



TRABAJO FIN DE GRADO

Papel de los lípidos aniónicos en la modulación del canal de potasio KcsA



Autora: Lorena Crespo Moya

Tutora: Ana Marcela Giudici Besseghini

Co-tutor: Jose Antonio Poveda Larrosa

Facultad de Ciencias Experimentales
Área de conocimiento Química Física
Departamento Agroquímica y Medio Ambiente
Curso 2023/2024
Grado en Biotecnología



ÍNDICE

1.	Introducción.....	5
1.1.	Canales iónicos	5
1.2.	Estructura del canal de potasio KcsA.....	5
1.2.1.	Actividad del canal KcsA	6
1.3.	Interacción de KcsA con lípidos de la membrana	8
1.3.1.	Lípidos unidos a sitios “no anulares”	9
1.4.	Estudio del efecto directo o indirecto de los fosfolípidos aniónicos	9
1.5.	Espectroscopia de fluorescencia.....	10
1.6.	Fenómeno FRET	11
1.6.1.	Transferencia de energía de resonancia de Förster entre fluoróforos idénticos (Homo-FRET) 12	
1.7.	Anisotropía de fluorescencia.....	12
1.8.	Estudio de la Anisotropía de fluorescencia mediante el Homo- FRET en KcsA	13
2.	Antecedentes y objetivos.....	15
3.	Materiales y métodos.....	18
3.1.	Plásmidos	18
3.2.	Purificación KcsA	18
3.2.1.	Transformación	18
3.2.2.	Preinóculo.....	19
3.2.3.	Inóculo	19
3.3.-	Purificación de proteínas	20
3.3.1.-	Resuspensión	20
3.3.2.	Solubilización	21
3.3.3.	Cromatografía de afinidad	21
3.3.4.-	Electroforesis SDS-PAGE	22
3.3.5.-	Diálisis	22
3.3.6.	Cuantificación de la proteína	23
3.4.-	Reconstitución de KcsA en liposomas de ASOL y ASOL POPA	24
3.5.-	KcsA en micelas mixtas detergente-lípido (DLM).....	24
3.6.-	Anisotropía de fluorescencia	25
4.	Resultados	27
4.1.	Conformación del mutante KcsA W67	27

4.2. Conformación del mutante KcsA W67 R64A	29
5. Discusión	31
6. Conclusiones y proyección futura	34
7. Bibliografía.....	36



PALABRAS CLAVE: canales mutantes de K^+ , anisotropía de fluorescencia, Homo-FRET, fosfolípidos aniónicos, modulación e inactivación.

RESUMEN

De trabajos anteriores, se sabe que la actividad del canal de potasio KcsA está modulada por fosfolípidos aniónicos en la membrana lipídica. En este estudio se han utilizado los mutantes KcsA W67 y KcsA W67 R64A para determinar si dicho efecto es directo o indirecto, afectando a la conformación del filtro de selectividad (SF) del canal. Los mutantes fueron tanto reconstituidos en bicapas lipídicas como solubilizado en detergente, en ambos casos con o sin fosfolípido aniónico. La conformación del SF se determinó a través de mediciones de la anisotropía de fluorescencia mediante Homo-FRET, que nos dan información acerca de las distancias entre los residuos W67 de cada monómero. Este estudio se ha realizado con el canal a pH 7 (estado cerrado) y pH 4 (estado abierto) y en función de la concentración de K^+ añadida, a fin de estimar la afinidad del SF por este ion, dato que nos indica en qué conformación se encuentra este dominio. Así, a pH 7, el SF tiene alta afinidad por K^+ (estado conductor). Sin embargo, a pH 4 la afinidad es baja (estado inactivado). Encontramos que, independientemente de cómo se añadan los lípidos aniónicos, la afinidad por K^+ aumenta a pH 4, indicativo de un cambio conformacional desde un estado inactivado hacia uno conductor sugiriendo una interacción directa de los fosfolípidos con el canal. En la mutación R64A no se observa ningún efecto de los lípidos aniónicos sobre la afinidad por K^+ en el SF del canal, concluyendo que el efecto de estos fosfolípidos se da a través de su unión a los sitios no anulares.

ABSTRACT

From previous studies, it is known that the activity of the potassium channel KcsA is modulated by anionic phospholipids in the lipid membrane. This study used mutants KcsA W67 and KcsA W67 R64A to determine if this effect is direct or indirect, affecting the conformation of the selectivity filter (SF) of the channel. The mutants were reconstituted in lipid bilayers or solubilized in detergent, with or without anionic phospholipids. SF conformation was determined by measuring fluorescence anisotropy using Homo-FRET, which provides information about the distances between W67 residues of each monomer. This study was conducted with the channel at pH 7 (closed state) and pH 4 (open state), varying the concentration of added K^+ to estimate SF affinity for this ion, indicating the conformation of this domain. At pH 7, the SF exhibits high affinity for K^+ (conductive state). However, at pH 4, the affinity is low (inactivated state). We found that, regardless of how anionic lipids are added, K^+ affinity increases at pH 4, indicating a conformational change from an inactivated to a conductive state, suggesting a direct interaction of phospholipids with the channel. In the R64A mutation, no effect of anionic lipids on K^+ affinity in the channel's SF was observed, concluding that these phospholipids affect the SF by binding to non-annular sites.

1. Introducción

1.1. Canales iónicos

Los canales iónicos son una superfamilia de proteínas integrales de membrana y están presentes en todos los organismos vivos, desde los procariotas hasta los eucariotas. Estos canales iónicos desempeñan funciones fisiológicas claves como la excitabilidad celular, la transmisión sináptica, la contracción muscular o la señalización celular. Por lo tanto, la disfunción de estos canales puede dar lugar a enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, cardiovascular, respiratorio, entre otros, conocidas como canalopatías [1].

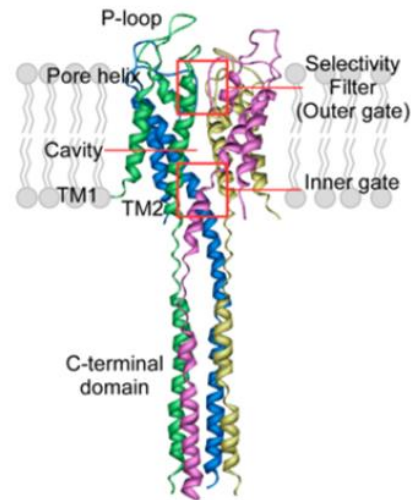
Consisten en una familia de proteínas integrales de membrana que forman poros acuosos y estrechos en las membranas que permiten el paso selectivo a iones como Na^+ , K^+ , Ca^{+2} o Cl^- a gran velocidad (10^6 iones/segundo). En estos canales, los iones fluyen en favor de gradiente electroquímico [2].

1.2. Estructura del canal de potasio KcsA

KcsA es un canal de K^+ procariótico de la bacteria *Streptomyces lividans*, considerado como el principal modelo para descifrar la estructura y la función de la superfamilia de los canales de K^+ , así como para estudiar la modulación de los mismos a través de las interacciones lípido-proteína.

La estructura proteica de este canal se ha determinado mediante cristalografía de rayos X, y consiste en una proteína transmembrana homotetramérica, es decir, está formada por 4 monómeros idénticos dispuestos alrededor de un poro acuoso central a través de cual fluyen los iones. Cada monómero consta de un dominio N-terminal citosólico, una hélice transmembrana TM1 conectada a un segundo segmento transmembrana TM2, seguido de un dominio citoplasmático C-terminal. Los segmentos transmembrana TM1 y TM2 están conectados a través de la hélice del poro, bucles extracelulares y seguida de un filtro de selectividad iónica (SF) [3]. Los C-terminales de los 4 monómeros forman un conjunto de hélices que actúan como la puerta interna del canal, la cual es sensible a pH [4]. Por otro lado, SF contiene una secuencia consenso de aminoácidos 75-TVGYG-79, homóloga a los canales eucariotas de K^+ y actúa como una puerta externa del canal determinando de manera altamente selectiva que los iones de K^+ puedan pasar a través del canal (figura 1).

Figura 1: Esquema de la estructura del canal KcsA (de la base de datos PDB: 3EEF) [3].



1.2.1. Actividad del canal KcsA

Los carbonilos del esqueleto de SF forman 4 sitios de unión para el K^+ (S1-S4) desde el lado extracelular hasta el lado intracelular (figura 2A). En función de la concentración de iones de K^+ , el SF puede adoptar dos conformaciones distintas, una conformación colapsada o no conductora (figura 2B) que resulta cuando la concentración de iones de K^+ es baja, de manera que el K^+ solo se une a los sitios S1 y S4 del SF y no habrá iones en el centro del SF (S2-S3), mientras la conformación conductora (figura 2C) resulta cuando la concentración de iones de K^+ es alta, provocando un cambio conformacional de manera que los iones de K^+ puede acceder a todos los sitios del SF (S1, S2, S3 y S4) permitiendo su conducción[4].

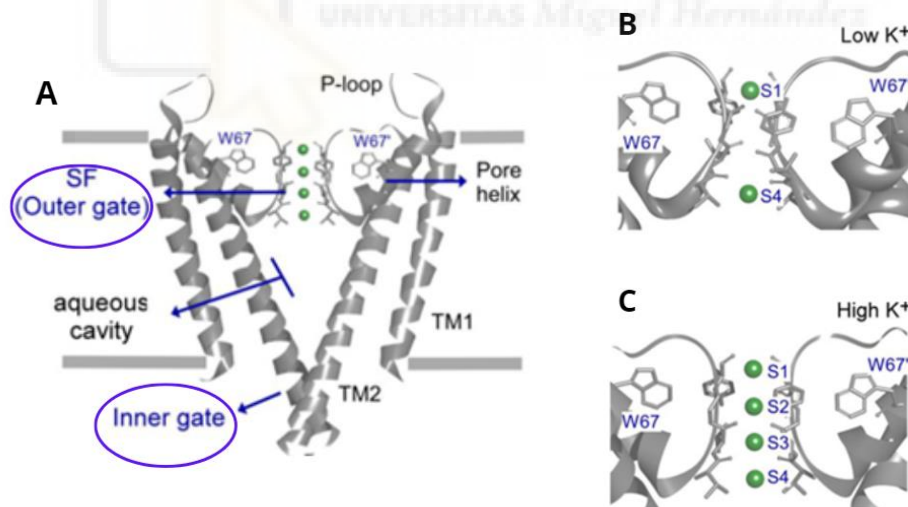
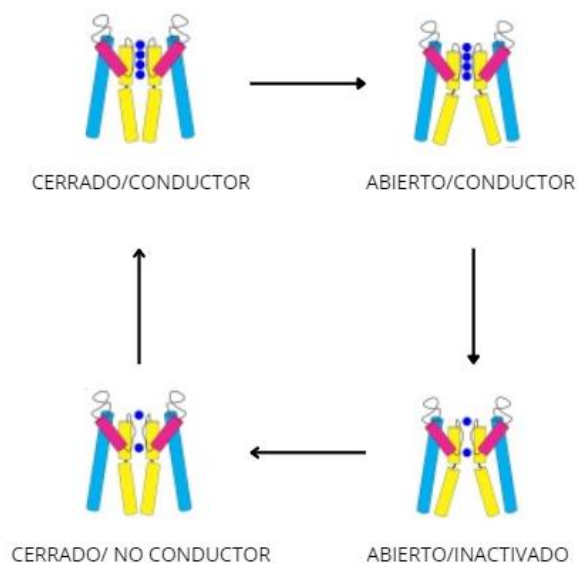


Figura 2 A, Estructura de la región transmembrana de KcsA, donde se resaltan las partes más importantes del canal, incluyendo las dos compuertas del canal que determinan el paso de iones a su través; B, estructura del SF en un estado no conductor en condiciones de baja concentración de K^+ (entrada PDB: 1K4D); C, estructura del SF en un estado conductor cuando hay una alta concentración de K^+ (entrada PDB: 1K4C). En los tres paneles se muestran sólo dos de las cuatro subunidades del canal para una mayor claridad en la imagen.

Por otro lado, la compuerta interna puede adoptar un estado abierto o cerrado y es dependiente de pH. Entre las dos compuertas (interna y externa) de KcsA existe una comunicación alostérica definiendo así las cuatro etapas del ciclo de actividad de KcsA (Figura 3) [5].

En el estado de reposo, a pH 7 (pH neutro) y en presencia de K^+ , el entrecruzamiento de los extremos C-terminales de los segmentos TM2 forman una barrera que impide el paso de los iones de K^+ , mientras que la compuerta externa (SF) se encontraría en una conformación conductora dando lugar a un estado cerrado/conductor. Como se ha mencionado anteriormente la compuerta interna es sensible a pH, y cuando hay una bajada de pH intracelular, la compuerta interna se abre debido a la protonación de los residuos involucrados, cambiando a un estado abierto/conductor permitiendo la activación del canal y por ende, el flujo de iones. Dado que la conformación anterior no es estable, solo dura unos segundos puesto que la compuerta externa (SF) evoluciona de un estado conductor a un estado conocido como inactivo, evitando el paso de los iones, de manera que el canal en este instante se encuentra en un estado abierto/inactivado. Existen tres residuos claves (E71, D80 y W67) en cada monómero, ubicados detrás y en contacto con el filtro de selectividad, denominados triada de inactivación, que son claves para estabilizar el estado inactivado mediante la formación de enlaces de hidrógeno, provocando que el filtro de selectividad se desestabilice pasando a su conformación inactivada [6], [7]. Cuando el pH vuelve a ser neutro, la compuerta interna se cierra dando un lugar a un estado cerrado/ no conductor. Por último, la compuerta externa (SF) vuelve a su estado conductor regresando al estado cerrado/conductor. De esta manera, la coordinación de estas dos compuertas (los C-terminal de TM2 y SF) definen el ciclo de actividad de KcsA (figura 3) [4], [5], [8].

Figura 3: Ciclo de actividad del canal KcsA, representando los 4 estados conformacionales que puede adoptar KcsA a altas concentraciones de K^+ en función del pH: estado cerrado/conductor a pH 7, estado abierto/conductor a pH 4, estado abierto/inactivado a pH 4 y estado cerrado/no conductor a pH 7.



1.3. Interacción de KcsA con lípidos de la membrana

El canal KcsA al tratarse de una proteína de membrana se encuentra rodeado de lípidos de distinta naturaleza que conforman la bicapa lipídica. Estos lípidos que rodean el canal pueden modular fuertemente la estructura y función de manera indirecta alterando las propiedades físicas de la membrana (la tensión, la curvatura o el grosor de la bicapa lipídica) o de manera directa uniéndose a sitios específicos en el canal, habiéndose identificado tres regiones de unión de los lípidos en la proteína [3], [9].

Estos sitios de unión de los lípidos al canal KcsA consisten en una región rica en argininas (R27, R117, R121 y R122) (figura 4) en el lado citoplasmático C-terminal cerca de la membrana lipídica (lado intracelular), que otorgan un aumento de la estabilidad del tetrámero KcsA frente a la desnaturalización química, y otra región en el extremo N-terminal de KcsA que contiene los aminoácidos R11, R19 y K14 (figura 4) y que se ha propuesto que actúa de “antena” sensible a la carga, que al interactuar con los fosfolípidos aniónicos estabiliza la conformación abierta de la puerta interna del canal [1], [3].

Por último, está el **sitio de unión lipídica no anular** (los lípidos se unen a surcos entre monómeros proteicos) (figura 4). Consiste en una región, la cual se encuentra entre TM1 y TM2 de dos monómeros adyacentes de KcsA en el lado extracelular de la proteína. En esta región quedan intercalados lípidos aniónicos, interactuando con los residuos R64 de un monómero y R89 del otro monómero (figura 5) [1].

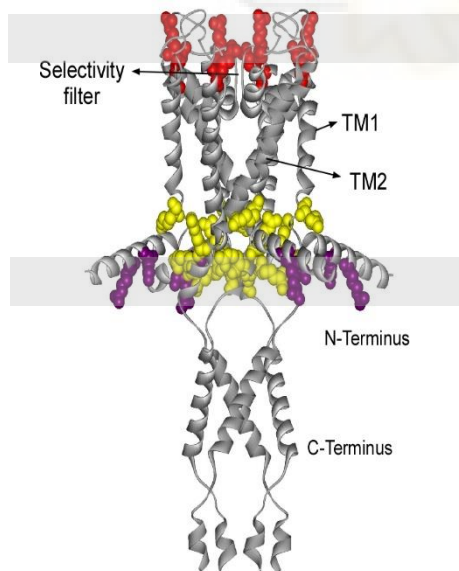


Figura 4: Sitios de unión a fosfolípidos aniónicos en el canal de KcsA. Lípidos no anulares se representan en rojo. Resto de lípidos unidos a KcsA representados en amarillo y violeta [10].

1.3.1. Lípidos unidos a sitios “no anulares”

Los lípidos aniónicos como el PA (ácido fosfatídico) o PG (fosfatidilglicerol) se unen a sitios “no anulares” (figura 5) neutralizando las cargas positivas (R64 y R89), donde desempeñan un papel importante en el plegamiento y modulación de KcsA. Por otro lado, los lípidos aniónicos aumentan la carga negativa en la superficie de la membrana, lo que provoca un aumento de la concentración de moléculas cargadas positivamente (como el K^+) cerca de la membrana, contribuyendo a un aumento en la conductancia del canal [1], [11]. Además, la unión de estos lípidos de manera no covalente aumenta la estabilidad del tetrámero [12].

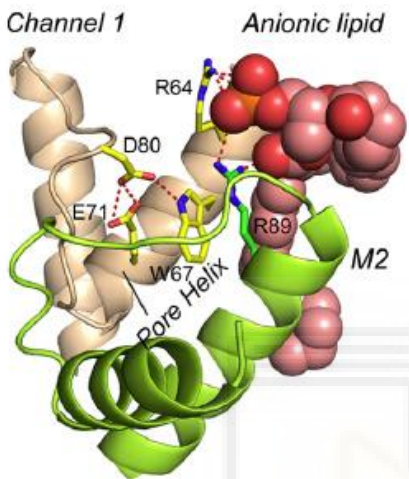


Figura 5: Representación de la interacción de un fosfolípido aniónico como POPA con R64 de un monómero y R89 de otro monómero en los sitios de unión no “no anulares” del canal KcsA [1].

En estudios anteriores han comprobado que la presencia del lípido negativo disminuye la velocidad de inactivación de KcsA. Este efecto es similar al que produce la mutación R64A. Esto se ha explicado argumentando que R64 se encarga de interactuar con W67 para estabilizar la triada de inactivación provocando inactivación del canal. En KcsA-WT los lípidos aniónicos interactúan de forma no covalente con R64, de manera que R64 ya no interactúa con los residuos de la triada de inactivación, y esta no se estabiliza, provocando que el canal no se inactive. En el caso del mutante R64A, como la arginina 64 se ha mutado a alanina, ésta no interactúa con la triada de inactivación, de manera que tampoco se estabiliza y por lo tanto no se da la inactivación del canal con o sin presencia de lípido aniónico. [1], [10], [13].

1.4. Estudio del efecto directo o indirecto de los fosfolípidos aniónicos

Para averiguar si el efecto de los fosfolípidos aniónicos es directo por la unión de los mismos al canal o indirecto a través de alteraciones de las características físicas de la membrana, la idea es comparar experimentos en los que el canal este contenido en una bicapa lipídica o solubilizado en detergente, añadiendo en ambos casos fosfolípidos aniónicos.

Para tener el canal en una bicapa, se reconstituye en liposomas. Los liposomas consisten en vesículas lipídicas que se forman cuando se hidratan películas delgadas de lípidos y las pilas de bicapa cristalinas se vuelven fluidas y se hinchan. Mediante la agitación las láminas de lípidos hidratados se desprenden y se cierran dando lugar de manera espontánea a vesículas multilaminares grandes (MLVs). A partir de estos MLVs se pueden generar vesículas unilaminares grandes (LUVs) mediante un aporte de energía mecánica que consiste en un proceso de extrusión, debido a que los LUVs tienen energías libres más altas [14] [15] [16]. Este proceso de extrusión para genera LUVs, consiste en hacer pasar de manera forzosa la suspensión de MLVs por poros de un filtro de policarbonato, cuyo tamaño determina el de las partículas LUVs que se forman [14].

Los mutantes KcsA W67 y KcsA W67 R64A se reconstruyeron en este trabajo en LUVs de asolectina (ASOL) y en ASOL + POPA (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidic acid, fosfolípido aniónico, procedente a Avanti Polar Lipids). La asolectina consiste en un extracto de soja compuesto por 45,7% de PC (fosfatidilcolina), 22,1% de PE (fosfatidiletanolamina), 18,4% de PI (fosfatidilinositol), 6,9% de PA (ácido fosfatídico) y un 6,9% es desconocido.

1.5. Espectroscopia de fluorescencia

La emisión de fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada en estudios de proteínas, aportando información sobre las interacciones proteína-proteína y proteína-ligando, permitiendo deducir datos tanto cuantitativos como cualitativos y estructurales [17].

El fenómeno de fluorescencia ocurre cuando una molécula es excitada a una determinada longitud de onda (energía de excitación), esta es capaz de absorber energía y pasar de su estado fundamental (S_0) a su estado excitado (S_1). Una vez en el estado excitado, se produce una relajación vibracional llegando al estado vibracional de menor energía, produciendo una pérdida de energía en forma de calor (este fenómeno es conocido como desplazamiento de Stokes) y se mantendrá en este estado durante el tiempo de vida media. Una vez transcurra este tiempo, regresa del estado excitado S_1 al estado fundamental S_0 , emitiendo fluorescencia (figura 6). Debido a la pérdida de energía en forma de calor, en las relajaciones vibracionales, la emisión de fluorescencia será con una longitud de onda mayor (λ emisión > λ excitación) [17], [18].

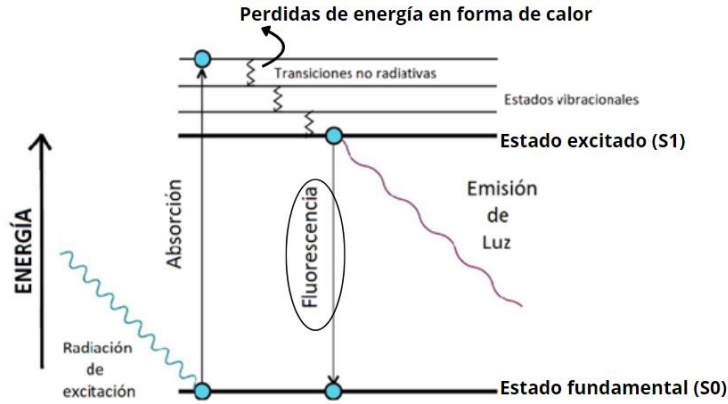


Figura 6: Diagrama de Jablonski, donde se ilustra el fenómeno de fluorescencia cuando se excita una molécula como el triptófano [19].

1.6. Fenómeno FRET

La transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) es un proceso foto-físico, que consiste en la transferencia de energía de excitación no radiativa desde un fluoróforo donante excitado a un aceptor en su estado fundamental (no excitado) a través de una interacción electrostática dipolo-dipolo de largo alcance. FRET es un proceso dependiente de la distancia y ocurre en distancias entre 10-100 Å (1 – 10 nm), proporcionando información tanto cuantitativa y cualitativa. Es importante destacar que en FRET no existe la emisión de fotones del donante al aceptor [20], [21].

En el siguiente diagrama de Jablonski (Figura 7), se puede observar que existe una vía de pérdida de energía adicional del donante, la cual consiste en el fenómeno FRET, en el que la energía se transfiere a un aceptor cercano de forma no radiativa con una velocidad constante [21], [22].

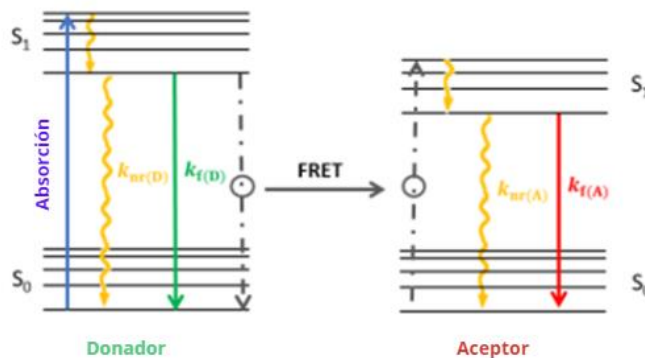


Figura 7: Diagrama de Jablonski, donde se representa el fenómeno de FRET.

La teoría de Förster muestra que la eficiencia de FRET varía como la inversa de la sexta potencia de la distancia entre las dos moléculas (ecuación 1). Esto hace que este parámetro sea extremadamente sensible a la distancia entre los fluoróforos y que se puedan determinar cambios muy pequeños en la misma [21], [23].

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

Ecuación 1: la eficiencia de FRET varía como la sexta potencia a la inversa de la distancia entre dos moléculas: r : distancia real donante-aceptor; R_0 : distancia Förster donde la eficiencia FRET es del 50%.

1.6.1. Transferencia de energía de resonancia de Förster entre fluoróforos idénticos (Homo- FRET)

Homo-FRET ocurre cuando el donante y el aceptor son moléculas idénticas que muestran un pequeño desplazamiento de Stokes (λ emisión $>$ λ excitación). Puesto que dentro de un grupo de fluoróforos idénticos, cada paso de transferencia de energía inducido por FRET conduce a un desplazamiento angular (despolarización), este se puede determinar midiendo la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. Debido a que las propiedades de fluorescencia del donante y del aceptor son las mismas (el tiempo de vida media), la intensidad de la fluorescencia de la muestra permanece inalterada aunque se dé el proceso.

De este modo, mientras que en el Hetero- FRET, como el donante y el aceptor son moléculas químicamente distintas, la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida de cada molécula será diferente, por lo que se podrán usar ambos parámetros para medir este proceso, en Homo-FRET se utilizaría la anisotropía de fluorescencia debido a que como se explicó anteriormente la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida no varían [22], [24].

1.7. Anisotropía de fluorescencia

Las mediciones de anisotropía se utilizan normalmente en las aplicaciones bioquímicas de la fluorescencia y proporcionan información sobre el tamaño, la forma o la rigidez de los entornos moleculares. Además, también se han utilizado para medir las asociaciones proteína-proteína y la fluidez de las membranas. Se basan en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos por luz polarizada. Los fluoróforos son capaces de absorber fotones cuando los vectores eléctricos están alineados paralelamente a su momento de transición, de manera que cuando se excita con luz polarizada (las ondas electromagnéticas oscilan en una única dirección), únicamente se excitarán las moléculas de fluoróforo cuyo dipolo de transición de

absorción sea paralelo al vector eléctrico de la excitación. Este fenómeno se conoce como fotoselección, el cual dará como resultado una excitación selectiva de fluoróforos parcialmente orientados y una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada (figura 8) [25].

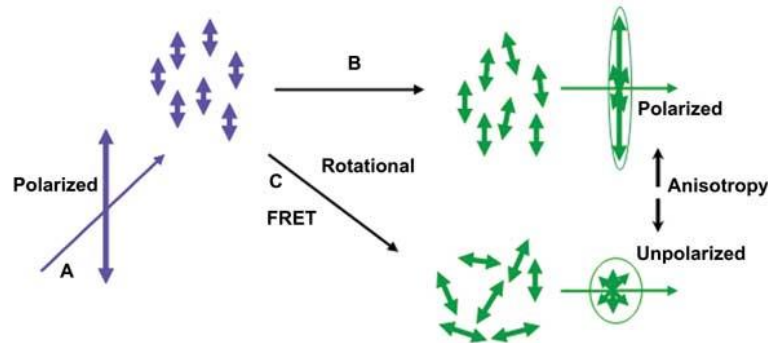


Figura 8: Medida de anisotropía de fluorescencia; A: se utiliza luz polarizada en dirección vertical para excitar selectivamente los fluoróforos con sus dipolos alineados verticalmente. B: Los fluoróforos unidos o en medios de alta viscosidad se difunden o giran más lentamente (mayor anisotropía). C: La difusión rotacional o la transferencia de energía por resonancia reduce la polarización (menor anisotropía) [26].

Existen diferentes fenómenos que pueden disminuir la anisotropía, el más común es la difusión rotacional, ya que los fluoróforos en una solución no viscosa suelen mostrar anisotropías cercanas a cero, debido a que experimentan movimientos rotacionales (figura 8C) durante la vida útil del estado excitado, de manera que la orientación de la emisión polarizada es aleatoria. Estos efectos de difusión rotacional pueden disminuir si el fluoróforo se une a una macromolécula, puesto que la capacidad de movimiento rotacional será menor. Además, otro fenómeno que puede disminuir la anisotropía es el fenómeno FRET, debido a que la molécula aceptora puede estar orientada de forma distinta a la donadora, por lo que la fluorescencia emitida por la aceptora puede tener una polarización distinta a la fluorescencia que emite la donadora, dando lugar a una disminución de la anisotropía de la fluorescencia (figura 8C). Por lo tanto, las mediciones de anisotropía de fluorescencia serán sensibles a cualquier factor que afecte a la velocidad de difusión rotacional [25].

1.8. Estudio de la Anisotropía de fluorescencia mediante el Homo- FRET en KcsA

Las mediciones de FRET se han utilizado ampliamente como regla molecular espectroscópica, ya que los cambios conformacionales dentro de las proteínas oligoméricas (como el canal KcsA) se asocian con cambios en las distancias en el rango en que se da este fenómeno (1-10 nm) [22], [24].

De hecho, se pueden aprovechar los propios residuos de triptófano de las proteínas para estos experimentos, y así poder determinar las distancias y orientaciones de estos aminoácidos, gracias a su fluorescencia intrínseca, que es debida al grupo indol de su estructura.

Para calcular las distancias mediante Homo-FRET en el caso del canal KcsA, es necesario que contenga un único residuo de triptófano por monómero, y que estén equidistantes, puesto que este sistema requiere una alta simetría. Cada monómero de KcsA consta de cinco residuos de triptófano, los cuales son W26, W67, W68, W87y W113 (figura 9), por lo que, en los dos mutantes sobre los que se realizarán los experimentos, todos los triptófanos a excepción de W67 fueron mutados a fenilalanina.

Los residuos W26 y W113 se localizan en los segmentos transmembrana intracelulares (interfase membrana-citosol), mientras que W87 se ubica en contacto con la bicapa lipídica. Estudios anteriores han demostrado que el canal triple mutante W26,87,113F presenta propiedades de conducción iónicas y características espectroscópicas muy similares a la proteína nativa. En cuanto a W67 y W68 están ubicados en la hélice del poro, adyacentes al SF. De hecho, también se ha comprobado que la señal de fluorescencia de los residuos W67 y W68 es capaz de detectar el estado conformacional de SF (conductor/ no conductor) según la concentración de K^+ . Este hecho fue por el que se seleccionó al residuo W67 para medir Homo-FRET.

Además, W67 forma parte de la triada de inactivación contribuyendo a la regulación del diámetro del poro y a la conformación del SF (la cual es una región sensible a K^+ , especialmente los sitios S2 y S3, que están fuertemente involucrados en la inactivación del canal). Finalmente, este residuo (W67) está altamente conservado tanto en los canales K^+ procariontas como eucariotas [6].

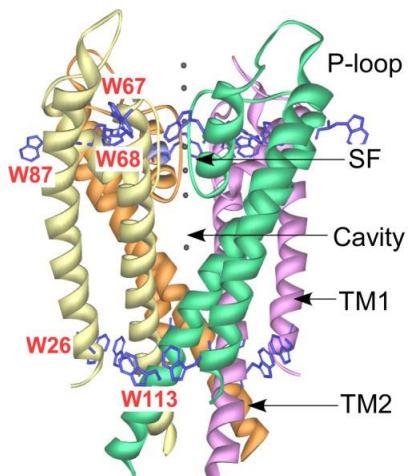


Figura 9: estructura del canal KcsA-WT donde se representan los cinco triptófanos de cada monómero del canal [6].

2. Antecedentes y objetivos

Como se ha indicado anteriormente, estudios anteriores indican que la actividad del canal KcsA está modulada por la presencia de fosfolípidos aniónicos, ralentizando el proceso de inactivación y dando lugar a mayores corrientes de K^+ . En este trabajo, lo que se pretende es estudiar los cambios estructurales que puedan ocurrir en el filtro de selectividad del canal en presencia de dichos fosfolípidos que den lugar a las mencionadas alteraciones funcionales. Para ello se utilizarán los mutantes KcsA W67 KcsA W67 R64A.

En el primero de ellos se han eliminado todos los residuos de triptófano de la proteína, dejando sólo el W67, adyacente al SF y por lo tanto muy sensible a su conformación. Es importante resaltar en este punto que este dominio es el responsable último de la conducción e inactivación del canal. En el caso de la mutación R64A, este residuo es responsable de la unión de los fosfolípidos aniónicos al sitio no anular de la proteína, a través del cual se ha postulado que modulan su estructura y función. Con esta mutación se pretende evaluar si el efecto de los lípidos aniónicos tiene lugar a través de su unión al sitio no anular.

Para evaluar los cambios conformacionales en el SF de KcsA, se medirá la anisotropía de fluorescencia, que se correlaciona con la distancia entre W67 de los 4 monómeros mediante procesos de Homo-FRET. Esto se hará a diferentes concentraciones de K^+ que nos sirve para pasar de la conformación no conductora a la conductora del SF, y a pH 7 y 4, el primero donde el canal está cerrado, y el segundo donde está abierto promoviendo la inactivación del canal [6].

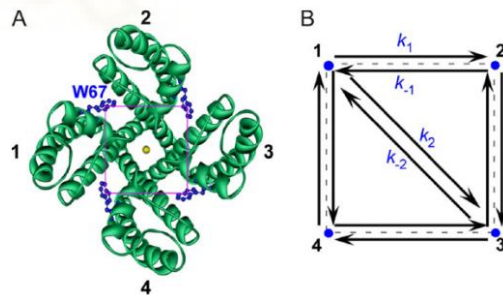


Figura 10 A: vista superior del canal de KcsA, cada monómero esta numerada del 1 al 4 aleatoriamente y donde los W67 están representados en azul. B: diagrama de Homo-FRET donde se representa el homotetrámero simétrico de KcsA, los W67 se representan en las esquinas generando una geometría cuadrada (W67 son equidistantes) con una distancia lateral R (monómeros contiguos), y una distancia diagonal (monómeros opuestos) $\sqrt{2}R$ [6].

La distancia (R) de W67-W67 depende del estado conformacional del SF del canal. Cuando aumenta la concentración de K^+ , se une a los sitios S2 y S3, además de los sitios S1 y S2 de SF (figura 11), haciendo que la compuerta externa se encuentre en un estado conductor debido a un cambio conformacional en el canal que hace que las distancias entre los W67 de cada monómero sean menores. Por otro lado, a bajas concentraciones de K^+ la puerta externa se encontraría en un estado no conductor haciendo que la distancia entre los W67 de cada monómero sea mayor.

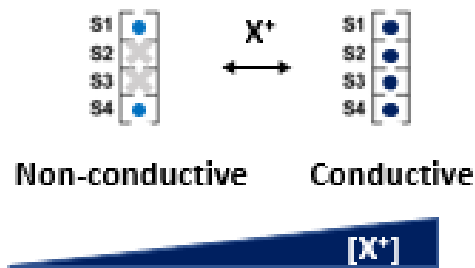


Figura 11: comparación de la estructura del filtro de selectividad de KcsA a medida que aumenta $[K^+]$. A baja concentración de ion los sitios S2 y S3 están vacíos y el filtro colapsado y no conductor. Al aumentar la concentración de ion pasa a estar ocupados y conductor.

Cuando se excitan las moléculas con luz polarizada, si la distancia entre los triptófanos W67 es pequeña se produce una alta FRET, provocando que la energía emitida este despolarizada y por lo tanto la anisotropía de fluorescencia es pequeña (figura 12A). Por el contrario, si los triptófanos W67 están más alejados, se produce una baja FRET, emitiendo luz polarizada y por ende la anisotropía de fluorescencia es más alta (figura 12A) [22].

De manera que podremos determinar la conformación de la puerta externa del canal a partir de las medidas de anisotropía de fluorescencia, puesto que podemos correlacionar las medidas con las distancias entre los W67 para deducir la conformación del canal. Es decir, si las medidas de anisotropía son elevadas, no está habiendo fenómenos de Homo-FRET lo que nos indica que los W67 se encuentran más alejados, deduciendo que el SF se encuentra en un estado no conductor. Por el contrario, si las medidas de anisotropía son pequeñas, implica que hay fenómenos Homo-FRET, lo que se relaciona con una distancia relativamente pequeña entre los W67, deduciendo que SF se encontraría en un estado conductor.

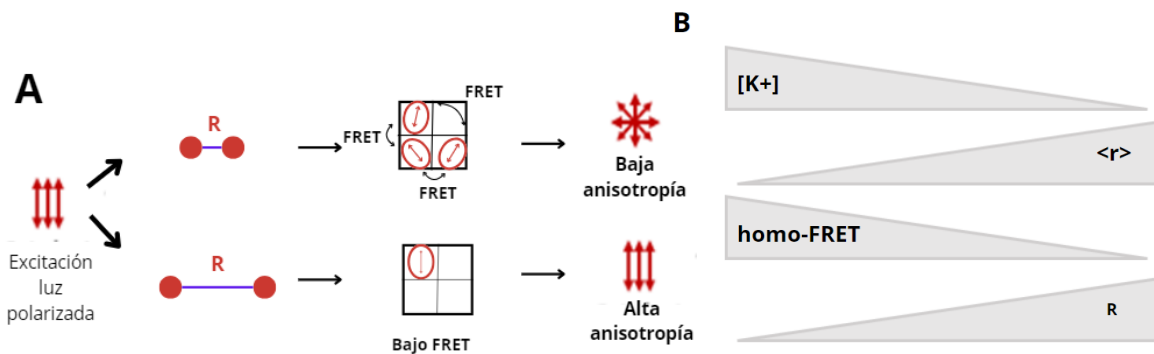


Figura 12 A: Representación gráfica de cómo a distancias pequeñas ocurre Homo-FRET dando lugar a movimientos rotacionales de las moléculas lo que conlleva una baja anisotropía. Por el contrario, si la distancia entre las moléculas es relativamente mayor no ocurren fenómenos de Homo-FRET. B: correlación entre $[K^+]$, $\langle r \rangle$ (anisotropía de fluorescencia en estado estacionario), Homo-FRET y la distancia entre las moléculas.

Por todo lo expuesto, los objetivos específicos del trabajo consistirán en determinar la conformación del SF del canal en diferentes situaciones:

- En el estado de reposo cerrado (pH 7) y en el estado abierto (pH 4) para los mutantes KcsA W67 y KcsA W67 R64A.
- Estudiar esos mismos efectos en esos mutantes, pero en presencia de los fosfolípidos aniónicos tanto en micelas mixtas de detergente, como en bicapas lipídicas.

3. Materiales y métodos

3.1. Plásmidos

Se utilizaron dos plásmidos distintos, por un lado, el plásmido pQE-30 que codifica para la proteína KcsA W67 y tiene mutaciones en W26, W68, W87 y W113, es decir, estos 4 triptófanos fueron mutados a fenilalanina. Este plásmido tiene resistencia a ampicilina para favorecer la selección durante la transformación. Por otro lado, el plásmido pQE-30 que codifica para la proteína KcsA R64A W67, contiene las mutaciones W26F, W68F, W87F y W113F, y además tiene la arginina 64 mutada a alanina. Este plásmido también tiene resistencia a la ampicilina. Además, hay que destacar que ambos plásmidos llevan una cola de histidina que será necesaria para la posterior purificación de la proteína.

3.2. Purificación KcsA

3.2.1. Transformación

Se realizaron dos reacciones de transformación, una para cada plásmido. En ambas transformaciones se utilizaron las células *E. coli* M15 competentes, las cuales son resistentes a kanamicina. A continuación, se explicará el proceso de purificación de Kcsa W67 R64A y siendo el mismo para el otro plásmido.

En un ependorff se añadieron 100 μ L de células M15, 1,7 μ L de β - mercaptoetanol (1,67% v/v) y 1 μ L de ADN (plásmido) en una concentración de 100 ng/ μ L. Se incubó en hielo durante 30 minutos y después se realizó el "shock" térmico (45'' a 42°C seguido de 2' en hielo). A continuación se añadió 1mL de medio de cultivo LB y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación (200 rpm). Pasado el tiempo de incubación se sembraron 50 μ L en una placa LB-agar suplementada con ampicilina y kanamicina y se incubó durante toda la noche a 37°C en estufa (figura 13B).

Como control negativo se sembraron 50 μ L de células M15 competentes en una placa LB-agar suplementada con ampicilina y kanamicina (figura 13A).

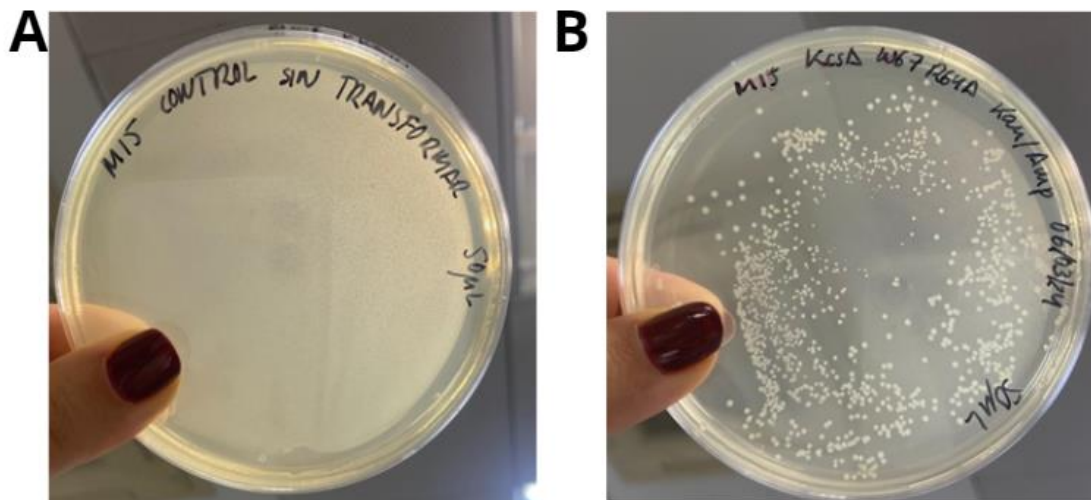


Figura 13: placas LB Agar suplementadas con kanamicina y ampicilina. A: placa control negativo que contiene las células M15 competentes sin el plásmido. Debido a que no tienen resistencia a la ampicilina no pueden crecer; B: células M15 transformadas con el plásmido que codifica para W67 R64A, las cuales son resistentes tanto a ampicilina como a kanamicina y por tanto crecen.

3.2.2. Preinóculo

Para preparar el preinóculo, se seleccionó una única colonia de la placa sembrada el día anterior (figura 13B) y se inoculó en un matraz en condiciones de esterilidad con 300 mL de medio LB suplementado con 300 μ L de ampicilina 100 mg/mL, 300 μ L kanamicina 25 mg/mL y 300 μ L glucosa 25 mg/mL y se tuvo durante toda la noche en agitación a 200 rpm a 30°C.

3.2.3. Inóculo

Se prepararon y se autoclavaron seis matraces de 2L con 36 g de medio 2xYT (16 g de Tryptona, 10 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl) con un litro de agua. Una vez autoclavado, se añadió en condiciones estériles a cada matraz 0,5 mL de ampicilina 100 mg/ml, 1 mL de kanamicina 25 mg/ml y 1 mL de glucosa a 25 mg/mL. Posteriormente se añadieron 50 mL del preinóculo (figura 14) y se crecieron en el agitador a 200 rpm a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de $\sim 0,6$ (600 nm), siendo la duración aproximadamente de entre 2 y 3 horas. Una vez alcanzada la densidad óptica, se añaden 600 μ L de 1 M IPTG en cada matraz para inducir la expresión de KcsA e incubar durante 2 horas a 200 rpm y con una temperatura de 30°C.

Pasado este tiempo, se centrifugan los cultivos en una centrífuga refrigerada con el rotor JA-10 durante 15 minutos a 6000 rpm y con una temperatura de 4°C. Por último, se decanta el sobrenadante, se pesan los pellets y se congelan durante al menos una hora a -20°C.



Figura 14: Matracas donde se llevó a cabo el inóculo.

3.3.- Purificación de proteínas

3.3.1.- Resuspensión

El siguiente paso consiste en descongelar los pellets y resuspenderlos en 50 mL de tampón de resuspensión (20 mM HEPES, 0.45 M sacarosa y 8 mM EDTA a pH 7,5) por litro de cultivo, por lo que tenemos que preparar 300 mL de tampón de resuspensión (6L de cultivo). Además, a este tampón se añade un coctel de inhibidores de proteasas (1 pastilla/200ml) y se deja en agitación con un imán. Una vez preparado el tampón se resuspendieron los pellets y se llevó al sonicador. En el sonicador Hielscher UP400St (figura 15), se sonicaron los pellets, en un baño de hielo, ya que el sonicador desprende calor. Se realizan 6 ciclos a una potencia del 40 % durante 45 segundos y se deja reposando en hielo un minuto.

Por último, el volumen sonicado se traspasa a los tubos de ultracentrifuga y se centrifuga 45 minutos a 35000 rpm con el rotor T-45.

Figura 15: Sonicador Hielscher UP400St, utilizado para romper las células en el proceso de purificación de la proteína.



3.3.2. Solubilización

Tras acabar la centrifuga, se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet en el tampón de solubilización. En este proceso se va a extraer la proteína de la membrana celular, pasando a estar solubilizada en detergente, en este caso DDM (Dodecil β -D-maltósido, se trata de un detergente no iónico que permite aislar y estabilizar las proteínas de membrana hidrofóbicas [27]). Es necesario preparar 20 mL de tampón de solubilización/L de cultivo, por lo que es se preparan 120 ml de tampón de solubilización (20 mM HEPES, 200 mM KCl, 50 mM Imidazol, 10 mM DDM).

Una vez solubilizado el pellet, se traspasa a tubos falcon estériles y se termina la resuspensión con el politrón, donde se hacen 4 ciclos que consisten en 45 segundos en el politrón y un minuto de reposo en hielo. Seguidamente se ultracentrífuga durante 45 minutos a 4°C, a una velocidad de 35000 rpm, con el rotor T-45 para eliminar el material no solubilizado.

3.3.3. Cromatografía de afinidad

Se utilizaron 900 μ L de la resina Ni²⁺-Sephacrose Fast Flow (GE Healthcare) (150 μ L de resina/L de cultivo), se llevaron a cabo dos lavados de la resina, uno de ellos con 20 mL de agua, con el que se deja decantar la resina unos minutos y el último con 20 mL de tampón de solubilización para estabilizar la resina.

Puesto que la proteína KcsA tiene colas de histidina en su extremos amino terminal, los grupos Ni²⁺ quelantes de la resina permiten formar un complejo con los grupos imidazol de la proteína (Ni²⁺ / His-tag) y permitir que la proteína quede retenida en resina de la columna (figura16) [28].

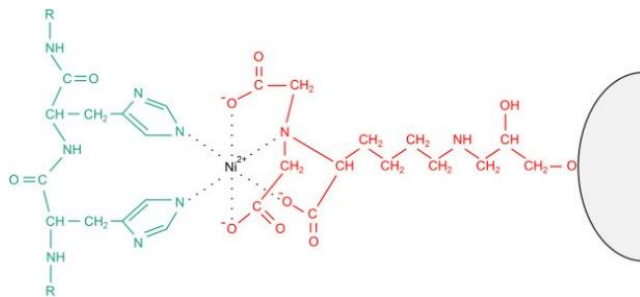


Figura 16: La proteína con una etiqueta de polihistidina (en verde) está unida a un ion níquel (Ni²⁺). El ion níquel está inmovilizado en perlas de Sepharose (en rojo) [29].

Finalizada la centrifugación del punto anterior, se mezcla el sobrenadante con el material solubilizado con la resina Ni²⁺-Sephacrose lavada y se incuba la mezcla durante al menos dos horas a 4°C en la noria.

Pasado el tiempo de incubación se traspasa la mezcla a la columna cromatográfica (columna de vidrio de BioRad) y se deja decantar por gravedad. Cuando la resina se ha depositado de manera uniforme (es importante que la resina no se seque) se lleva a cabo un lavado de la columna con el tampón de lavado (~600mL, que contiene 20 mM de HEPES, 200 mM de NaCl, 5 mM de DDM, 50 mM de imidazol a pH 7,5).

Para saber cuándo la columna está limpia, se mide la absorbancia a 280 nm, usando como blanco el tampón de lavado. Cuando el líquido que eluya tenga una absorbancia cercana a 0 nos indicará que la columna está limpia y se prosigue a eluir la columna con el tampón de elución (~20 mL) el cual contiene 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM DDM, 500 mM imidazol a pH 7, esta cantidad de imidazol permite desplazar a las histidinas unidas a Ni²⁺ y así la elución de la proteína para recogerla en al menos 10 alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf.

3.3.4.- Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida 12% con SDS 10% (condiciones desnaturizantes) para verificar las fracciones que contienen la proteína, así como su pureza. Para preparar las muestras que se van a cargar, se disponen 10 eppendorf y se les añade 3 µL de sample buffer 5x más 12 µL de la fracción de proteína eluida. Para poder observar las bandas, una vez acabada la electroforesis el gel se tiñe durante toda la noche con la solución de tinción la cual contiene metanol, ácido acético y agua en proporciones 5:1:5 y Coomassie 0,05%. Después el gel se destiñó en buffer, que contiene metanol, ácido acético y agua en proporciones 5:1:5 y por último fue escaneado y analizado con ImageQuant TL (figura 17).

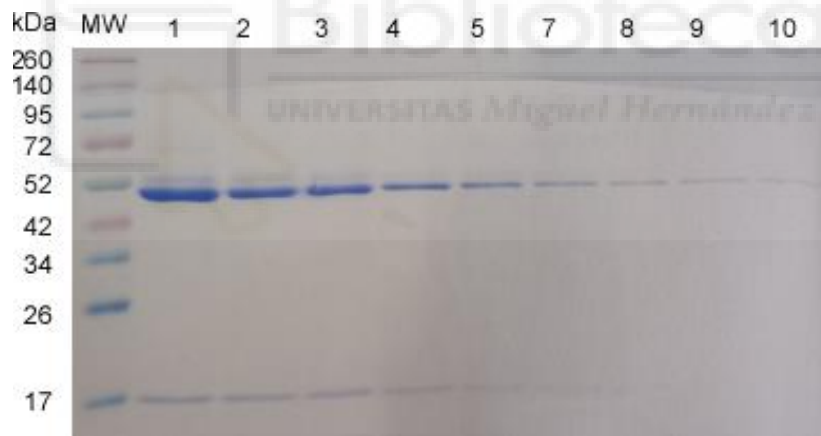


Figura 17: electroforesis en gel de poliacrilamida 12% con SDS 10% de la purificación KcsA W67 R64A. La calle MW corresponde al marcador de peso molecular. El resto de las calles corresponden con la proteína eluida en las 10 alícuotas. En el gel se observan bandas de 52 KDa que corresponden con el tetrámero de KcsA y bandas de 17 KDa que corresponden con el monómero. En las alícuotas 1, 2 y 3 la proteína estaba más concentrada que en el resto, puesto que la intensidad de la banda es mayor.

3.3.5.- Diálisis

Las fracciones obtenidas son dializadas para eliminar el imidazol, ya que la proteína ha sido eluida en un tampón que contiene 500 mM de imidazol. Por un lado se juntaron las alícuotas donde la proteína estaba

más concentrada, calles 1, 2 y 3 (figura 17) en una misma bolsa de diálisis. Por otro lado, las alícuotas donde la proteína estaba más diluida (el resto) se agruparon en otra bolsa de diálisis distinta.

Las bolsas con la proteína en su interior se dializaron en tampón 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM DDM a un pH 7, en nevera con una agitación débil. Gracias al gradiente generado dentro y fuera de las membranas de las bolsas de diálisis, el grupo imidazol puede atravesar los poros de las membranas, mientras que la proteína queda retenida en el interior, debido a que el tamaño de poro de la bolsa es menor que el tamaño de la proteína (Figura 18).

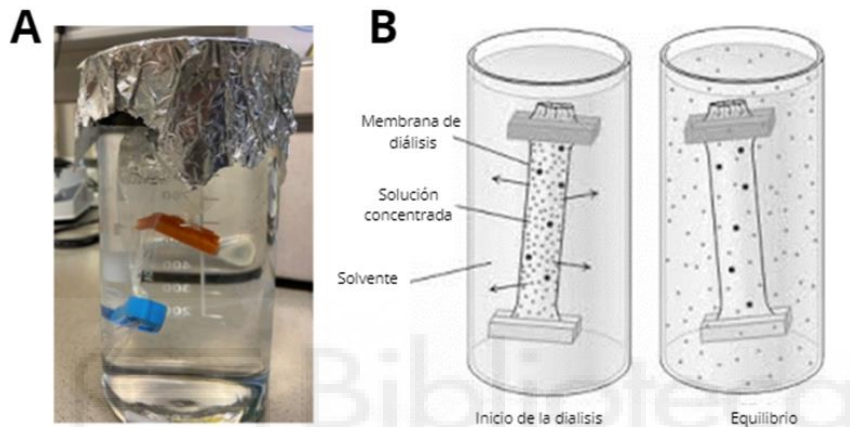


Figura 18: proceso de diálisis, 18A es una fotografía del proceso de diálisis, 18B consiste en un esquema explicativo del proceso.

3.3.6. Cuantificación de la proteína

Una vez dializada la proteína, se procedió a cuantificar su concentración. Para ello se utilizó la espectroscopía UV-Vis, donde se hizo un barrido desde una longitud de onda de 230 nm hasta 340 nm, ya que las proteínas tienen su máximo de absorción a 280 nm, puesto que los triptófanos absorben a esta longitud de onda.

La ley de Lambert-Beer nos relaciona la absorbancia con la concentración de proteína (ecuación 2):

$$A = \epsilon \cdot I \cdot C$$

Ecuación 2: Ley de Lambert-Beer, donde A es la absorbancia medida a 280 nm, ϵ es el coeficiente de extinción molar, siendo en ambos mutantes de $12950 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, I es la medida del paso óptico de la cubeta (1 cm) y C es la concentración molar de la proteína.

El rendimiento que se obtuvo de la purificación fue para el mutante KcsAW67 fue de 0,4 mg/L de cultivo y para KcsA W67 R64A 0,103 mg/L de cultivo.

3.4.- Reconstitución de KcsA en liposomas de ASOL y ASOL POPA

Los mutantes KcsA W67 y KcsA W67 R64A se reconstruyeron en LUVs de asolectina (ASOL) de Avanti y en una mezcla ASOL: POPA (relación 75:25 en peso) siendo POPA un lípido aniónico (1,2-palmitoil oleil ácido fosfatídico). Para preparar MLVs de Asolectina a una concentración final de 10 mg/mL, se pesaron 100 mg de asolectina y se disolvió en 10 mL de cloroformo: metanol (relación 2:1 v/v). Tras disolverlo, lo secamos mediante el uso del rotavapor durante 30 minutos. Una vez seca, la resuspendimos con 10 mL de una disolución 10 mM HEPES y 10 mM NaCl a pH 7, y finalmente la dejamos en atmósfera de nitrógeno para que la asolectina no se oxide, la alicuotamos en tubos de criocongelación y guardamos en el nitrógeno líquido. Para preparar los MLVs de ASOL: POPA se hizo el mismo procedimiento, únicamente diferenciándose que al principio se pesan 75 mg de asolectina y se le añaden 5 mL de POPA que está a una concentración de 5 mg/mL, obteniéndose así una relación 75:25 en peso. Para obtener las vesículas unilaminares grandes (LUVs), como se ha mencionado en la introducción, se utilizó el método de la extrusión mediante *Liposofast*.

Tras la extrusión se observa que la disolución se ha clarificado, indicativo de que se han formado LUVs. A esta disolución se le añadió detergente DDM (relación molar 0.8 detergente/lípido) para así desestabilizar a los LUVs, previo a la adición de la proteína y así facilitar su incorporación a los mismos.

La proteína purificada solubilizada en DDM se añadió gota a gota a los LUVs de ASOL y ASOL POPA (75:25). Para eliminar después el detergente DDM se añadieron 2-4 gramos de bio-beads, bolitas de poliestireno que absorben el detergente, a 4°C en la noria durante toda la noche. Sin embargo, estas requieren un pretratamiento para ser utilizadas, que consiste en dos lavados con metanol, dos con etanol, dos con agua y otros dos con 20 mM HEPES y 100 mM NaCl. Tras cada lavado, se dejaron agitando durante 5 minutos en noria.

Finalmente para retirar las bio-beads, una vez eliminado el detergente, se decantaron por gravedad y se recogió el sobrenadante con la proteína reconstituida en liposomas.

3.5.- KcsA en micelas mixtas detergente-lípido (DLM)

En las DLM (DDM + POPA) la relación lípido-proteína es de 20:1. Para prepararlas, POPA se encuentra en cloroformo: metanol y se seca una alícuota mediante corriente de N₂, para luego llevarlo a la bomba de vacío durante 2 horas para eliminar cualquier resto de disolvente. Una vez pasado este tiempo se adiciona la proteína solubilizada en un tampón 20 mM HEPES, 5mM DDM y 20 mM de NaCl (tampón pH 7) a 0,05mM de POPA seco y se resuspende.

3.6.- Anisotropía de fluorescencia

Para medir los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas, se debe tener en cuenta que los aminoácidos capaces de absorber energía y emitir fluorescencia son los aminoácidos aromáticos. La fenilalanina absorbe a una longitud de onda de 250-260 nm y su contribución al espectro en la zona del ultravioleta cercano es pequeño. La tirosina presenta su máximo de absorción a una longitud de onda de 275nm, mientras que el triptófano tiene su máximo de excitación a 295- 300 nm [30].

Las mediciones de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en un espectrofluorómetro SLM-8000C (SLM-Aminco, Urbana, IL, EE. UU). Se utilizan cubetas de cuarzo de 0,5 cm de paso óptico. Cuando se lleva a cabo la caracterización del W67, la longitud de onda de anisotropía fluorescencia se estableció en 300 nm, para recoger la fluorescencia del mismo sin contribuciones de otros residuos de Phe o Tyr que contiene la proteína. [24].

Para obtener las mediciones de anisotropía en estado estacionario se utilizaron monocromadores de excitación con rendijas de 4 nm y en los monocromadores de emisión con rendijas de 8 nm respectivamente. Además, se restaron las intensidades de fondo producidas por el DDM o por los LUVs [24].

La anisotropía de fluorescencia en estado estacionario $\langle r \rangle$ de ambos mutantes (KcsA W67 y KcsA W67 R64A) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}}$$

Ecuación 3: medidas de anisotropía de fluorescencia donde I_{VV} e I_{VH} son las intensidades de fluorescencia de la emisión polarizada vertical y horizontal respectivamente, cuando la muestra es excitada con luz polarizada vertical, mientras que el factor G , es el factor de correlación del instrumento ($G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$) [24].

Para calcular la constante de afinidad (K_D) del K^+ al SF a partir de los cambios en los valores de anisotropía en estado estacionario se utilizó la siguiente ecuación:

$$\langle r \rangle = \langle r \rangle_{NC} + (Q \langle r \rangle_{C/I} - \langle r \rangle_{NC}) \frac{[X^+]^h}{K_D^h + [X^+]^h}$$

Ecuación 4: constante de afinidad, donde $\langle r \rangle_{NC}$ es la medida de anisotropía en estado estacionario no conductor (estado inicial); $\langle r \rangle_{C/I}$ es la medida de anisotropía en el estado conductor o inactivo (estado final); $[X^+]$ es la concentración del catión; K_D es la constante de disociación de un catión; h es el coeficiente

de Hill. El parámetro Q representa el cambio relativo entre el rendimiento cuántico de las formas no conductoras y conductoras (o inactivas) [4].



4. Resultados

Como se ha indicado en la introducción, la presencia de fosfolípidos aniónicos modula la actividad del canal KcsA. Para estudiar si lo hacen modificando la conformación del SF del canal, se llevan a cabo medidas de Homo-FRET entre los residuos W67 adyacente al SF, muy sensibles a su conformación. Se utilizarán dos mutantes de KcsA (KcsA W67 y KcsA W67 R64A) reconstituidos en LUVs de Asolectina y una mezcla de Asolectina y un fosfolípido aniónico, POPA. También se estudiará el canal solubilizado en DDM y en micelas mixtas constituidas por DDM y POPA para definir si el efecto de los lípidos aniónicos es directo, ya que en este modelo no se forma una bicapa lipídica, o si se necesita de una bicapa (LUVs) para que ocurra.

Se conoce por estudios anteriores que cuando filtro de selectividad del canal está en un estado inactivado, presenta una baja afinidad por el K^+ , mientras que cuando está en conformación conductora la afinidad es más alta. Para cuantificar esta afinidad, mediremos la anisotropía de fluorescencia de los residuos W67 del canal a concentraciones crecientes de K^+ . Cuando el filtro está vacío la distancia entre los W67 será mayor por lo que no ocurrirá Homo-FRET y las medidas de anisotropía que obtengamos serán altas, mientras que a altas concentraciones del ion, el SF se llenará haciendo que las distancias entre los W67 sean menores, dando lugar a homo-FRET entre los W67 del SF, por lo que las medidas de anisotropía que obtengamos serán menores (figura 12).

4.1. Conformación del mutante KcsA W67

Los estudios para medir la afinidad por el K^+ se realizaron a pH 7, donde el canal está cerrado y el filtro tiende a estar en conformación conductora y por tanto de alta afinidad por el ion, y a pH 4 con el canal abierto y donde el filtro tiene tendencia a pasar al estado inactivado con baja afinidad por el ion.

En la figura 19 vemos que en las cuatro condiciones en las que se encuentra el canal, solubilizado en DDM o en micela mixta DDM/POPA, o bien reconstituido en Asolectina o Asolectina/POPA, tanto a pH 7 como a 4, se obtienen curvas que comienzan con alta anisotropía para luego ir bajando, definiendo una curva sigmoide. Esto es debido, como se comentó con anterioridad, al llenado del SF del canal con el ion, provocando un acercamiento entre las subunidades que da lugar a mayor homo-FRET y por tanto menor anisotropía. A pH 7 la posición de la sigmoide en relación con la concentración de K^+ es similar en todos los casos, indicativo de una afinidad similar por el ion (figura 19A). Sin embargo a pH 4, con el canal abierto (figura 19B), se pueden observar diferencias importantes en el comportamiento del SF en las diferentes condiciones en las que se encuentra el canal, ya que se observan curvas sigmoides desplazadas cuando hay presencia de fosfolípido aniónico POPA. En su ausencia se ve una baja afinidad por K^+ típico de una

conformación del filtro inactivado. Sin embargo, con la adición de POPA ya sea a la micela de DDM o a la bicapa de Asolectina, se observa un desplazamiento de las curvas hacia la izquierda, lo que indica una mayor afinidad por K^+ en presencia de lípido negativo en ambos casos, indicativo de un cambio conformacional del filtro hacia el estado conductor.

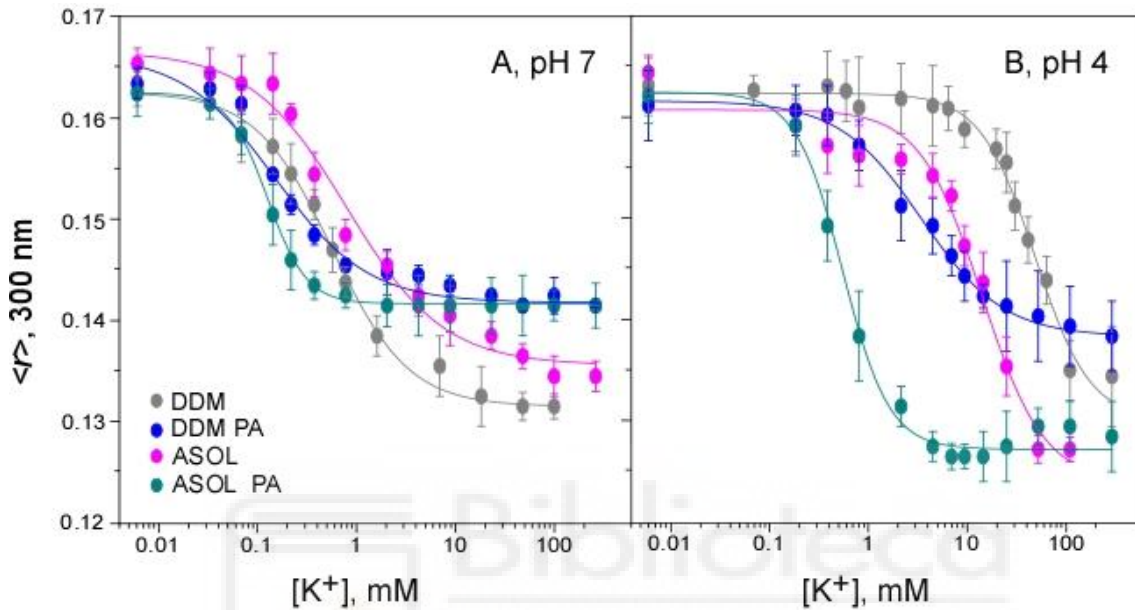


Figura 19 A y B: Mediciones de anisotropía de fluorescencia $\langle r \rangle$ frente a $[K^+]$ crecientes, cuando KcsA W67 se encuentra solubilizado en medio DDM, DDM PA y reconstituido en ASOL y ASOL PA a pH 7 y pH 4 respectivamente. Cada punto representado es el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Las líneas continuas son el ajuste de la ecuación 4 a los datos experimentales.

En la tabla siguiente se muestran los valores de K_D calculados a partir de estas curvas. Como se ha mencionado anteriormente, estos valores nos permiten estudiar la afinidad que tiene el canal por el K^+ en cada una de las distintas condiciones. Una K_D grande, nos estaría indicando que la afinidad por el K^+ es pequeña, mientras que una K_D pequeña nos estaría indicando que la afinidad por el K^+ es elevada.

W67

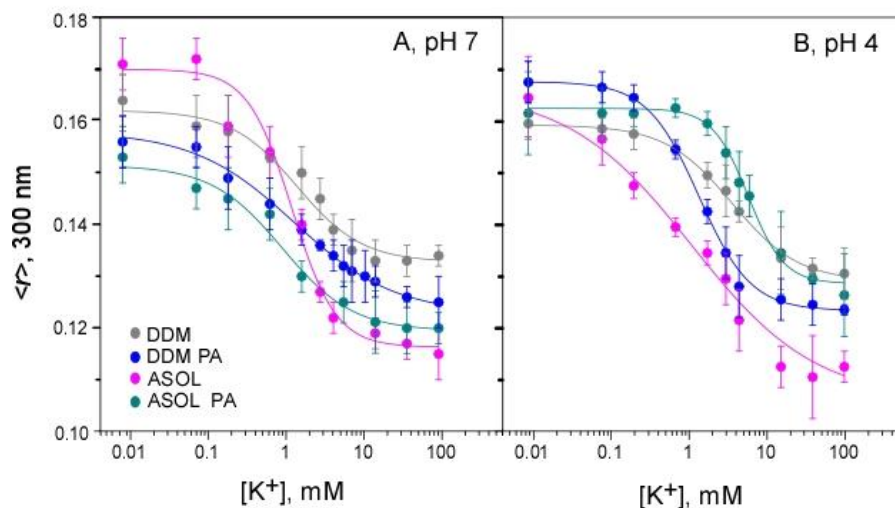
Condición	K _D (mM)	
	pH 7	pH 4
DDM	0.7 ± 0.1	47 ± 6
DDM PA	0.20 ± 0.05	3.9 ± 0.4
ASOL	1.0 ± 0.2	15 ± 3
ASOL PA	0.20 ± 0.05	0.7 ± 0.1

Tabla 1: Valores estimados de K_D (constante de disociación) calculados a partir de la ecuación 4 en base a los cambios de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ($\langle r \rangle$) del canal KcsA W67. Además se indica la desviación estándar, con un n de 3.

A pH 7, las K_D son bajas puesto que el SF tiene una alta afinidad por el K⁺ indicativo de un estado conductor, siendo similares para las diferentes condiciones. Sin embargo, a pH 4 los valores de K_D aumentaron significativamente en las condiciones donde no había POPA (disminución de la afinidad), indicativo de un SF en estado inactivado, que la presencia de POPA revierte alcanzando valores similares al del estado conductor.

4.2. Conformación del mutante KcsA W67 R64A

Se hicieron los mismos experimentos que en el apartado anterior con KcsA W67 R64A, mutante que no se inactiva funcionalmente. Al igual que en el caso anterior, en ambos casos se obtienen curvas sigmoides en las cuatro condiciones en las que se encuentra el canal (figuras 20A y 20B). Sin embargo en este caso no se observa un desplazamiento grande para ninguna curva, indicativo de que la afinidad no cambia demasiado, y que por tanto, el SF del canal no entra en un estado claramente inactivado.



Figuras 20 A y B: Mediciones de anisotropía de fluorescencia $\langle r \rangle$ frente a $[K^+]$ crecientes, cuando KcsA W67 R64A se encuentra solubilizado en medio DDM, DDM PA y reconstituida en ASOL y ASOL PA a pH 7 pH 4 respectivamente. Cada dato representado es el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Las líneas continuas son el ajuste de la ecuación 4 a los datos experimentales.

En este caso, también se determinaron las K_D y se obtuvieron valores similares en todas las condiciones independientemente de la presencia de fosfolípido aniónico (Tabla 2).

Condición	W67R64A	
	K_D (mM) pH 7	K_D (mM) pH 4
DDM	4.5 ± 0.7	8.6 ± 0.3
DDM PA	4.3 ± 0.3	4.1 ± 0.1
ASOL	4.0 ± 0.4	3 ± 1
ASOL PA	3.3 ± 0.6	12.2 ± 0.6

Tabla 2: Valores estimados de K_D calculados a partir de la ecuación 4 en base a los cambios de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ($\langle r \rangle$) del canal KcsA W67 R64A. Además se indica la desviación estándar, con un n de 3.

5. Discusión

En estudios anteriores se ha determinado la distancia entre los W67 de KcsA a partir de las medidas de anisotropía de fluorescencia resuelta en tiempo, y se ha encontrado una relación lineal con la anisotropía en estado estacionario, que es la que medimos en este trabajo [31].

De este modo, en este trabajo se han estimado las distancias entre W67-W67, a partir de dicha correlación. Tal y como se mencionó en la introducción, una alta anisotropía nos indica que la distancia entre W67-W67 del SF es relativamente grande debido a la inexistencia de fenómenos Homo-FRET, lo que se puede correlacionar con el estado conformacional del SF no conductor. Por el contrario, si la distancia entre los W67 es relativamente pequeña, ocurre Homo-FRET, provocando una disminución de la anisotropía de fluorescencia, lo que se correlaciona con estado conformacional del SF conductor (figura 11).

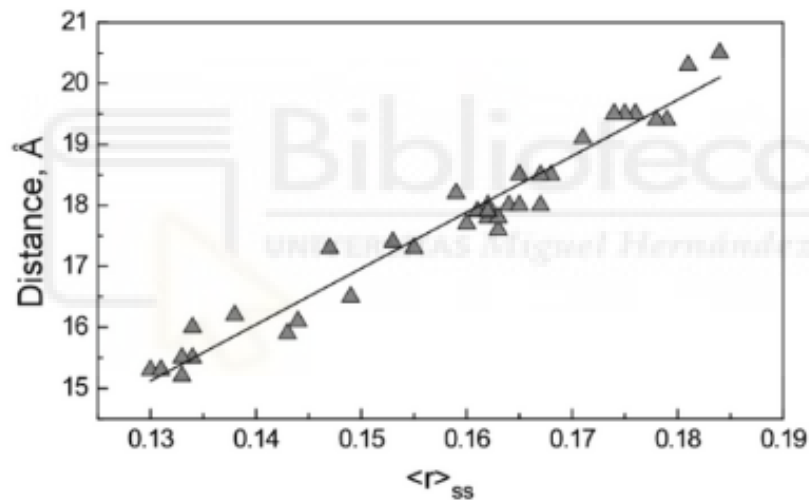


Figura 21: correlación de las distancias en Armstrong entre W67-W67 del SF con las medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario $\langle r \rangle$ [31].

Atendiendo a la figura 19A, en el canal KcsA W67 a pH 7, como se ha indicado anteriormente, se observan curvas sigmoides similares en las cuatro condiciones en las que se encuentra el mutante. Cuando hay concentración pequeña de K^+ se observa una alta anisotropía fluorescencia, lo que implica que no está habiendo fenómenos de Homo-FRET debido a que la distancia W67-W67 es mayor, de manera que se deduce que el K^+ no se une a los sitios S2 y S3 del filtro de selectividad, encontrándose el SF en un estado

no conductor. Sin embargo, a concentraciones más elevadas de K^+ la anisotropía de fluorescencia disminuye, lo que nos indica que estos sitios del SF están siendo ocupados, pasando a estar el SF en un estado conductor. Utilizando los datos de la figura 21 podemos calcular la distancia entre los W67 en función de nuestras medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario. En las cuatro condiciones, cuando $\langle r \rangle = 0,165$ la distancia entre W67-W67 es aproximadamente 18 \AA y cuando $\langle r \rangle = 0,12$ la distancia entre W67-W67 es aproximadamente 15 \AA , lo que nos reitera que a concentraciones superiores de K^+ la distancia es menor, por el llenado con este ion del SF, concluyendo que el canal tiene un comportamiento similar cuando se encuentra solubilizado y cuando se encuentra reconstituido. Cuando comparamos los datos a pH 7 y 4 vemos que en el primer caso las curvas nos dan una alta afinidad por K^+ en todos los casos puesto que el SF alcanza una conformación conductora. Sin embargo a pH 4 el canal tiene baja afinidad por el K^+ porque pasa al estado inactivado. En este caso, la adición de POPA aumenta la afinidad del SF por el K^+ , protegiendo al canal contra la inactivación. Además podemos concluir que el efecto de los fosfolípidos aniónicos es directo (se une al canal) ya que observamos que aumenta la afinidad por el K^+ a pH 4 tanto cuando el canal está reconstituido en ASOL POPA como cuando está solubilizado en DDM POPA.

En cuanto a KcsA W67 R64A, este mutante carece de uno de los residuos de arginina de los sitios de unión de fosfolípidos aniónicos “no anulares”, como se indicó en la introducción. En esta región quedan intercalados lípidos aniónicos, interactuando con los residuos R64 de un monómero y R89 del otro monómero [1]. R64 interactúa con el W67 para estabilizar la triada de inactivación provocando la inactivación del canal. Sin embargo, en presencia de fosfolípidos aniónicos, R64 ya no interactúa con los residuos de la triada de inactivación, provocando que el canal no se inactive.

En las figuras 20 A y B se observa que el mutante KcsA W67 R64A tiene un comportamiento similar en las diferentes condiciones en las que se encuentra, independientemente de que haya POPA o no, ya que no se observan variaciones importantes en las afinidades calculadas en los experimentos de anisotropía de fluorescencia en el SF, en ninguno de los dos pH. Esto se ve reflejado en la tabla 2, donde se muestran las K_D , que no muestran variaciones importantes cuando hay presencia o ausencia POPA y tampoco entre ambos pH. Esto es debido a que los fosfolípidos aniónicos como POPA, no pueden unirse a los sitios “no anulares” debido a la mutación que presenta este canal, de manera que su efecto será nulo. Por esta razón no observamos diferencias cuando comparamos el canal reconstituido en ASOL con ASOL POPA y solubilizado en DDM con DDM POPA a pH 4 (figura 20B) a diferencia de lo que ocurría en KcsA W67 (figura 19B), ya que como se ha mencionado anteriormente, a pH 4 ocurre la inactivación del canal haciendo que

la K_D aumentase. La presencia de fosfolípidos aniónicos al interactuar con la R64 impediría la estabilización de la triada de inactivación, y por lo tanto la inactivación del canal, haciendo que disminuya la K_D al encontrarse el SF del canal en un estado tipo conductor.



6. Conclusiones y proyección futura

El canal de K^+ KcsA consiste en una proteína transmembrana homotetramérica, en la cual existen aminoácidos en posiciones concretas que son fundamentales para su correcta actividad. Durante los experimentos realizados en este trabajo, la expresión y purificación de los mutantes W67 y W67 R64A de KcsA se realizó con éxito.

La técnica de anisotropía de fluorescencia es muy útil para estudiar los cambios conformacionales dentro del filtro de selectividad, ya que nos permite medir las distancias entre los triptófanos W67 a partir de los procesos de Homo-FRET, de manera que podremos interpretar la conformación de la puerta externa (SF) y determinar si se encuentra en un estado conductor o no conductor.

El mutante W67, donde los W26, W67, W68, W87y W113 han sido mutados a fenilalanina ha sido clave en este trabajo, debido a que el proceso Homo-FRET necesita una alta simetría para poder determinar distancias, de manera que cuando se excita con una longitud de 295 nm será el único aminoácido aromático capaz de emitir fluorescencia.

Al estudiar el canal, tanto reconstituido en ASOL y en ASOL POPA como solubilizado en DDM y DDM POPA, nos ha permitido concluir que el efecto de los fosfolípidos aniónicos sobre el canal es directo, ya que observábamos resultados similares en el mutante KcsA W67 en ambos sistemas. En el caso de que el efecto hubiese sido indirecto, solo habríamos observado los efectos en el canal reconstituido ya que se habrían debido a los efectos que la bicapa lipídica hubiera ejercido sobre la proteína como por ejemplo a través de la presión lateral.

El mutante KcsA W67 R64A nos ha permitido evidenciar que el efecto de los lípidos aniónicos sobre la conformación del SF del canal tiene lugar a través de la zona no anular y no a través de otros dominios que se han propuesto para la unión de este tipo de lípidos, puesto que para este mutante los lípidos aniónicos no hacen ningún efecto. También nos ha servido para confirmar que el estado inactivado es el que da lugar a una menor afinidad por el ion K^+ en el SF, ya que este mutante no se inactiva y por tanto siempre presenta un SF con alta afinidad por este ion.

En cuanto a las proyecciones futuras del grupo de investigación, es seguir estudiando el efecto de diferentes lípidos en la estructura y función del canal. Otro de los objetivos sería ampliar este estudio con el mutante KcsA G116C W67 R64A. En este caso, la mutación de la posición 116 serviría como “reporter” de la compuerta interna, la cual se abre y cierra en función del pH como se ha explicado a lo largo de esta memoria. De este modo se podrá estudiar la comunicación alostérica entre las compuertas del canal,

utilizando la fluorescencia de W67 en la compuerta externa, y la de una sonda fluorescente unida a la cisteína 116 en la interna.

Por último, otro de los proyectos futuros consistirá en reconstituir la proteína en nanodiscos, que consisten en unos anillos que atrapa la bicapa lipídica en forma de disco que simulan un entorno muy similar al de una membrana para las proteínas. Tiene la ventaja que se puede estudiar las compuertas interna y externa de una manera más sencilla, pues se tiene acceso por ambos lados de la bicapa y además al ser pequeños, no dan problemas de dispersión de luz para hacer medidas espectroscópicas, que sí se tienen cuando se usan liposomas [32].



7. Bibliografía

- [1] Poveda, J. A., Giudici, A. M., Renart, M. L., Molina, M. L., Montoya, E., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Encinar, J. A., & González-Ros, J. M. (2014). Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *In Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1838 (6). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.023>.
- [2] Rosas, M. M. (2004). *Los canales iónicos: la biología y patología*, 74(2). *Archivos de cardiología de México*.
- [3] Renart, M. L., Giudici, A. M., Díaz-García, C., Molina, M. L., Morales, A., González-Ros, J. M., & Poveda, J. A. (2020). Modulation of function, structure and clustering of K⁺ channels by lipids: Lessons learnt from KcsA. *In International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21072554>.
- [4] Renart, M. L., Giudici, A. M., Coll-Díez, C., González-Ros, J. M., & Poveda, J. A. (2023). Anionic Phospholipids Shift the Conformational Equilibrium of the Selectivity Filter in the KcsA Channel to the Conductive Conformation: Predicted Consequences on Inactivation. *Biomedicines*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051376>.
- [5] Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B., & Perozo, E. (2006). Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(4). <https://doi.org/10.1038/nsmb1069>.
- [6] Renart, M. L., Giudici, A. M., Poveda, J. A., Fedorov, A., Berberan-Santos, M. N., Prieto, M., Díaz-García, C., González-Ros, J. M., & Coutinho, A. (2019). Conformational plasticity in the KcsA potassium channel pore helix revealed by homo-FRET studies. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42405-5>.
- [7] 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. (2010). Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K⁺ channels. *Nature*, 466(7303), <https://doi.org/10.1038/nature09136>.
- [8] Cuello, L. G., Cortes, M., & Perozo, E. (2017). *The gating cycle of a K⁺ channel at atomic resolution*. <https://doi.org/10.7554/eLife.28032.001>.
- [9] Cheng, W. W. L., Arcario, M. J., & Petroff, J. T. (2022). Druggable Lipid Binding Sites in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels and Transient Receptor Potential Channels. *In Frontiers in Physiology*, 12. *Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.798102>.
- [10] Poveda, J. A., Giudici, A. M., Renart, M. L., Millet, O., Morales, A., González-Ros, J. M., Oakes, V., Furini, S., & Domene, C. (2019). Modulation of the potassium channel KcsA by anionic phospholipids: Role of arginines at the non-annular lipid binding sites. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1861(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183029>.

- [11] Marius, P., Zagnoni, M., Sandison, M. E., Malcolm East, J., Morgan, H., & Lee, A. G. (2008). Binding of anionic lipids to at least three nonannular sites on the potassium channel KcsA is required for channel opening. *Biophysical Journal*, 94(5). <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.117507>.
- [12] 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., & González-Ros, J. M. (2010). Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry*, 49(25). <https://doi.org/10.1021/bi1003712>.
- [13] Weingarh, M., Prokofyev, A., Van Der Crujisen, E. A. W., Nand, D., Bonvin, A. M. J. J., Pongs, O., & Baldus, M. (2013). Structural determinants of specific lipid binding to potassium channels. *Journal of the American Chemical Society*, 135(10). <https://doi.org/10.1021/ja3119114>.
- [14] Lasic DD. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochem J*. Nov 15;256(1):1-11. doi: 10.1042/bj2560001. Erratum in: *Biochem J*, 1989; 258(3): following 933. PMID: 3066342; PMCID: PMC1135360.
- [15] Jones, M. N. (1995). THE SURFACE PROPERTIES OF PHOSPHOLIPID LIPOSOME SYSTEMS AND THEIR CHARACTERISATION. In *Advances in Colloid and Interface Science* (Vol. 54).
- [16] *Liposome Preparation - Avanti® Polar Lipids*. (n.d.). Retrieved May 14, 2024, from <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/transfection-and-gene-editing/liposome-preparation>.
- [17] dos Santos Rodrigues, F. H., Delgado, G. G., Santana da Costa, T., & Tasic, L. (2023). Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts. *BBA Advances*, 3, 100091. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100091>.
- [18] Franck-Condon Principle - an overview (2018). *ScienceDirect Topics*. Retrieved May 14, 2024, from <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/franck-condon-principle>.
- [19] Rojas-Valencia, O. G., Díaz-Santiago, D. L., Casas-Espínola, J. L., Reza-San-Germán, C. M., Estrada-Flores, M., y Torres-Santillán, E. (2023). Síntesis de partículas luminiscentes de carbono a partir de la carbonización de Beta Vulgaris (betabel). *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías Del ICBI*, 10(20). <https://doi.org/10.29057/icbi.v10i20.9793>.
- [20] Chan, F. T. S., Kaminski, C. F., & Schierle, G. S. K. (2011). HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells. In *ChemPhysChem* 12(3). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000833>.
- [21] Shrestha, D., Jenei, A., Nagy, P., Vereb, G., & Szöllösi, J. (2015). Understanding FRET as a research tool for cellular studies. In *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms16046718>.
- [22] Díaz-García C, Renart ML, Poveda JA, Giudici AM, González-Ros JM, Prieto M & Coutinho A. (2021). Probing the Structural Dynamics of the Activation Gate of KcsA Using Homo-FRET Measurements. *Int J Mol Sci*. 22(21). doi: 10.3390/ijms222111954.

- [23] Piston, D. W., & Kremers, G. J. (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *In Trends in Biochemical Sciences*, 32(9). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.003>.
- [24] Díaz-García, C., Renart, M. L., Poveda, J. A., Giudici, A. M., González-Ros, J. M., Prieto, M., & Coutinho, A. (2021). Probing the structural dynamics of the activation gate of kcsa using homo-fret measurements. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111954>.
- [25] Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Third).
- [26] Browne, M. A., Saha, S., & Mayor, S. (2013). Anisotropy imaging elucidates dynamic molecular interactions. *BioPhotonics*. Retrieved from https://www.photonics.com/Articles/Anisotropy_Imaging_Elucidates_Dynamic_Molecular/a53279
- [27] Alexandrov, A. I., Mileni, M., Chien, E. Y. T., Hanson, M. A., & Stevens, R. C. (2008). Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins. *Structure*, 16(3). <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.02.004>
- [28] Molina ML, Encinar JA, Barrera FN, Fernández-Ballester G, Riquelme G & González-Ros JM. (2004). Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry*. 43(47). doi: 10.1021/bi048889+.
- [29] Katja Schenke-Layland, Simone Liebscher & Shannon Lee Layland (2020). 1.3.6B-Use of Extracellular Matrix Proteins and Natural Materials in Bioengineering. ISBN 978-0-12-816137-1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00028-3>.
- [30] García-Segura, J. M. (1996). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. ISBN: 9788477384298.
- [31] Giudici, A. M., Díaz-García, C., Renart, M. L., Coutinho, A., Prieto, M., González-Ros, J. M., & Poveda, J. A. (2021). Tetraoctylammonium, a long chain quaternary ammonium blocker, promotes a noncollapsed, resting-like inactivated state in KCSA. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020490>.
- [32] Matthies, D., Bae, C., Toombes, G. E., Fox, T., Bartesaghi, A., Subramaniam, S., & Swartz, K. J. (2018). Single-particle cryo-EM structure of a voltage-activated potassium channel in lipid nanodiscs. *eLife*, 7, Article e37558.001. <https://doi.org/10.7554/eLife.37558.001>.