios iones permeantes, el E_{inv} es el peso promedio de todos los potenciales de Nernst. Si sólo existe un ión permeante a cada lado de la membrana, y ambos iones tienen la misma valencia, el E_{inv} está dado por la ecuación biónica simple siguiente:

$$E_{inv} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_A [A]_o}{P_B [B]_i}$$

Cuando permean dos iones pero difieren en su valencia, por ej. Ca^{2+} extracelular y K^+ intracelular, la relación es más compleja y puede ser resuelta con P_{Ca}/P_K (Fatt and Ginsborg, 1958):

$$E_{inv} = \frac{RT}{F} \ln \left[\sqrt{\frac{4P_{Ca}[Ca]_o}{P_K[K]_i} + \frac{1}{4}} - \frac{1}{2} \right]$$

Las ecuaciones de Goldman-Hodgkin-Katz son herramientas muy útiles para describir las propiedades de los canales individuales, pero es menos útil como guía para la estructura física de los canales y parten de asunciones peligrosamente simplistas y erróneas. Incluye en el único parámetro de permeabilidad dos conceptos bastante diferentes de la teoría de solubilidad y difusión: el coeficiente de partición y la movilidad. Se asume que los canales son homogéneos. Se asume que los iones no interactúan ni física ni electrostáticamente. Estas asunciones son erróneas, y por tanto, las predicciones de estas ecuaciones no pueden ser correctas en detalle. Pero aun así, debido a su contribución en los mayores avances desde 1970, se usan como definiciones de la permeabilidad absoluta y de las tasas de permeabilidad.

El potencial de membrana

La mayoría de las células poseen un potencial de membrana, esto es, un voltaje a través de la membrana plasmática tal que el interior celular es normalmente unas décimas de milivoltios más negativo que el exterior. En el axón gigante del calamar es de -60 mV en condiciones de reposo. El principal responsable de este potencial de reposo son los canales de potasio, puesto que, es el potencial de equilibrio para los iones de potasio obtenido mediante la ecuación de Nernst en las concentraciones iónicas del axón gigante del calamar (20 mM extracelular; 400 mM intracelular), el que más se aproxima al potencial de reposo ($E_K = -75$ mV).

En células excitables (neuronas y células sensoriales y musculares), el potencial de membrana cambia muy rápidamente desde -60 mV en reposo hasta +55 mV aprox., como consecuencia de la apertura de canales de sodio en respuesta a un estímulo eléctrico.

El gradiente de voltaje o campo eléctrico a través de la membrana es enorme. Si hay una diferencia de potencial de 60 mV a través de una membrana de 3 nm de espesor, por ej., entonces el gradiente de voltaje es de 200000 V/cm. Claramente esto debe tener apreciables consecuencias en el movimiento de iones a través de los canales y en las distribuciones de cargas en los canales.

Probabilidad de apertura, P_o

La probabilidad de un canal de estar abierto (P_o) proporciona una indicación del nivel de actividad de un canal iónico. En el caso más simple, en el que hay un único canal en el parche, está dado por

$$P_{open} = \frac{t_o}{T}$$

Donde t_o es el tiempo en que el canal se encuentra en estado abierto y T es el tiempo total de observación. Si el parche contiene más de un canal del mismo tipo, entonces

$$P_{open} = \frac{T_o}{NT}$$

donde N es el número de canales en el parche, y

$$T_o = \sum Lt_o$$

donde L es el nivel de apertura del canal. Se asume que un nivel 2 de apertura, por ejemplo, es el resultado de dos niveles 1 de apertura del mismo tipo de canal superpuestos, donde se asume que el nivel 1 de apertura es la apertura de un canal único.

En general, N debe ser asignado un valor igual o mayor que el número de niveles en el registro de canal único. No puede asumirse que N es igual al número de niveles porque N canales en un parche pueden generar menos que N niveles si las aperturas de los canales presentes nunca se solapan durante el curso del registro. Este puede ser fácilmente el caso si la actividad del canal es baja y/o las aperturas son breves. Sin embargo, el número mínimo de canales en el parche es al menos el número de niveles observados.

Si el número de canales no se conoce y hay razón para sospechar que el número de niveles no refleja con precisión el número de canales, la probabilidad de apertura del canal, reflejada como NP_o , se halla mediante

$$NP_o = \frac{T_o}{T_o + T_c}$$

Donde T_c es el tiempo total cerrado.

Función de la distribución binomial

La distribución binomial describe la probabilidad, P , de que un evento ocurra en n ensayos independientes y se usa, por ejemplo, para determinar la probabilidad de apertura simultánea de un número de canales independientes, n , en un parche (Colquhoun, et al, 1995).

$$f(x) = \frac{n!}{(n-x)!x!} P^x (1-P)^{n-x}$$

Función de la distribución Gaussiana

Utilizada para datos que pueden ser descritos por una o más distribuciones normales. Para n componentes, el ajuste resuelve la amplitud A , la media gaussiana μ , la desviación estándar gaussiana σ y la constante C para cada componente i . La función de la distribución Gaussiana se usa generalmente para describir la distribución de amplitudes de aperturas de canal único (Heinemann, 1995).

$$f(x) = \sum_{i=1}^n A_i \frac{e^{-(x-\mu_i)^2/2\sigma_i^2}}{\sigma_i\sqrt{2\pi}} + C$$

La ecuación de Hill

La ecuación de Hill es una ecuación general que puede ser aplicada en muchos tipos de respuestas farmacológicas concentración-dependientes de un canal iónico frente a la aplicación de fármacos. R_{max} se refiere a la máxima respuesta obtenible con el fármaco S . Por definición, un agonista parcial tendrá una R_{max} menor que la R_{max} del agonista completo. K' se refiere a la EC_{50} de un agente particular, indicativo de su potencia. El valor de n impone algunas limitaciones sobre el grado de cooperatividad de los procesos dependientes de ligando. En un proceso inhibitorio concentración-dependiente, n puede tomar valor negativo. El ajuste resuelve R_{max} , K' y n .

$$f(S) = \frac{R_{max}[S]^n}{K' + [S]^n} + C$$



TABLA 6. Tabla de bibliografía con ejemplos de canales o receptores que muestran cambios en su actividad debido a agrupaciones y/o a lípidos

	EVIDENCIAS DE AGRUPACIONES	EVIDENCIAS DE ACOPLAMIENTO FUNCIONAL	CAMBIOS EN GATING POR AGRUPACIONES	CAMBIOS EN GATING POR LÍPIDOS
Kir4.1	-Horio et al, 1997		-Horio et al, 1997	
Kv1.1	-Sheng et al, 1992			
Kv2.1	-Trimmer et al 1991 -Zhang et al, 2008		-Misonou et al, 2004 -Misonou et al, 2005, review -Misonou et al, 2008 -Zhang et al, 2008	-Jacobson et al, 2007 -Xu et al, 2008
Otros canales de K⁺		-Draber et al, 1993		
Canales de Na⁺ activados por voltaje	-Bhargava et al, 2013	-Undrovinas et al, 1992 -Naundorf et al, 2006	-Naundorf et al, 2006 -Huang et al, 2012 -Undrovinas et al, 1992	-Undrovinas et al, 1992
HCN		-Dekker and Yellen, 2006		
TRPs		-Sonkusare et al, 2012		-Beech et al, 2009, review -Morenilla-Palao et al, 2009
Cotransportador de Na-Cl	-De Jong et al, 2003		-De Jong et al, 2003	-Welker et al, 2008
Canal de Cl⁻ (CFTR)	-James et al, 2010	-Krouse and Wine, 2001		
Canal aniónico activado por voltaje (VDAC)	-Manella, 1982 -Manella et al, 1983 -Manella and Colombini, 1984 -Gonçalves et al, 2007			-Betaneli et al, 2012
Transportador humano de aniones orgánicos (hOAT1)	-Hong et al, 2005		-Duan et al, 2011	
Receptor de acetilcolina	-Huh and Fuhrer, 2002	-Schindler, 1984 -Schindler et al, 1984 -Keleshian et al, 2000	-Schindler et al, 1984 -Keleshian et al, 2000	-Fong and McNamee, 1986 Da Costa and Baenziger, 2009 -Morales et al, 2006 Fernández-Carvajal et al, 2006
Receptores acoplados a proteínas G	-Kilic ann Rudnick, 2000 -Rios et al, 2001 -Herrick-Davis et al, 2004 -Mansoor et al, 2006		-Kilic ann Rudnick, 2000 -Rios et al, 2001 -Herrick-Davis et al, 2005 -Botelho et al, 2006	-Botelho et al, 2006 -Tayebati et al, 2013
Receptores de ATP (P2X)	-Fujiwara and Kubo, 2004	-Ding and Sachs, 2002	-Fujiwara and Kubo, 2004	-Michel and Fonfria, 2007
Receptor de IP₃	-Rahman et al, 2009	-Rahman et al, 2009	-Rahman et al, 2009	
Receptor de rianodina	-Saito et al, 1988 -Yin et al, 2005	-Marx et al, 1998 -Marx et al, 2001	-Glover et al, 2004 -Laver et al, 2004 -Gaburjakova and Gaburjakova, 2010	-Laver et al, 2004 -Nakamura et al, 2007
Canales mecanosensibles (MscL)			-Ursell et al, 2007 -Grage et al, 2011 Bialecka-Fornal, et al, 2012	-Powl et al, 2008 -Grage et al, 2011
Gramicidina A			-Goforth et al, 2003	-Goforth et al, 2003
Receptor bacteriano de quimiotaxis			-Bray et al, 1998 -Sourjik and Berg, 2004 -Skoge et al, 2006	
“Patchwork membrane”	-Spira et al, 2012 -Mueller et al, 2012, review		-Spira et al, 2012 -Mueller et al, 2012, review	-Spira et al, 2012 -Mueller et al, 2012, review
Reviews sobre el efecto de lípidos				-McIntosh and Simon, 2006 -Maguy et al, 2006 -Jiang and Gonen, 2012



BIBLIOGRAFÍA





BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, M.J. and Clapham, D.E. (1997) Ion channels, basic science and clinical disease. *N.Engl.J.Med.*; 336(22):1575-86.
- Aggarwal, S.K., and MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker* K⁺ channel. *Neuron*; 16(6):1169-77.
- Alam, A., and Jiang, Y. (2009) High-resolution structure of the open NaK channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.*;16(1):30-4.
- Armstrong, C. (1998) The vision of the pore. *Science*. 280(5360):56-7.
- Armstrong, C.M., and Hille, B. (1998) Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20(3):371-80.
- Ashcroft, F.M. (2006) From molecule to malady. *Nature*; 440(23):440-442.
- Ashcroft, F.M., and Röper, J. (1993) Transporters, channels and human disease. *Curr Opin Cell Biol.* 5(4):677-83
- Beech, D.J., Bahnasi, Y.M., Dedman, A.M., and Al-Shawaf, E. (2009) TRPC channel lipid specificity and mechanisms of lipid regulation. *Cell Calcium*. 45(6):583-8.
- Betaneli, V., Petrov, E.P., Schwille, P., (2012). The role of lipids in VDAC oligomerization. *Biophys. J.* 102, 523–531.
- Bezánilla, F. (2005) The origin of subconductance levels in voltage-gated K⁺ channels, *J. Gen. Physiol.* 126(2):83-6.
- Bezprozvanny, I., and Maximov, A. (2001) PDZ domains: More than just a glue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(3):787-9. Review.
- Bhargava, A., Lin, X., Novak, P., Mehta, K., Korchev, Y., Delmar, M., and Gorelik, J. (2013) Super-resolution scanning patch clamp reveals clustering of functional ion channels in adult ventricular myocyte. *Circ Res.* 112(8):1112-20.
- Bialecka-Fornal, M., Lee, H.J., DeBerg, H.A., Gandhi, C.S., and Phillips, R. (2012) Single-cell census of mechanosensitive channels in living bacteria. *PLoS One*. 7(3):e33077.
- Blount, P., Smith, M.M., Merlie, J.P. (1990) Assembly intermediates of the mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor in stably transfected fibroblasts. *J Cell Biol.* 111(6 Pt 1):2601-11.
- Blunck, R., Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Perozo, E., and Bezánilla, F. (2006) Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction *J Gen Physiol.*;128(5):569-81.
- Botelho, A.V., Huber, T., Sakmar, T.P., and Brown, M.F. (2006) Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophys J.* 91(12):4464-77.
- Bray D, Levin MD, Morton-Firth CJ. (1998) Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature* 393(6680):85-8.
- Bray, D., and Duke, T. (2004) Conformational spread: the propagation of allosteric states in large multiprotein complexes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 33:53-73. Review.
- Cao, Y., Jin, X., Huang, H., Derebe, M.G., Levin, E.J., Kabaleeswaran, V., Pan, Y., Punta, M., Love, J., Weng, J., Quick, M., Ye, S., Kloss, B., Bruni, R., Martinez-Hackert, E., Hendrickson, W.A., Rost, B., Javitch, J.A., Rajashankar, K.R., Jiang, Y., and Zhou, M. (2011) Crystal structure of a potassium ion transporter, TrkH. *Nature*. 471(7338):336-40.
- Chakrapani, S., Cordero-Morales, J.F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating II: Single-channel currents. *J. Gen. Physiol.* 130(5):479-496.
- Chapman, M.L., Blanke, M.L., Krovetz, H.S., and VanDongen, A.M. (2006) Allosteric effects of external K⁺ ions mediated by the aspartate of the GYGD signature sequence in the Kv2.1 K⁺ channel. *Pflugers Arch* 451(6):776-92.
- Chapman, M.L., VanDongen, A.M. (2005) K channel subconductance levels result from heteromeric pore conformations. *J Gen Physiol.* 126(2):87-103.
- Chapman, M.L., VanDongen, H.M., and VanDongen, A.M. (1997) Activation-dependent subconductance levels in the drk1 K channel suggest a subunit basis for ion permeation and gating. *Biophys J.* 72(2 Pt 1):708-19.

- Choi, K.L., Aldrich, R.W., and Yellen, G. (1991) Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 88(12):5092-5.
- Clayton, G.M., Altieri, S., Heginbotham, L., Unger, V.M., and Morais-Cabral, J.H. (2008) Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(5):1511-5.
- Cordero-Morales, J.F., Vishwanath, J., Chakrapani, J. and Perozo, E. (2011) A multipoint hydrogen-bond network underlying KcsA C-type inactivation. *Biophysical Journal*. 100:2387-2393.
- Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2006a) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.*;13(4):311-8.
- Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., and Perozo, E. (2006b) Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(4):319-22.
- Cortes, D. M., Cuello, L. G., and Perozo, E. (2001) Molecular architecture of full-length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating, *J. Gen. Physiol.* 117, 165-180.
- Cortes, D.M., and Perozo, E. (1997) Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K⁺ channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability. *Biochemistry*. 36(33):10343-52.
- Cuello, L. G., Romero, J. G., Cortes, D. M., and Perozo, E. (1998) pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel, *Biochemistry* 37, 3229-3236.
- Cuello, L.G., Jogini, V., Cortes, D.M., Perozo, E. (2010a) Structural mechanism of C-type inactivation in K⁺ channels. *Nature*. 466(7303):203-8.
- Cuello, L.G., Jogini, V., Cortes, D.M., Pan, A.C., Gagnon, D.G., Dalmas, O., Cordero-Morales, J.F., Chakrapani, S., Roux, B., Perozo, E. (2010b) Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels. *Nature*. 466(7303):272-5.
- daCosta, C.J., Medaglia, S.A., Lavigne, N., Wang, S., Carswell, C.L., and Baenziger, J.E. (2009) Anionic lipids allosterically modulate multiple nicotinic acetylcholine receptor conformational equilibria. *J. Biol. Chem.* 284(49):33841-9.
- daCosta, C.J., and Baenziger, J.E. (2009) A lipid-dependent uncoupled conformation of the acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 284(26):17819-25.
- de Jong, J.C., Willems, P.H., Mooren, F.J., van den Heuvel, L.P., Knoers, N.V., and Bindels, R.J. (2003) The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer. *J Biol Chem.* 278(27):24302-7.
- Dekker, J.P., and Yellen, G. (2006) Cooperative gating between single HCN pacemaker channels. *J. Gen. Physiol.* 128(5):561-7.
- del Camino, D., Holmgren, M., Liu, Y., and Yellen, G. (2000) Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications *Nature*. 403:321-325.
- Ding, S., and Sachs, F. (2002) Evidence for non-independent gating of P2X2 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *BMC Neuroscience*. 3:17.
- Dibb, K.M., Rose, T., Makary, S.Y., Claydon, T.W., Enkvetchakul, D., Leach, R., Nichols, C.G., and Boyett, M.R. (2003) Molecular basis of ion selectivity, block, and rectification of the inward rectifier Kir3.1/Kir3.4 K(+) channel. *J. Biol. Chem.* 278(49):49537-48.
- Doms, R.W., Lamb, R.A., Rose, J.K., Helenius, A. (1993) Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*. 193(2):545-62. Review.
- Dong, J., Shi, N., Berke, I., Chen, L., and Jiang, Y. (2005) Structures of the MthK RCK domain and the effect of Ca²⁺ on gating ring stability. *J. Biol. Chem.* 280, 41716–41724.
- Douglass, A.D., and Vale, R.D. (2005) Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* 121(6):937-50.
- Doyle, D.A., Moras-Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*; 280(5360):69-77.

- Draber, S., Schultze, R., and Hansen, U.P. (1993) Cooperative behavior of K⁺ channels in the tonoplast of *Chara corallina*. *Biophys. J.* 65:1553-1559.
- Drews, J. (2000) Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287(5460):1960-4.
- Duan P, Li S, You G. (2011) Transmembrane peptide as potent inhibitor of oligomerization and function of human organic anion transporter 1. *Mol. Pharmacol.* 79(3):569-74.
- Durell, S.R., and Guy, H.R. (1999) Structural model of the KtrB, TrkH, and Trk1.2 symporters based on the structure of the KcsA K(+) channel. *Biophys. J.*; 77(2):789-807.
- Encinar, J.A., Fernández, A.M., Poveda, J.A., Molina, M.L., Albar, J.P., Gavilanes, F., and González-Ros JM. (2003) Probing the channel-bound *Shaker* B inactivating peptide by stereoisomeric substitution at a strategic tyrosine residue. *Biochemistry.* 42(29):8879-84.
- Fatt, P., and Ginsborg, B.L. (1958) The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 142(3):516-43.
- Fernández-Carvajal, A.M., Encinar, J.A., Poveda, J.A., de Juan, E., Martínez-Pinna, J., Ivorra, I., Ferragut, J.A., Morales, A., and González-Ros, J.M. (2006) Structural and functional changes induced in the nicotinic acetylcholine receptor by membrane phospholipids. *J Mol Neurosci.* 30(1-2):121-4.
- Fong, T.M., and McNamee, M.G. (1986) Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry.* 25(4):830-40.
- Fujiwara, Y., and Kubo, Y. (2004) Density-dependent changes of the pore properties of the P2X2 receptor channel. *J Physiol.* 558(Pt 1):31-43.
- Gaburjakova, J., and Gaburjakova, M. (2010) Identification of changes in the functional profile of the cardiac ryanodine receptor caused by the coupled gating phenomenon. *J. Membr. Biol.* 234(3):159-69.
- Galárraga, E., and Bargas, J. (1998) Multiplicidad de conductancias iónicas en las células excitables. En: Muñoz-Martínez EJ, García X. Compiladores fisiología células, órganos y sistemas. Tomo I Fisiología Celular. Comunicación intercelular. Ediciones Científicas Universitarias. Serie Texto Científico Universitario. Secretaría de Salud. UNAM. CINVESTAV. IMSS. SMCF. FCE. México.
- Girard, C., and Lesage, F. (2004) K2P neuronaux: aspects moléculaires et fonctionnels. *Med Scien*; 20(5):544-9.
- Glover, L., Heffron, J.J., and Ohlendieck, K. (2004) Increased sensitivity of the ryanodine receptor to halothane-induced oligomerization in malignant hyperthermia-susceptible human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (1985). 96(1):11-8.
- Goforth, R.L., Chi, A.K., Greathouse, D.V., Providence, L.L., Koeppe, R.E. 2nd, and Andersen, O.S. (2003) Hydrophobic coupling of lipid bilayer energetics to channel function. *J. Gen. Physiol.* 121(5):477-93.
- Goldstein, S.A.N., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D., and Rajan, S. (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. *Pharmacol Rev*; 57:527-40.
- Gonçalves, R.P., Buzhynskyy, N., Prima, V., Sturgis, J.N., and Scheuring, S. (2007) Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes. *J. Mol. Biol.* 369(2):413-8.
- Gonzalez, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzun, I., Rojas, P., Naranjo, D., and Latorre, R. (2012) K(+) channels: function-structural overview. *Compr Physiol.* 2(3):2087-149.
- Grage, S.L., Keleshian, A.M., Turdeladze, T., Battle, A.R., Tay, W.C., May, R.P., Holt, S.A., Contera, S.A., Haertlein, M., Moulin, M., Pal, P., Rohde, P.R., Forsyth, V.T., Watts, A., Huang, K.C., Ulrich, A.S., and Martinac, B. (2011) Bilayer-mediated clustering and functional interaction of MscL channels. *Biophys J.* 100(5):1252-60.
- Green, W.N., and Claudio, T. (1993) Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. *Cell.* 74(1):57-69.
- Guidoni, L., Torre, V., and Carloni, P. (1999) Potassium and sodium binding to the outer mouth of the K⁺ channel. *Biochemistry*; 38(27):8599-604.
- Gulbis, J.M., Zhou, M., Mann, S., and MacKinnon, R. (2000) Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science*; 289(5476):123-7.

- Gulbis, J.M., Mann, S., and Mackinnon, R. (1999) Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell*; 97(7):943-52.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., *et al.* (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.*; 57:473-508.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391(2):85-100.
- Hamill, O.P., and Sakmann, B. (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature.* 294(5840):462-4.
- Hanlon, M.R., and Wallace, B.A. (2002) Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry*; 41(9):2886-94.
- Hegermann, J., Overbeck, J., and Schrempf, H. (2006) In vivo monitoring of the potassium channel KcsA in *Streptomyces lividans* hyphae using immuno-electron microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. *Microbiology* 152(Pt 9):2831-41.
- Heginbotham, L., and MacKinnon, R. (1992) The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron*; 8(3):483-91.
- Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K⁺ channel, *J. Gen. Physiol.* 111, 741-749.
- Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) Single *Streptomyces lividans* K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol.* 114, 551-560.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.*; 66(4):1061-7.
- Heginbotham, L., Odessey, E., and Miller, C. (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel. *Biochemistry* 36, 10335-10342.
- Herrick-Davis, K., Grinde, E., and Mazurkiewicz, J.E. (2004) Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* 43(44):13963-71.
- Herrick-Davis, K., Grinde, E., Harrigan, T.J., and Mazurkiewicz, J.E. (2005) Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine_{2c} receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *J Biol Chem.* 280(48):40144-51.
- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2^a ed. USA, Sinauer Associates INC.
- Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3^a ed. USA, Sinauer Associates INC.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117(4):500-44.
- Hong, M., Xu, W., Yoshida, T., Tanaka, K., Wolff, D.J., Zhou, F., Inouye, M., and You, G. (2005) Human organic anion transporter **hOAT1** forms homooligomers. *J. Biol. Chem.* 280(37):32285-90.
- Horio, Y., Hibino, H., Inanobe, A., Yamada, M., Ishii, M., Tada, Y., Satoh, E., Hata, Y., Takai, Y., Kurachi, Y. (1997) Clustering and enhanced activity of an inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, by an anchoring protein, PSD-95/SAP90. *J Biol Chem.* 272(20):12885-8.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science*; 250(4980):533-8.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1991) Two types of inactivation in *Shaker* K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*; 7(4):547-56.
- Huang, M., Volgushev, M., and Wolf, F. (2012) A small fraction of strongly cooperative sodium channels boosts neuronal encoding of high frequencies. *PLoS One.* 7(5):e37629.
- Huh, K.H., and Fuhrer C. (2002) Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. *Mol. Neurobiol.* 25(1):79-112. Review.

- Hunter, M., and Giebisch, G. (1987) Multi-barrelled K channels in renal tubules. *Letters to Nature*. 327:522-524.
- Imai, S., Osawa, M., Mita, K., Toyonaha, S., Machiyama, A., Ueda, T., Takeuchi, K., Oiki, S., and Shimada, I. (2012) Functional equilibrium of the **KcsA** structure revealed by NMR *J Biol Chem*.287(47):39634-41.
- Ion Channels of Excitable Membranes*, Hille, B. 3^a ed. (2001) Sinaue Associates.
- Irizarry, S. N., Kutluay, E., Drews, G., Hart, S. J., and Heginbotham, L. (2002) Opening the KcsA K⁺ channel: Tryptophan scanning and complementation analysis lead to mutants with altered gating. *Biochemistry* 41, 13653–13662.
- Isacoff, E.Y., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K⁺ channel. *Nature*; 353(6339):86-90.
- Iwamoto, M., and Oiki, S. (2013) Amphipathic antenna of an inward rectifier K⁺ channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(2):749-54.
- Jacobson, D.A., Weber, C.R., Bao, S., Turk, J., and Philipson, L.H. (2007) Modulation of the pancreatic islet beta-cell-delayed rectifier potassium channel Kv2.1 by the polyunsaturated fatty acid arachidonate. *J. Biol. Chem.* 282(10):7442-9.
- James, A.F., Sabirov, R.Z., and Okada, Y. (2010) **Clustering** of protein kinase A-dependent **CFTR** chloride channels in the sarcolemma of guinea-pig ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391(1):841-5.
- Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1997) Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.*; 20: 91-123.
- Jenke, M., Sánchez, A., Monje, F., Stühmer, W., Weseloh, R.M., Pardo, L.A. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J.* 22(3):395-403.
- Jiang, Q.X., and Gonen, T. (2012) The influence of lipids on voltage-gated ion channels. *Curr Opin Struct Biol.* 22(4):529-36.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417, 515–522.
- Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1999) Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol.* 3(4):448-58. Review.
- Kamnesky, G., Hirschhorn, O., Shaked, H., Chen, J., Yao, L., and Chill, J.H. (2014) Molecular determinants of tetramerization in the KcsA cytoplasmic domain. *Protein Sci.* Epub ahead of print.
- Keleshian, A.M., Edeson, R.O., Liu, G.J., and Madsen, B.W. (2000) Evidence for cooperativity between nicotinic acetylcholine receptors in patch clamp records. *Biophys. J.* 78(1):1-12.
- Kilic, F., and Rudnick, G. (2000) Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(7):3106-11.
- Kreusch, A., Pfaffinger, P.J., Stevens, C.F., Choe, S. (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the *Shaker* potassium channel. *Nature*. 392(6679):945-8.
- Krishnan, M.N., Trombley, P., and Moczydlowski, E.G. (2008) Thermal stability of the K⁺ channel tetramer: cation interactions and the conserved threonine residue at the innermost site (S4) of the KcsA selectivity filter. *Biochemistry* 47(19):5354-67.
- Krouse, M.E., Schneider, G.T., and Gage, P.W. (1986) A large anion-selective has seven conductance levels. *Nature*. 319:58-60.
- Krouse, M.E., and Wine, J.J. (2001) Evidence that CFTR channels can regulate the open duration of other CFTR channels: cooperativity. *J Membr Biol.* 182(3):223-32.
- Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., *et al.* (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev*; 57:509-26.
- Kuryshv, Y.A., Gudzh, T.I., Brown, A.M., and Wible, B.A. (2000) KChAP as a chaperone for specific K(+) channels. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*; 278(5):C931-41.

- Kutzner, H.J. (1981) The family *Streptomycetaceae*. In: The Prokaryotes - A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. (M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Schlegel, eds.), pp. 2028-2090. Berlin, Springer-Verlag.
- Laver, D.R., O'Neill E.R., and Lamb, G.D. (2004) Luminal Ca²⁺-regulated Mg²⁺ inhibition of skeletal RyRs reconstituted as isolated channels or coupled clusters. *J. Gen. Physiol.* 124(6):741-58.
- Lee, S.Y., and O'Grady, S.M. (2003) Modulation of ion channel function by P2Y receptors. *Cell Biochem Biophys.* 39(1):75-88. Review.
- Lehninger, Principios de Bioquímica*, Nelson, D.L., Cox, M.M., 5^º Ed., (2009) Freeman W.H. and Company Editorial.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J Gen Physiol.*;118(3):303-14.
- Lenaeus, M.J., Burdette, D., Wagner, T., Focia, P.J., Gross, A. (2014) Structures of KcsA in complex with symmetrical quaternary ammonium compounds reveal a hydrophobic binding site. *Biochemistry* 53(32):5365-73.
- Lesage F. (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharm*; 44:1-7.
- Li, M., Jan, N., and Jan, L. Y. (1992) Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the *Shaker* potassium channel. *Science* 257, 1225–1230.
- Lillemeier, B.F., Pfeiffer, J.R., Surviladze, Z., Wilson, B.S., and Davis, M.M. (2006) Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(50):18992-7.
- Liman, E.R., Hess, P., Weaver, F., and Koren, G. (1991). Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature*; 353(6346):752-6.
- Liu, Q.Y., Rasmusson, R.L., Liu, Q.X., and Strauss, H.C. (1998) Voltage-dependent, open channel blockade of the cardiac sarcoplasmic reticulum potassium channel by 4-aminopyridine. *Can J Cardiol.* 14(2):275-80.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2005) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450(7168):376-82.
- López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.H., and Aldrich, R.W. (1993) Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors Channels*; 1(1):61-71.
- MacKinnon, R. and Yellen, G. (1990) Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science*; 250(4978):276-9.
- MacKinnon, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*; 350: 232-6.
- MacKinnon, R., and Miller, C. (1989) Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science*; 245(4924):1382-5.
- MacKinnon, R., Aldrich, R.W., and Lee, A.W. (1993) Functional stoichiometry of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science*; 262(5134):757-9.
- Maguy, A., Herbert, T.E., and Nattel, S. (2006) Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res.* 69(4):798-807.
- Manella, C., Colombini, M., and Frank, J. (1983) Structural and functional evidence for multiple channel complexes in the outer membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(8):2243-7.
- Manella, C.A. (1982) Structure of the outer mitochondrial-membrane — ordered arrays of pore-like subunits in outer-membrane fractions from *Neurospora-crassa* mitochondria. *J. Cell Biol.* 94:680–687.
- Manella, C.A., and Colombini, M. (1984) Evidence that the crystalline arrays in the outer membrane of *neurospora* mitochondria are composed of the voltage-dependent channel protein. *Biochim. Biophys. Acta* 774:206–214.
- Mansoor, S.E., Palczewski, K., and Farrens, D.L., (2006) Rhodopsin self-associates in asolectin liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(9):3060-5.
- Marius, P., Zagnoni, M., Sandison, M.E., East, J.M., Morgan, H., and Lee, A.G. (2008) Binding of anionic lipids to at least three nonannular sites on the potassium channel KcsA is required for channel opening. *Biophys J.* 94(5):1689-98.

- Marx, S.O., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Henrikson, C., Ondrias, K., and Marks, A.R. (2001) Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res.* 88(11):1151-8.
- Marx, S.O., Ondrias, K., and Marks, A.R. (1998) Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors) *Science.* 281(5378):818-21.
- McIntosh, T.J., and Simon, S.A. (2006) Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35:177-98. Review.
- Mercado, F., Vega, R., and Soto, E. (2005) Canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones: estructura, función, farmacología y fisiopatología. *Rev. Neurol.* 41(11):667-675.
- Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., and Schrempf, H. (1999) Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.*;462(3):447-52.
- Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., and Schrempf, H. (2001) Mutations that stabilizing an open conformation within the external region of the permeation pathway of the potassium channel KcsA. *Eur. Biophys. J.* 30:385-391.
- Michel, A.D., and Fonfria, E. (2007) Agonist potency at P2X7 receptors is modulated by structurally diverse lipids. *Br. J. Pharmacol.* 152(4):523-37.
- Misonou, H., Thompson, S.M., and Cai, X. (2008) Dynamic regulation of the Kv2.1 voltage-gated potassium channel during brain ischemia through neuroglial interaction. *J. Neurosci.* 28(34):8529-38.
- Misonou, H., Mohapatra, D.P., and Trimmer, J.S. (2005) Kv2.1: a voltage-gated K⁺ channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology.* 26(5):743-52. Review.
- Misonou, H., Mohapatra, D.P., Park, E.W., Leung, V., Zhen, D., Misonou, K., Anderson, A.E., and Trimmer, J.S. (2004) Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat Neurosci.* 7(7):711-8.
- Molecular Biology of the Cell*, Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 4^a ed. (2002) Garland Science.
- Molecular Cell Biology*, Lodish, H., Berk, A., and Kaiser, C.A., (2000) 6^a ed. W.H. Freeman and Co.
- Morales, A., de Juan, E., Fernández-Carvajal, AM., Martínez-Pinna, J., Poveda, JA., Encinar, JA., Ivorra, I., González-Ros, J.M. (2006) Nicotinic acetylcholine receptor properties are modulated by surrounding lipids: an in vivo study. *J Mol Neurosci.* 30(1-2):5-6.
- Morales, A., Aleu, J., Ivorra, I., Ferragut, J.A., Gonzalez-Ros, J.M., and Miledi, R. (1995) Incorporation of reconstituted acetylcholine receptors from Torpedo into the *Xenopus* oocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(18): 8468-72.
- Morenilla-Palao, C., Pertusa, M., Meseguer, V., Cabedo, H., and Viana, F. (2009) Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity *J. Biol. Chem.* 284(14):9215-24.
- Mueller, N.S., Wedlich-Söldner, R., and Spira, F. (2012) From mosaic to patchwork: matching lipids and proteins in membrane organization. *Mol. Membr. Biol.* 29(5):186-96. Review.
- Nakamura, Y., Yasukochi, M., Kobayashi, S., Uehara, K., Honda, A., Inoue, R., Imanaga, I., and Uehara, A. (2007) Cell membrane-derived lysophosphatidylcholine activates cardiac ryanodine receptor channels. *Pflugers Arch.* 453(4):455-62
- Naundorf, B., Wolf, F., and Volgushev, M.(2006) Unique features of action potential initiation in cortical neurons. *Nature.* 440(7087):1060-3.
- Neher, E. (1988) Exploring secretion control by patch-clamp techniques, in: Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lecture, pp. 37-53, Raven Press, New York.
- Neher, E., (1982). Unit conductance studies in biological membranes, in: Techniques in Cellular Physiology (P.F.Baker, ed.), pp. 1-16, Elsevier, Amsterdam.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 260(5554):799-802.
- Nimigeon, C.M., and Miller, C. (2002) Na⁺ block and permeation in a K⁺ channel of known structure. *J Gen Physiol.* 120(3):323-35.

- Ogielska, E.M., Zagotta, W.N., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Haab, J., and Aldrich, R.W. (1995) Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels. *Biophys. J.*; 69(6):2449-57.
- Papazian, D.M., Timpe, L.C., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1991). Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*; 349(6307):305-10.
- Papazian, D.M., Shao, X.M., Seoh, S.A., Mock, A.F., Huang, Y., and Wainstock, D.H. (1995) Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in *Shaker* K⁺ channel. *Neuron*; 14(6):1293-301.
- Pecho-Vrieseling, E., Rieker, C., Fuchs, S., Bleckmann, D., Esposito, M.S., Botta, P., Goldstein, C., Bernhard, M., Galimberti, I., Müller, M., Lüthi, A., Arber, S., Bouwmeester, T., van der Putten, H., and Di Giorgio, F.P. (2014) Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. *Nat. Neurosci.* 17(8):1064-72.
- Pérez-García, M.T., López-López, J.R., and González, C. (1999) Kvbeta1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O₂ sensitivity to kv4.2 but not to *Shaker* channels. *J Gen Physiol.*; 113(6):897-907.
- Perozo, E., Cortes, D.M., and Cuello, L.G. (1998) Three-dimensional architecture and gating mechanism of a K⁺ channel studied by EPR spectroscopy. *Nat Struct Biol.* 5(6):459-69
- Perozo, E., Cortes, D.M., and Cuello, L.G. (1999) Structural rearrangements underlying K⁺ channel activation gating, *Science* 285, 73-78.
- Planell-Cases, R., Caprini, M., Lerma, J., and Ferrer-Montiel, A. (2005) Canalopatías. *Investigación y Ciencia*; 344: 20-31.
- Pourrier, M., Schram, G., and Nattel, S. (2003) Properties, expression and potential roles of cardiac K⁺ channel accessory subunits: Mink, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J. Membr. Biol.*; 194(3):141-52.
- Poveda, J.A., Encinar, J.A., Fernández, A.M., Mateo, C.R., Ferragut, J.A., González-Ros, J.M. (2002) Segregation of phosphatidic acid-rich domains in reconstituted acetylcholine receptor membranes. *Biochemistry* 41(40):12253-62.
- Powl, A.M., East, J.M., and Lee, A.G. (2008) Anionic phospholipids affect the rate and extent of flux through the mechanosensitive channel of large conductance MscL. *Biochemistry.* 47(14):4317-28.
- Raghuram, V., Mak, D.O., and Foskett, J.K. (2001) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(3):1300-5.
- Rahman, T.U., Skupin, A., Falcke, M., and Taylor, C.W. (2009) Clustering of IP₃ receptors by IP₃ retunes their regulation by IP₃ and Ca²⁺. *Nature* 458(7238):655-659.
- Reusch, R.N. (1999) *Streptomyces lividans* potassium channel contains poly-(R)-3-hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate. *Biochemistry.* 38(47):15666-72.
- Rios, C.D., Jordan, B.A., Gomes, I., and Devi, L.A. (2001) G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol. Ther.* 92(2-3):71-87.
- Ríos, E., Figueroa, L., Manno, C., Kraeva, N., and Riazi, S. (2015) The couplonopathies: A comparative approach to a class of diseases of skeletal and cardiac muscle. *J Gen Physiol.* 145(6):459-74.
- Riquelme, G., Lopez, E., Garcia-Segura, L.M., Ferragut, J.A., and Gonzalez-Ros, J.M. (1990) Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels. *Biochemistry.* 29(51):11215-22.
- Rogawski, MA. (2000) KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *TINS*; 23(9):393-8.
- Saedi, M.S., Conroy, W.G., Lindstrom, J. (1991) Assembly of Torpedo acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol.* 112(5):1007-15.
- Saito, A., Inui, M., Radermacher, M., Frank, J., and Fleischer, S. (1988) Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 107(1):211-9.
- Sakmann, B., and Neher, E. (1984). Patch-clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 46: 455-472.
- Salussolia, C.L., Gan, Q., Kazi, R., Singh, P., Allopenna, J., Furukawa, H., Wollmuth, L.P. (2013) A eukaryotic specific transmembrane segment is required for tetramerization in AMPA receptors. *J Neurosci.* 33(23):9840-5.

- Schindler, H. (1984) Cooperativity between acetylcholine-receptor channels. *Prog. Clin. Biol. Res.* 164:291-4.
- Schindler, H., Spillecke, F., and Neumann, E. (1984) Different channel properties of Torpedo acetylcholine receptor monomers and dimers reconstituted in planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81(19):6222-6.
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*, *EMBO J.* 14, 5170-5178.
- Seino, S., and Miki, T. (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*; 81(2):133-76.
- Shen, N. V., and Pfaffinger, P. J. (1995) Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins. *Neuron* 14, 625–633.
- Sheng, M., Mi, Tsaur, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. (1992). Subcellular segregation of two A-type K⁺ channel proteins in rat central neurons. *Neuron.* 9:271-284.
- Shi, G., Nakahira, K., Hammond, S., Rhodes, K.J., Schechter, L.E., and Trimmer, J.S. (1996) Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron*; 16(4):843-52.
- Shieh, C.C., Coghlan, M., Sullivan, J.P., and Gopalakrishnan, M. (2000) Potassium Channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev*; 52:557-93.
- Sigworth, F.J. (1981) Interpreting power spectra from nonstationary membrane current fluctuations. *Biophys J.* 35(2):289-300.
- Sigworth, F.J. (1986) The patch clamp is more useful than anyone had expected. *Fed. Proc.* 45: 2673-2677.
- Sigworth, F.J., and Neher, E., (1980) Single Na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature*, 287: 447-449.
- Single-Channel Recording*, Sakmann, B., and Neher, E. 2^a ed. (2010) Springer.
- Skoge, M.L., Endres, R.G., and Wingreen, N.S. (2006) Receptor-receptor coupling in bacterial chemotaxis: evidence for strongly coupled clusters *Biophys J.* 90(12):4317-26.
- Sonkusare, S.K., Bonev, A.D., Ledoux, J., Liedtke, W., Kotlikoff, M.I., Heppner, T.J., Hill-Eubanks, D.C., Nelson, M.T. (2012) Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science.* 336(6081):597-601.
- Sourjik, V., and Berg, H.C. (2004) Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature* 428(6981):437-41.
- Spira, F., Mueller, N.S., Beck, G., von Olshausen, P., Beig, J., Wedlich-Söldner, R. (2012) Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat. Cell. Biol.* 14(6):640-8.
- Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M., and Schrempf, H. (2000) Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* 472(1):83-7.
- Storm, F. (1990) Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res*; 83:161-87.
- Stradner, A., Sedgwick, H., Cardinaux, F., Poon, W.C., Egelhaaf, S.U., and Schurtenberger, P. (2004) Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature* 432(7016):492-5.
- Strang, C., Cushman, S. J., DeRubeis, D., Peterson, D., and Pfaffinger, P. J. (2001) A central role for the T1 domain in voltage-gated potassium channel formation and function. *J. Biol. Chem.* 276, 28493–28502.
- Structure, Function and modulation of neuronal voltage-gated ion channels*, Gribkoff, V.K., and Kaczmarec, L.K., (2009). Wiley.
- Stühmer, W. (1992) Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* 207:319-39.
- Stühmer, W. (1998) Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* 293:280-300.
- Talley, E.M., Sirois, J.E., Lei, Q., and Bayliss, D.A. (2003) Two-Pore-Domain (KCNK) Potassium Channels: Dynamic Roles in Neuronal Function. *The Neuroscien*; 9(1):46-56.
- Tamargo, J. (2004) Los poros y los canales iónicos regulan la actividad celular. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 70: 9-31.

- Tateishi, Y., Hattori, M., Nakayama, T., Iwai, M., Bannai, H., Nakamura, T., Michikawa, T., Inoue, T., Mikoshiba, K. (2005) Cluster formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor requires its transition to open state. *J Biol Chem.* 280(8):6816-22.
- Taufiq-Ur-Rahman, Skupin A., Falcke, M., and Taylor, C.W. (2009) Clustering of IP₃ receptors by IP₃ retunes their regulation by IP₃ and Ca²⁺. *Nature*; 458(7238): 655–659.
- Tayebati, S.K., Tomassoni, D., Nwankwo, I.E., Di Stefano, A., Sozio, P., Cerasa, L.S., and Amenta, F. Modulation of monoaminergic transporters by choline-containing phospholipids in rat brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 12(1):94-103.
- Taylor, A.P. (2014) Neurodegeneration's spread. *The Scientist.* August, 4.
- Terlau, H., Stühmer, W. (1998) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften*; 85(9):437-44.
- Tinker, A., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1996) Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels. *Cell.* 87(5):857-68.
- Triano, I., Barrera, F.N., Renart, M.L., Molina, M.L., Fernández-Ballester, G., Poveda, J.A., Fernández, A.M., Encinar, J.A., Ferrer-Montiel, A.V., Otzen, D., and González-Ros, J.M. (2010) Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry.* 49(25):5397-404.
- Trimmer, J.S. (1991) Immunological identification and characterization of a delayed rectifier K⁺ channel in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10764-10768.
- Tu, L. W., Santarelli, V., Sheng, Z. F., Skach, W., Pain, D., and Deutsch, C. (1996) Voltage-gated K⁺ channels contain multiple intersubunit association sites. *J. Biol. Chem.* 271, 18904–18911.
- Tu, L., and Deutsch, C. (1999) Evidence for dimerization of dimers in K⁺ channel assembly. *Biophys J.* 76(4):2004-17.
- Ujwal, R., Cascio, D., Chaptal, V., Ping, P., and Abramson, J. (2009) Crystal packing analysis of murine VDAC1 crystals in a lipidic environment reveals novel insights on oligomerization and orientation. *Channels (Austin).* 3(3):167-70.
- Undrovinas, A.I., Fleidervish, I.A., and Makielski, J.C. (1992) Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. *Circ. Res.* 71(5):1231-41.
- Ursell, T., Huang, K.C., Peterson, E., and Phillips, R. (2007) Cooperative gating and spatial organization of membrane proteins through elastic interactions. *PLoS Comput Biol.* 3(5):e81.
- Valiyaveetil, F.I., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel. *Biochemistry.* 41(35):10771-7.
- van den Brink-van der Laan, E., Chupin, V., Killian, J.A., and de Kruijff, B. (2004) Stability of KcsA tetramer depends on membrane lateral pressure. *Biochemistry* 43(14):4240-50.
- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., and Wulff, H. (2005) International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol Rev*; 57:463-72.
- Weingarh, M., Prokofev, A., van der Crujisen, E.A., Nand, D., Bonvin, A.M., Pongs, O., and Baldus, M. (2013) Structural determinants of specific lipid binding to potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* 135(10):3983-8.
- Welker, P., Böhlick, A., Mutig, K., Salanova, M., Kahl, T., Schlüter, H., Blottner, D., Ponce-Coria, J., Gamba, G., and Bachmann, S. (2008) Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 295(3):F789-802.
- Xu, Y., Ramu, Y., and Lu, Z. (2008) Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K⁺ channels. *Nature* 451(7180):826-9.
- Yang, Y., Yan, Y., and Sigworth, F.J. (1997) How does the W434F mutation block current in *Shaker* potassium channels? *J. Gen. Physiol.* 109(6):779-89.
- Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*; 419(6902):35-42.
- Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T., and Mackinnon, R. (1991) Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science*; 251(4996):939-42.

- Yin, C.C., Blayney, L.M., and Lai, F.A. (2005) Physical coupling between ryanodine receptor-calcium release channels. *J. Mol. Biol.* 349(3):538-46.
- Yool, A.J., Schwarz, T.L. (1991) Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature*; 349: 700-4.
- Yu, F. H., and Catterall, W. A. (2004) The VGL-chanome: A protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci. STKE 2004 re15*, 1–17.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T., and Aldrich, R.W. (1990) Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*; 250(4980):568-71.
- Zakharian, E., and Reusch, R. N. (2004a) *Streptomyces lividans* potassium channel KcsA is regulated by the potassium electrochemical gradient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 429–436
- Zakharian, E., and Reusch, R. N. (2004b) Functional evidence for a supramolecular structure for the *Streptomyces lividans* potassium channel KcsA *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1059–1065
- Zerangue, N., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (2000) An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional *Shaker* channels lacking T1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(7):3591-5.
- Zhang, Y., McKay, S.E., Bewley, B., and Kaczmarek, L.K. (2008) Repetitive firing triggers clustering of Kv2.1 potassium channels in *Aplysia* neurons. *J. Biol. Chem.* 283(16):10632-41.
- Zhao, X., Norris, S.J., Liu, J. Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. 2014. *Biochemistry.* 53(27):4323-33.
- Zheng, J., and Sigworth, F.J. (1998) Intermediate conductances during deactivation of heteromultimeric *Shaker* potassium channels. *J Gen Physiol.* 112(4):457-74.
- Zheng, J., and Sigworth, F.J. (1997) Selectivity changes during activation of mutant *Shaker* potassium channels. *J Gen Physiol.* 110(2):101-17.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*; 414,43–48.



OTRAS PUBLICACIONES





OTRAS PUBLICACIONES

- 1) Encinar, J.A., Fernández, A.M., **Molina, M.L.**, Molina, A., Poveda, J.A., Albar, J.P., López-Barneo, J., Gavilanes, F., Ferrer-Montiel, A.V., and González-Ros, J.M. (2002) Tyrosine phosphorylation of the inactivating peptide of the shaker B potassium channel: a structural-functional correlate. *Biochemistry* Oct 8;41(40):12263-9.
- 2) Encinar, J.A., Fernández, A.M., Poveda, J.A., **Molina, M.L.**, Albar, J.P., Gavilanes, F., and Gonzalez-Ros, J.M. (2003) Probing the channel-bound shaker B inactivating peptide by stereoisomeric substitution at a strategic tyrosine residue. *Biochemistry* Jul 29;42(29):8879-84.
- 3) **Molina, M.L.**, Encinar, J.A., Barrera, F.N., Fernández-Ballester, G., Riquelme, G., and González-Ros, J.M. (2004) Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* Nov 30;43(47):14924-31.
- 4) Encinar, J.A., **Molina, M.L.**, Poveda, J.A., Barrera, F.N., Renart, M.L., Fernández, A.M., and González-Ros, J.M. (2005) The influence of a membrane environment on the structure and stability of a prokaryotic potassium channel, KcsA. *FEBS Lett.* Sep 26;579(23):5199-204.
- 5) Barrera, F.N., Renart, M.L., **Molina, M.L.**, Poveda, J.A., Encinar, J.A., Fernández, A.M., Neira, J.L., and González-Ros, J.M. (2005) Unfolding and refolding in vitro of a tetrameric, alpha-helical membrane protein: the prokaryotic potassium channel KcsA. *Biochemistry* Nov 1;44(43):14344-52.
- 6) Giudici, M., Poveda, J.A., **Molina, M.L.**, de la Canal, L., González-Ros, J.M., Pfüller, K., Pfüller, U., and Villalaín, J. (2006) Antifungal effects and mechanism of action of viscotoxin A3. *FEBS J.* Jan;273(1):72-83.
- 7) **Molina, M.L.**, Barrera, F.N., Fernández, A.M., Poveda, J.A., Renart, M.L., Encinar, J.A., Riquelme, G., and González-Ros, J.M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J. Biol. Chem.* Jul 7;281(27):18837-48. Epub 2006 May 2.
- 8) Renart, M.L., Barrera, F.N., **Molina, M.L.**, Encinar, J.A., Poveda, J.A., Fernández, A.M., Gómez, J., and González-Ros, J.M. (2006) Effects of conducting and blocking ions on the structure and stability of the potassium channel KcsA. *J. Biol. Chem.* Oct 6;281(40):29905-15. Epub 2006 Jun 30.
- 9) **Molina, M.L.**, Barrera, F.N., Encinar, J.A., Renart, M.L., Fernández, A.M., Poveda, J.A., Santoro, J., Bruix, M., Gavilanes, F., Fernández-Ballester, G., Neira, J.L., and González-Ros, J.M. (2008) N-type inactivation of the potassium channel KcsA by the Shaker B "ball" peptide: mapping the inactivating peptide-binding epitope. *J. Biol. Chem.* Jun 27;283(26):18076-85. doi: 10.1074/jbc.M710132200. Epub 2008 Apr 22.
- 10) Triano, I., Barrera, F.N., Renart, M.L., **Molina, M.L.**, Fernández-Ballester, G., Poveda, J.A., Fernández, A.M., Encinar, J.A., Ferrer-Montiel, A.V., Otzen, D., and González-Ros, J.M. (2010) Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry* Jun 29;49(25):5397-404. doi: 10.1021/bi1003712.

- 11) Renart, M.L., Montoya, E., Fernández, A.M., **Molina, M.L.**, Poveda, J.A., Encinar, J.A., Ayala, J.L., Ferrer-Montiel, A.V., Gómez, J., Morales, A., and González Ros, J.M. (2012) Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel. *Biochemistry* May 8;51(18):3891-900. doi: 10.1021/bi201497n. Epub 2012 Apr 27.
- 12) Giudici, A.M., **Molina, M.L.**, Ayala, J.L., Montoya, E., Renart, M.L., Fernández, A.M., Encinar, J.A., Ferrer-Montiel, A.V., Poveda, J.A., and González-Ros, J.M. (2013) Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: relative abundance and interactions involved. *Biochim. Biophys. Acta.* Feb;1828(2):193-200. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.09.020. Epub 2012 Sep 27.
- 13) Poveda, J.A., Giudici, A.M., Renart, M.L., **Molina, M.L.**, Montoya, E., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Encinar, J.A., and González-Ros, J.M. (2014) Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochim. Biophys. Acta.* Jun;1838(6):1560-7. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.10.023. Epub 2013 Nov 8. Review.
- 14) **Molina, M.L.**, Giudici, A.M., Poveda, J.A., Fernández-Ballester, G., Montoya, E., Renart, M.L., Fernández, A.M., Encinar, J.A., Riquelme, G., Morales, A., and González-Ros, J.M. Competing lipid-protein and protein-protein interactions determine clustering and gating patterns in KcsA. (Send to publish to JBC)
- 15) **Molina, M.L.**, and Gonzalez-Ros, J.M. Acidification modulates the activity of KcsA by the functional and physical uncoupling of channel clusters. (In preparation)
- 16) **Molina, M.L.**, and Gonzalez-Ros, J.M. The role of the C- and N-terminal in the clustering and coupled gating of KcsA. (In preparation)
- 17) **Molina, M.L.**, and Gonzalez-Ros, J.M. Anticlustering peptides as a new potential drug strategy specific for ion channels, receptors and membrane proteins modulation. (In preparation)
- 18) **Molina, M.L.**, and Gonzalez-Ros, J.M. Discovery of a potassium channels activating peptide that could be the basis for developing new drugs for diseases involving cell hyperexcitability. (In preparation)
- 19) **Molina, M.L.**, and Gonzalez-Ros, J.M. The mechanism of fast inactivation by the inactivation peptide of Shaker, ShB, in the potassium channel KcsA. (In preparation)
- 20) **Molina, M.L.**, and Gonzalez-Ros, J.M. The coupled gating mechanism between KcsA potassium channels. (In preparation)

