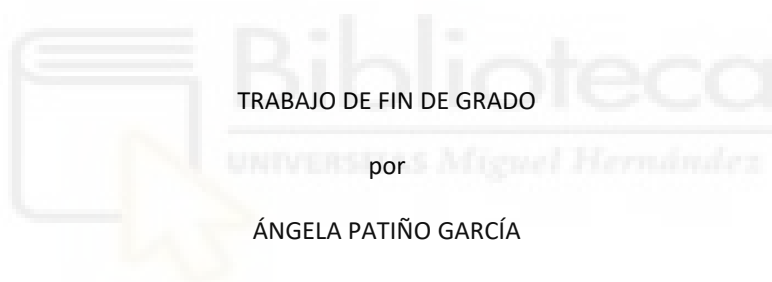




Expresión y purificación del canal de potasio mutante KirBac 1.1 F101W: caracterización de su estructura y función.



TRABAJO DE FIN DE GRADO

por

ÁNGELA PATIÑO GARCÍA

Tutor

Ana Marcela Giudici Besseghini

Co-tutor

José Antonio Poveda Larrosa

Área de conocimiento: Química Física

Departamento Agroquímica y Medio Ambiente

Curso académico 2023/2024

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biotecnología

ÍNDICE

1. Introducción:	4
1.1 Canales iónicos.	4
1.2 Características estructurales generales de los canales de potasio.	4
1.3 Características funcionales generales de los canales de potasio.	6
2. Antecedentes y objetivos:	8
2.1 Objetivos.	9
3. Materiales y Métodos:	10
3.1 Biología Molecular.	10
3.2 Expresión de la proteína:	10
3.2.1 Transformación.	10
3.2.2 Preinóculo.	11
3.2.3 Inóculo-Inducción.	11
3.3 Purificación de la proteína.	12
3.3.1 Resuspensión.	12
3.3.2 Solubilización.	12
3.3.3 Cromatografía de afinidad.	13
3.3.4 Electroforesis SDS-PAGE.	13
3.3.5 Diálisis.	13
3.3.6 Espectroscopía UV-Visible.	14
3.4 Medida del espectro de fluorescencia intrínseca.	15
3.5 Monitorización por fluorescencia de la desnaturalización térmica de las proteínas.	16
3.6 Reconstitución de la proteína en liposomas.	18
3.7 Ensayo de actividad mediante sondas fluorescentes.	19
4. Resultados:	21
4.1 Caracterización estructural de KirBac F101W.	21
4.1.1 Caracterización de la estructura terciaria de KirBac F101W por estudio mediante emisión de fluorescencia intrínseca.	21
4.1.2 Monitorización de la desnaturalización térmica mediante la intensidad de fluorescencia de KirBac F101W.	24
4.1.3 Unión de iones Na ⁺ y K ⁺ al canal a pH 7 y pH 4.	26
4.2 Caracterización funcional:	29
4.2.1 Ensayo de actividad con sonda fluorescente ACMA.	29
5. Discusión:	31
6. Conclusiones y proyección futura:	33
7. Bibliografía:	34

Palabras clave: canales de potasio, relaciones estructura-función, filtro de selectividad, estabilidad térmica de proteínas, fluorescencia, uniones ion-proteína.

Resumen: en esta memoria se ha caracterizado la estructura y función de la proteína KirBac F101W, mutante del canal modelo de potasio KirBac 1.1, a su vez análogo de los canales Kir eucariotas que previamente fue estudiado por el grupo de investigación donde se ha desarrollado este trabajo. La mutación de una fenilalanina por un triptófano en la posición 101 de la secuencia aminoacídica, localizada en la hélice del poro del canal, dominio adyacente al filtro de selectividad, se realizó para obtener información de la estructura de este a través de la monitorización de la emisión de fluorescencia de ese triptófano. Primero, se expresó la proteína de forma heteróloga en bacterias *E. Coli* y se purificó. Posteriormente, se estudió la estructura terciaria del canal mediante técnicas de fluorescencia aprovechando la presencia de residuos de triptófano en el dominio C-terminal y del triptófano mutado. Se midió el espectro de emisión de fluorescencia, así como la desnaturalización térmica de la proteína en condiciones de pH 4 y pH 7, que inducen el cierre y apertura del canal, respectivamente, y con iones Na^+ y K^+ , no conductor y conductor respectivamente, con la finalidad de estudiar la influencia de estos factores en la conformación del filtro de selectividad del canal. Los resultados indicaron que el canal mutante se comporta estructural y funcionalmente de forma similar al canal nativo. El resultado más relevante para esta memoria es que los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca son sensibles al tipo de ion presente en el medio. Este nuevo resultado se ha podido determinar con el canal mutante, cosa que no se pudo hacer con el nativo, confirmándose que la mutación introducida sirve de “reporter” de los cambios estructurales del filtro de selectividad del canal.

Abstract: In this study, the structure and function of the KirBac F101W protein, a mutant of the model potassium channel KirBac 1.1, which is an analogue of eukaryotic Kir channels previously studied by the research group where this work was developed, have been characterized. The mutation involved replaces a phenylalanine with a tryptophan at position 101 in the amino acid sequence, located in the pore helix of the channel, adjacent to the selectivity filter domain. This was done to obtain structural information by monitoring the fluorescence emission of this tryptophan. First, the protein was heterologously expressed in *E. coli* bacteria and purified. Subsequently, the tertiary structure of the channel was studied using fluorescence techniques, taking advantage of the presence of tryptophan residues in the C-terminal domain and the mutated tryptophan. The fluorescence emission spectrum and the thermal denaturation of the protein were measured under pH 4 and pH 7 conditions, which induce channel closing and opening, respectively, and with Na^+ and K^+ ions, non-conductive and conductive respectively, to study the influence of these factors on the conformation of the channel's selectivity filter. The results indicated that the mutant channel behaves structurally and functionally similarly to the wild-type channel. The most relevant finding of this study is that the intrinsic fluorescence emission spectra are sensitive to the type of ion present in the medium. This new result could be determined with the mutant channel, which was not possible with the wild-type one, confirming that the introduced mutation serves as a reporter of the structural changes in the channel selectivity filter.

1. Introducción:

1.1 Canales iónicos.

Los canales iónicos son proteínas integrales transmembrana que forman poros acuosos capaces de transportar hasta 10^7 iones por segundo de un lado a otro de la membrana celular. La difusión se ve facilitada por gradientes electroquímicos a ambos lados de la bicapa lipídica. Estos canales cumplen múltiples funciones vitales para las células y debido a que el movimiento de los iones tiende a disipar su gradiente, los canales tienen “compuertas” que los regulan y pueden ser activados por voltaje, ligandos y estimulación mecánica (Mazia 2017).

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

- Canales activados por voltaje: responden a cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática.
- Canales activados por ligandos: se abren en respuesta a la unión de un ligando al receptor asociado al canal.
- Canales mecanosensibles o activados por estímulos mecánicos: responden a impulsos mecánicos, como sería el aumento de presión o tensión en la membrana celular.

Otra forma de clasificar los canales iónicos es en función de los iones que dejan pasar a su través. En este caso se agruparían en canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- .

El presente trabajo se centrará en el estudio de los canales de potasio, concretamente en la caracterización estructural y funcional del canal de potasio procariota KirBac F101W. Esta proteína es un mutante del canal de potasio KirBac 1.1 que previamente ha sido caracterizado por el grupo de investigación, y que es considerado un canal modelo para la familia de los canales rectificadores de potasio (Kir).

1.2 Características estructurales generales de los canales de potasio.

Los canales de potasio son estructuras tetraméricas formadas por la asociación de cuatro subunidades que pueden ser idénticas (homotetrámero) o distintas (heterotetrámero), situadas alrededor de un poro central acuoso por el que fluyen los iones K^+ . Cada subunidad está formada por el dominio N-terminal, un número variable de segmentos transmembrana helicoidales (usualmente 2 o 6), que están conectados por una hélice corta (hélice del poro) y el filtro de selectividad, conformando la región P o región del poro, para terminar en el dominio C-terminal (Figura 1). Además, se han identificado para ciertos canales de potasio dominios reguladores sensibles a voltaje, dominios de unión de Ca^{2+} o dominios citoplasmáticos los cuales estarían involucrados en la apertura y cierre del canal (Renart et al. 2006).

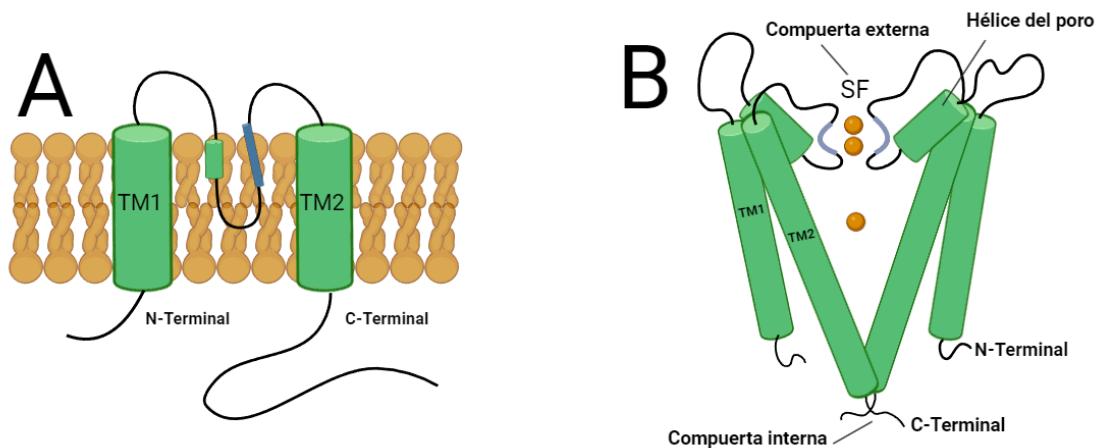


Figura 1. Estructura general de un canal de potasio. A) Representación del modelo topológico de un monómero de un canal de potasio, integrado en la membrana plasmática, compuesta por dos segmentos transmembrana (TM1 y TM2) y los dominios N-terminales y C-terminales intracelulares. Este diseño es característico de ciertos canales eucariotas y procariotas como KcsA y KirBac 1.1. B) Esquema que muestra dos de las cuatro subunidades que constituyen un canal de potasio con dos dominios transmembrana en conformación cerrada. Cada subunidad consta de dos hélices transmembrana conectadas por una hélice del poro, además de la secuencia del filtro de selectividad (SF, en color azul). El espacio entre las subunidades sería el poro por el que pasan los iones, representados como esferas naranjas. Esta figura ha sido creada con la plataforma Biorender.

KirBac 1.1 es un homotetrámero que posee la estructura típica de los canales de potasio que ha sido comentada previamente. Concretamente, cada una de sus subunidades posee dos segmentos transmembrana helicoidales (TM1 y TM2), una hélice corta (hélice del poro), y el filtro de selectividad iónico (SF) con cuatro sitios de unión para el K^+ (S1-S4) aparte de los dominios N-terminal y C-terminal. El SF actúa como la compuerta externa del canal, mientras que la zona de entrecruzamiento en el extremo C-terminal de los dominios TM2 sería la interna (figura 1B). Adicionalmente posee también un dominio C-terminal complejo (CTD), que desempeña un papel crucial en la regulación de su actividad funcional (figura 2A). Se ha demostrado que diversos factores como fosfolípidos aniónicos, PIP_2 (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato), colesterol y pH pueden modular la función del canal al interactuar con este dominio (Wang et al. 2009).

El filtro de selectividad de KirBac 1.1 está formado por el enfrentamiento tridimensional de las cuatro subunidades que lo conforman alrededor del poro central, de manera que las cuatro secuencias consenso quedan enfrentadas creando los sitios de unión para el K^+ . La secuencia consenso es una secuencia aminoacídica que está altamente conservada en el filtro de selectividad de todos los canales de potasio, siendo esta TVGYG (figura 2B). El filtro de selectividad desempeña un papel fundamental en la selectividad iónica al facilitar la interacción específica entre los iones de K^+ y los grupos carboxilo de los residuos presentes en dicho filtro, permitiendo su paso a través del canal de manera muy eficiente (Heginbotham et al. 1994).

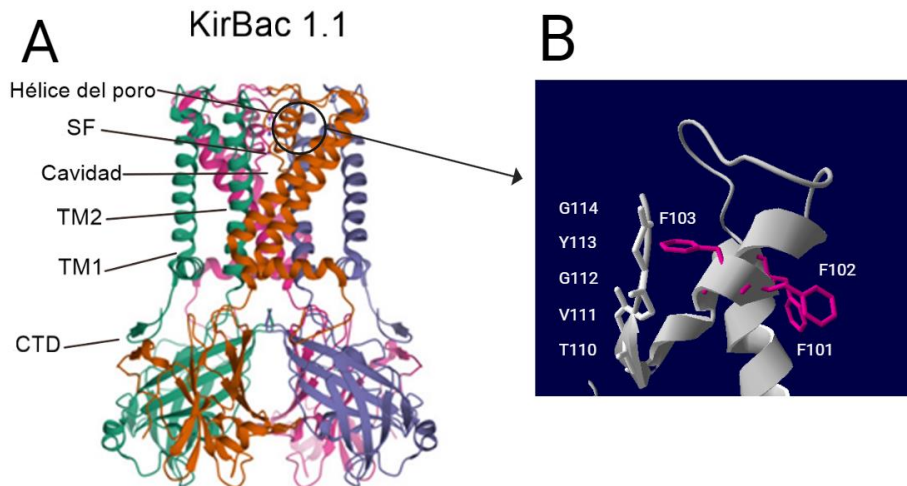


Figura 2. A): Estructura de KirBac 1.1 (PDB: 1P7B). Cada uno de los cuatro monómeros se representan de un color diferente. Se señalan el C-terminal (CTD), la región transmembrana 1 (TM1), la región transmembrana 2 (TM2), la cavidad, el filtro de selectividad y la hélice del poro. Esta figura ha sido sacada de la plataforma PDB y modificada posteriormente. B): Imagen ampliada del filtro de selectividad de KirBac 1.1 en el que se aprecia la secuencia firma TVGYG y las fenilalaninas de la hélice del poro. Esta figura ha sido creada con la aplicación DeepView/Swiss-PdbViewer.

Mientras que la estructura secundaria de los residuos cercanos al filtro de selectividad se conserva, otras regiones como la hélice del poro, las compuertas y la parte citoplasmática muestran variabilidad respecto a otros canales de potasio. Importante para esta memoria, en el dominio C-terminal de cada monómero de KirBac 1.1 hay 7 triptófanos que se utilizarán como sondas fluorescentes para estudiar cambios conformacionales e interacciones con ligandos (figura 3).

En estudios anteriores del canal modelo de potasio KcsA, se ha observado que existe una modulación alostérica bidireccional entre el grado de ocupación del SF (compuerta externa) y el C-terminal (compuerta interna) (Tilegenova et al. 2017; Hoshi and Armstrong 2013; Cuello et al. 2010). En KirBac 1.1 se sugiere un mecanismo de apertura del canal similar a KcsA, donde la sección transmembrana más próxima al C-terminal se abre y permite a los iones pasar a través del poro. Esta hipótesis está basada en experimentos anteriores de FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster) y RMN (Resonancia Magnética Nuclear) (Sadler et al. 2016).

1.3 Características funcionales generales de los canales de potasio.

El canal de potasio procariota KirBac 1.1 fue identificado por primera vez en la bacteria *Thermotoga marítima*. Este canal es de tipo rectificador interno, de manera que permite preferentemente el flujo de iones K^+ hacia el interior en condiciones fisiológicas. KirBac 1.1 y los canales de potasio en general, participan en la regulación del potencial de membrana y la excitabilidad celular en una amplia variedad de tejidos y células en el organismo humano. Su función principal radica en la mediación del flujo selectivo de iones K^+ a través de la membrana celular, el cual es un proceso esencial para la transmisión de señales eléctricas, la estabilidad del potencial de reposo, la modulación de la excitabilidad celular, la regulación del ritmo cardíaco, la función neuronal y la contracción muscular (Mironenko et al. 2021).

Tras una serie de ensayos funcionales, se pudo observar que KirBac 1.1 era similar a los canales Kir eucariotas presentes en riñón, hígado, corazón y neuronas entre otros (Kuo 2003), ya que ambos son selectivos a K^+ y son bloqueados por iones bario y calcio (Enkvetchakul et al. 2004), así como por el PIP_2 (fosfatidil inositol bifosfato), siendo mayor la inhibición en ambos casos cuanto más larga sea la cadena del fosfolípido y más grupos fosfato y cargas negativas tenga (Cheng et al. 2009). Esto, sumado a las similitudes estructurales que comparten, convierten a KirBac 1.1 en un modelo útil para investigar la función y la estructura de estos canales de K^+ rectificadores de entrada.

Aunque los canales de potasio están principalmente diseñados para el transporte de iones K^+ , también pueden permitir el paso de otros cationes monovalentes, aunque con menor eficacia. Se han observado diferencias entre los canales de potasio en cuanto a su comportamiento frente al Na^+ en presencia o ausencia de K^+ . Algunos canales pueden conducir Na^+ en ausencia de K^+ , como ciertas variantes mutantes de KcsA, mientras mantienen su selectividad por el K^+ en su presencia. Otros canales de potasio, como el KcsA nativo, no conducen Na^+ bajo estas condiciones (Chen et al. 1997).

La actividad de los canales de potasio puede verse también influenciada por el pH del medio. A pH ácido, KirBac 1.1 tiende a estar cerrado, mientras que, a pH neutro o alcalino, el canal puede permanecer abierto, dependiendo de la concentración de iones K^+ y la interacción con otras moléculas reguladoras (Hellgren et al. 2006; Renart et al. 2023). Mediante el análisis del espectro de fluorescencia intrínseca del canal se observaron cambios en su estructura terciaria cuando se comparó a pH 4 con pH 7. En presencia de ambos iones estudiados (Na^+ y K^+), a pH 4, se observó un desplazamiento del espectro hacia el azul en comparación con pH 7. Esto sugiere que a pH 7, KirBac 1.1 presenta una estructura terciaria en la que los triptófanos, ubicados en el C-terminal de cada monómero, podrían estar más expuestos al disolvente o en un ambiente más polar, lo que implica posibles interacciones diferentes con los aminoácidos adyacentes. Estas interacciones que han sido registradas gracias a la fluorescencia de los triptófanos situados en el C-terminal (Figura 3A) nos sugieren que el canal se abre a pH 7 a través del extremo C-terminal de la región transmembrana, mientras que a pH 4 la compuerta se encontraría cerrada.

2. Antecedentes y objetivos:

El objetivo de estudio en el grupo de investigación son los canales iónicos, habiéndose centrado sobre todo en la caracterización estructural y funcional del canal de potasio KcsA durante los últimos años. Mediante la cuantificación de la afinidad de unión de iones permeantes y no permeantes al filtro de selectividad, bajo diferentes condiciones de pH, se ha avanzado en la comprensión de los fundamentos moleculares relacionados con la permeabilidad, selectividad e inactivación de los canales de potasio. (Poveda et al. 2019; Montoya et al. 2017; Giudici et al. 2019; Renart et al. 2006).

En la proteína KcsA “wild-type” (WT) hay cinco residuos de triptófano distribuidos al principio de TM1 y al final de TM2 (W26 y W113), en las hélices del poro adyacente al SF (W67 y W68) y orientado hacia la bicapa lipídica, en la mitad extracelular de la proteína (W87). Estos residuos son utilizados como indicadores de la unión de cationes mediante la medida de su emisión de fluorescencia intrínseca.

Tras la caracterización de la proteína KcsA WT, se estudiaron sus variantes mutantes de W, siendo particularmente interesante para este trabajo la caracterización de KcsA W67, ya que se ha establecido una analogía en el método de trabajo con KirBac F101W.

KcsA W67 es un cuádruple mutante de la proteína KcsA WT, en la cual se han sustituido cuatro de los cinco triptófanos comentados previamente por fenilalaninas (W26,68,87,113F), quedando únicamente sin mutar el triptófano W67 localizado en la hélice del poro, adyacente al SF, región que actúa como compuerta del canal discriminando los iones que pueden permear a través de él. Esta cuádruple mutación presenta la ventaja de que la única señal de fluorescencia a detectar proviene de los residuos W67, uno en cada hélice del poro de las cuatro subunidades del canal, mientras se conserva el comportamiento WT de la proteína. De esta forma, no solo se pudo caracterizar las interacciones ion-proteína en términos de afinidad, sino también cambios conformacionales en las hélices del poro vinculados a los estados abierto y cerrado del SF (Renart et al. 2024).

En el presente trabajo se pretende profundizar más en la comprensión de los mecanismos estructurales y funcionales del ya caracterizado canal de potasio KirBac 1.1, mediante el estudio del canal mutante KirBac F101W, de la misma forma que se hizo con KcsA WT y KcsA W67. Concretamente se desea obtener más información acerca de la región del SF. Por ello se mutó en la posición 101 de la secuencia aminoacídica de KirBac 1.1, específicamente en la hélice del poro, una fenilalanina por un triptófano, el cual actuará de indicador de las posibles variaciones de esa región en particular que tanta relación guarda con los cambios estructurales del SF (figura 3B). Asimismo, como ya se ha comentado en la introducción, en KirBac 1.1 existen 7 residuos de triptófano presentes de forma nativa en su extremo C-terminal, los cuales se conservan en KirBac F101W, y que se pueden observar en la figura 3A. La monitorización de su fluorescencia se usa para obtener también información de los posibles cambios estructurales generales que se produzcan en las regiones más alejadas del SF.

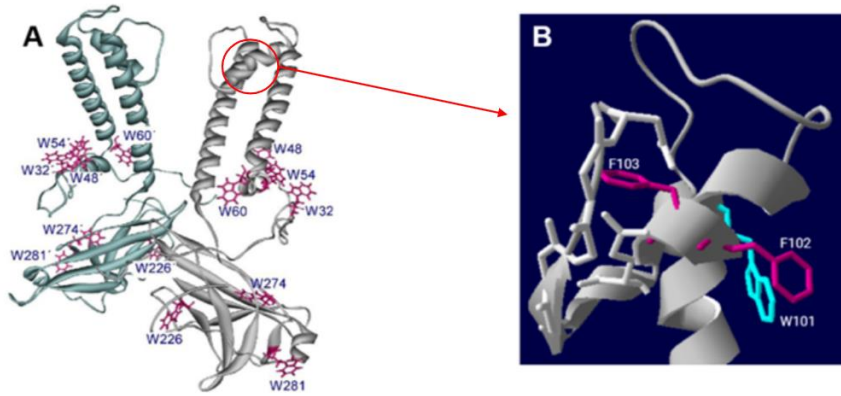


Figura 3. A) Representación de dos subunidades del tetrámero de KirBac F101W. Se detalla la localización de los siete triptófanos WT de cada monómero. B) Imagen ampliada de la hélice del poro en el que se muestra en color azul el triptófano que fue mutado a partir de una fenilalanina.

2.1 Objetivos.

El objetivo general que se pretende alcanzar con el presente trabajo es la caracterización estructural y funcional del canal de potasio KirBac F101W, a través de su interacción con cationes conductores y no conductores en estado abierto (pH 7) y cerrado (pH 4). La mutagénesis de fenilalanina a triptófano en la hélice del poro se lleva a cabo para tener un residuo que haga de “reporter” de las conformaciones del SF del canal, de manera similar a como se hizo previamente con KcsA, utilizando el residuo W67 análogo.

Para ello se detallan a continuación los objetivos específicos que engloba el objetivo general comentado:

- Expresar y purificar el canal KirBac F101W.
- Determinar la influencia de los iones y el pH en la estructura terciaria del canal KirBac F101W a través de los espectros de emisión de fluorescencia del mismo.
- Analizar el efecto de los iones y el pH en la estabilidad del canal KirBac F101W frente a la desnaturalización térmica mediante su monitorización por fluorescencia, como manera de evaluar la conformación del filtro de selectividad del canal.
- Medir la actividad del canal KirBac F101W en diferentes condiciones de pH e iones para compararlo con el canal nativo.

3. Materiales y Métodos:

3.1 Biología Molecular.

La proteína KirBac F101W difiere respecto al canal nativo en una mutación por sustitución del aminoácido fenilalanina por un triptófano en la posición 101. Este triptófano mutado se muestra en verde en la secuencia inferior.

Secuencia de aminoácidos de KirBac F101W:

```
MNVDPFSPHSSDSFAQAASPARKPPRGGRRIWSGTREVIAYGMPASVWRDLYYWALKVSWPVFFAS  
LAALFVVNNTLFALLYQLGDAPIANQSPPGFVGAWFFSVETLATVGYGDMHPQTVYAHAIATLECFVG  
MSGIALSTGLVFARFARPRAKIMFARHAIVRPFNGRMTLMVRAANARQNVAEARAKMRLMRREHSS  
EGYSLMKIHDLKLVKLRNEHPIFLLGWNMMHVIDESSPLFGETPESLAEGRAMLLVMIEGSDETTAQVMQ  
ARHAWEHDDIRWHHRVYDLMSDVDGMTHIDYTRFNDTEPVEPPGAAPDAQAFAAKPGEGDARPVLV  
PRGSRSHHHHHH
```

Se emplearon las herramientas disponibles en la base de datos www.expasy.org, particularmente la herramienta ProtParam, para obtener ciertos parámetros de la proteína KirBac F101W: peso molecular: 38,8 kDa; coeficiente de extinción molar (ϵ): $57410 M^{-1} \cdot cm^{-1}$; pI: 7,15.

El plásmido destinado a la transformación y expresión de la proteína se adquirió a través de la empresa Genscript. Esta empresa utiliza un sistema de optimización de codones, una tecnología patentada que permite ajustar las secuencias de genes naturales y recombinantes con el propósito de maximizar la productividad en sistemas de expresión específicos. El plásmido seleccionado para este propósito fue el pET-28a (+), que contiene un gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina.

3.2 Expresión de la proteína:

3.2.1 Transformación.

Se llevó a cabo la transformación de las bacterias competentes *E. coli* BL21 mediante un tratamiento de choque térmico. Para este propósito, se introdujeron 100 ng del plásmido pET-28a (+) mencionado anteriormente. Luego, se incorporaron 1,7 μ L de β -mercaptoetanol (1,67 % (v/v)) y se agregó 1 mL de medio de cultivo LB esterilizado. La mezcla se incubó en un agitador durante una hora a una temperatura de 37°C y a una velocidad de 200 rpm.

Tras el período de incubación, se plaquearon 50 μ L de la mezcla en condiciones estériles en una placa de agar LB suplementada con 25 μ L de kanamicina (25 mg/mL) (figura 4).

Simultáneamente, se siguió el mismo procedimiento de transformación de las bacterias *E. coli* BL21, pero en este caso no se añadió el plásmido. Estas bacterias se sembraron en placas de agar LB con kanamicina y se utilizaron como control negativo de la transformación para cerciorarse de su buen estado, ya que, al no poseer el plásmido con el gen de resistencia a la kanamicina, no deberían crecer en el medio, y, en caso de hacerlo, sería indicativo del mal estado de las mismas. Finalmente, las placas se dejaron crecer durante toda la noche a 37 °C en una estufa.

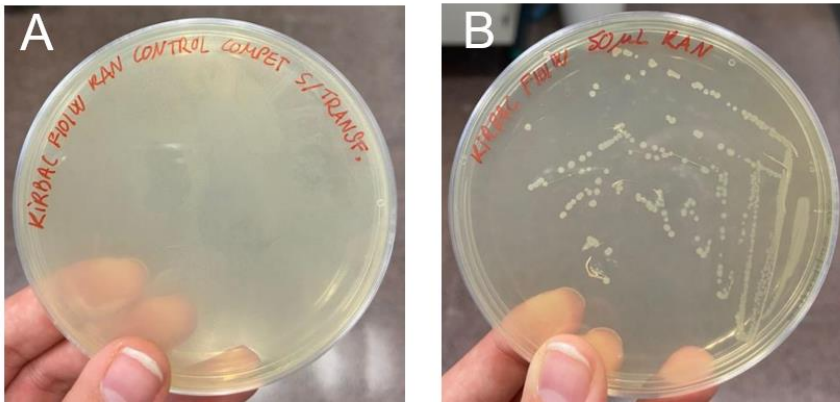


Figura 4. Imágenes de las placas LB Agar suplementadas con Kanamicina. A: placa control con células competentes sin transformar. B: placa con 50 µl de KirBac F101W con células transformadas.

3.2.2 Preinóculo.

A partir de las colonias elegidas, se generó un preinóculo cultivándolas a una temperatura de 30 °C, con agitación a 200 rpm, en un volumen de 250 mL de medio LB líquido estéril, el cual se muestra en la figura 5. A este cultivo se le añadió kanamicina (25 µg/mL) y glucosa (0,4 µg/mL) y se mantuvo durante toda la noche.

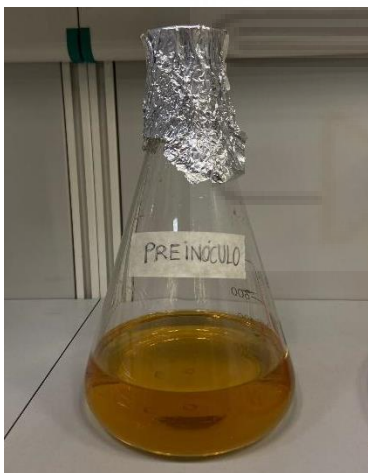


Figura 5. Matraz de 250mL LB estéril líquido suplementado con Kanamicina (25 µg/mL) y Glucosa (0,4 µg/mL) donde se adicionaron las colonias elegidas.

3.2.3 Inóculo-Inducción.

Se procedió a la preparación y esterilización mediante autoclave de cuatro matraces de litro de 2xYT líquido, cada uno conteniendo 1 L de agua y 36 g de medio (compuesto por 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl). Una vez que los medios estuvieron listos, se agregó de manera estéril 1 mL de kanamicina (25 mg/mL) y 1 mL de glucosa (0,4 g/mL) en cada uno de los matraces. Posteriormente, se añadieron 50 mL del preinóculo de KirBac F101W que se había cultivado durante toda la noche por cada litro de medio.

El inóculo, de esta manera preparado, se dejó crecer a 37 °C con agitación hasta alcanzar un valor de densidad óptica de 0,6-0,7 a una longitud de onda de 600 nm. Tras alcanzar la densidad óptica adecuada, se procedió a la inducción mediante la adición de 600 µL de IPTG 1 M (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). La inducción se llevó a cabo durante un período de 3 horas a una temperatura

de 30 °C con agitación a 200 rpm. Una vez concluido el tiempo de inducción mencionado previamente, los cultivos se sometieron a un proceso de centrifugación en una centrifuga refrigerada Beckman Coulter Avanti J-30 I, utilizando un rotor JA-10, el cual duró 15 minutos a una velocidad de 6.000 rpm y a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se congelaron los pellets.

Cabe destacar que antes de realizar la inducción, se preparó un tubo de glicerol-stock con el propósito de preservar las células ya transformadas en nitrógeno líquido y evitar este paso en una posible purificación posterior. Para ello, se mezclaron 800 µL de células con 200 µL de glicerol estéril al 80%.

3.3 Purificación de la proteína.

3.3.1 Resuspensión.

Después de descongelar los pellets y asegurarse de retirar cualquier residuo de medio que pudiera quedar en los tubos de centrifuga, se prepararon 50 mL de tampón de resuspensión con una composición de 20 mM de HEPES y 0,45 M de sacarosa, ajustado a un pH de 7,5 por cada litro de cultivo. Se agregó un conjunto de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free ROCHE, 1 pastilla por cada 200 mL) al tampón y se agitó usando un imán. Luego, con esta mezcla, se procedió a resuspender todos los pellets y posteriormente se sometieron a un proceso de sonicación en hielo, variando la potencia de manera gradual durante intervalos de 45 segundos en cada nivel de potencia (como se muestra en la figura 6). Finalmente, las muestras se centrifugaron utilizando una ultracentrifuga Beckman Coulter Optima L-90K con el rotor T-45, durante 45 minutos a una velocidad de 35.000 rpm y a una temperatura de 4°C.



Figura 6. Branson Sonifier 250, utilizado para la rotura de las células en el proceso de purificación de KirBac F101W.

3.3.2 Solubilización.

Al terminar la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se procedió a resuspender el pellet resultante en tampón de solubilización. Este tampón consistía en una mezcla de 20 mM de HEPES, 200 mM de KCl, 10 mM de detergente DDM (β -D-dodecilmaltósido) y 50 mM de Imidazol, todo ello ajustado a un pH de 7,5 y en una proporción de 20 mL por cada litro de cultivo. El objetivo era extraer la proteína de membrana KirBac F101W, de su entorno lipídico, permitiendo que se vuelva soluble en medio acuoso en forma de micelas de detergente.

El líquido resultante se transfirió a tubos Falcon y se completó la resuspensión utilizando un politrón a fuerza 3, aplicando este proceso durante 45 segundos, repetido entre 3 y 4 veces por tubo. Luego, las

muestras se solubilizaron en una noria durante un período de 2 horas y posteriormente se sometieron a una centrifugación en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K con el rotor T-45. Esta centrifugación se realizó durante 45 minutos a una temperatura de 4 °C y a una velocidad de 35.000 rpm, con el propósito de eliminar los restos no solubilizados.

3.3.3 Cromatografía de afinidad.

Para promover una interacción específica entre la proteína y una matriz que contiene grupos quelantes de Ni²⁺, se aprovechó la presencia de una cola de histidinas en el extremo C-terminal de KirBac F101W. Esta característica facilitó la formación de un complejo entre el grupo imidazol situado en los residuos de histidina de la cola terminal y los componentes de la fase estacionaria. Previamente a la realización de la cromatografía, se preparó tanto la resina como los tampones necesarios.

En el caso de la resina Ni²⁺-Sepharose, se dispusieron 200 µl de resina por cada litro de cultivo en tubos Falcon. Luego, se agregaron 10 mL de agua destilada y se permitió que la resina sedimentara durante 30 minutos. Posteriormente, se retiró el agua y se añadieron aproximadamente 10 mL de tampón de solubilización para equilibrar la resina, siguiendo el procedimiento indicado previamente. Después de eliminar el tampón excedente, se combinó la resina con el sobrenadante con la proteína solubilizada obtenido de la centrifugación descrita anteriormente y se dejó en incubación durante toda la noche a 4°C en noria.

En lo que respecta a la preparación de los tampones, se incluyó un tampón de elución compuesto por 20 mL, que incluye 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 5 mM DDM y 500 mM Imidazol, todos ajustados a un pH de 7. Por otro lado, para la preparación del tampón de lavado, se generó una solución de 100 mL por cada litro de cultivo, compuesta por 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 5 mM DDM y 50 mM Imidazol, con un pH de 7.

Una vez finalizado el período de incubación de la resina con el sobrenadante de la fracción solubilizada, la mezcla se transfirió a la columna cromatográfica. Se dejó que la resina se asentara uniformemente al final de la columna, sin llegar a secarse. Luego, se aplicó el tampón de lavado hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor de 0,001. En ese momento se aplicó tampón de elución controlando el flujo mediante la llave de dos vías para el llenado de 10 tubos Eppendorf de 1,5 mL.

3.3.4 Electroforesis SDS-PAGE.

La electroforesis en gel de poliacrilamida se emplea para detectar la presencia y comprobar el estado y pureza en el que se encuentra la proteína, cuyas fracciones fueron obtenidas en la purificación. Este método se lleva a cabo en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y tras la electroforesis se realiza la tinción del gel con Azul de Coomassie para poder observar las bandas correspondientes a la proteína obtenida en el proceso de purificación.

3.3.5 Diálisis.

Después de la elución y tras comprobar la pureza y la identidad de la proteína mediante los geles de electroforesis, las alícuotas recogidas de la cromatografía de afinidad se dividieron en función de la concentración de proteína. Las más concentradas se colocaron en bolsas de diálisis separadas (Sigma-

Aldrich, MWCO 12,4 kDa), mientras que los menos concentrados se agruparon en una sola bolsa. Estas muestras se sometieron a diálisis utilizando un tampón compuesto por 20 mM de HEPES, 5 mM de DDM y 150 mM de KCl a pH 7. El propósito de este proceso era eliminar el imidazol de las muestras mediante el equilibrio de gradientes dentro y fuera de las membranas de diálisis. El imidazol, siendo una molécula pequeña, puede atravesar el tamaño del poro de la membrana, quedando repartido dentro y fuera, mientras que las proteínas más grandes se retuvieron en su interior (ver figura 7).

La diálisis se realizó en una nevera con agitación suave, utilizando un total de 1 L de tampón que fue renovado después de 3 horas. Dado que se llevaron a cabo experimentos con diferentes iones y condiciones de pH, la diálisis también se empleó para ajustar las condiciones de las muestras, utilizando un tampón de 20 mM de HEPES, 5 mM de DDM a pH 7 o 20 mM de ácido succínico, 5 mM de DDM a pH 4, a los que se añadieron una cierta cantidad de NaCl o KCl según las condiciones iónicas específicas requeridas para cada experimento.

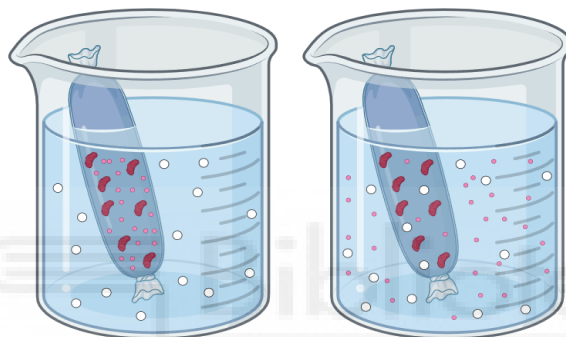


Figura 7. Esquema explicativo del mecanismo de separación durante la diálisis de las fracciones obtenidas tras la cromatografía de afinidad. La imagen de la izquierda ilustra la proteína antes de la diálisis, y la de la derecha al finalizar. Las partículas pequeñas y rosas serían el imidazol; las blancas, los diferentes componentes del tampón y los granates grandes, las proteínas. Esta figura ha sido creada con la plataforma Biorender.

3.3.6 Espectroscopía UV-Visible.

Una vez completado el proceso de diálisis, las muestras se centrifugaron a 21.000 g durante 5 minutos a 4°C para desechar cualquier impureza o agregado, permitiendo así determinar la concentración de la proteína purificada.

La cuantificación fue realizada mediante un barrido de longitudes de onda que comenzó en 340 nm y terminó en 230 nm, utilizando un espectrofotómetro Varían Cary 50 BIO. En espectroscopía UV-Vis, un haz de luz atraviesa una muestra a una longitud de onda específica en el espectro ultravioleta o visible. Si la muestra absorbe parte de esta luz, no toda la luz logra pasar o ser transmitida a través de ella. La transmisión se calcula como la relación entre la intensidad de la luz transmitida y la luz incidente, y se vincula con la absorbancia, la cual puede emplearse de dos maneras: cualitativamente, para identificar compuestos, considerando, por ejemplo, que, debido a la existencia de triptófanos en su estructura, las proteínas absorben a una longitud de onda de 280 nm; o cuantitativamente, como en este caso, para determinar la concentración de una muestra. Esto se realiza aplicando la ley de Lambert-Beer:

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

Ecuación 1. A es la absorbancia medida a 280 nm, ε es el coeficiente de extinción molar de la proteína ($57410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l es la medida del paso óptico de la cubeta, en este caso, 1 cm y C es la concentración molar de la proteína.

Es importante realizar el barrido y medir la absorbancia hasta 340 nm ya que, aunque el valor de absorbancia esperado en principio es 0 porque las proteínas no deberían absorber a esta longitud de onda, si se obtiene un valor diferente, esta medición sería indicadora de la presencia de algo de turbidez en la muestra, incluso después de la centrifugación. En caso de detectar esta turbidez, se podrían tomar medidas para corregirla, como realizar una segunda centrifugación o restar ese valor de absorbancia no deseado a la medida de absorbancia a 280 nm.

3.4 Medida del espectro de fluorescencia intrínseca.

Los espectros de emisión de fluorescencia son herramientas que proporcionan una valiosa información acerca de la estructura tridimensional y el plegamiento de las proteínas. Esto es posible gracias a la presencia de ciertos compuestos en las proteínas, conocidos como fluoróforos, que emiten fluorescencia cuando se excitan a una longitud de onda específica. En las proteínas, los principales fluoróforos son los aminoácidos aromáticos, como triptófano, tirosina y fenilalanina. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la fluorescencia proviene principalmente del triptófano debido a su mayor rendimiento cuántico. Los espectros de emisión de fluorescencia muestran cómo varía la intensidad de la fluorescencia emitida en un rango específico de longitudes de onda. Esta fluorescencia emitida por los fluoróforos es altamente sensible a su entorno, lo que permite obtener información sobre la estructura tridimensional de la proteína en diferentes condiciones experimentales, como se mencionó anteriormente.

Para medir los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca, se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y un espectrofotómetro Varian Cary Eclipse. Las muestras se excitaron a una longitud de onda de 295 nm, que corresponde a la región donde el espectro de emisión del triptófano predomina sobre el de la tirosina y la fenilalanina. La emisión se registró en un rango de 305 a 450 nm con incrementos de 1 nm, lo que permitió obtener un espectro que representa la intensidad de la fluorescencia emitida en función de las longitudes de onda en nm. La concentración final de proteína utilizada fue de 1 μM .

Para analizar los datos obtenidos mediante espectroscopía de fluorescencia, se realizó una normalización que ajustó los valores en un rango de 0 a 1 utilizando la siguiente ecuación:

$$F_N = \frac{I_i - \min(I_i)}{\max(I_i) - \min(I_i)}$$

Ecuación 2. I_i representa el valor de la intensidad de fluorescencia emitida medido a una longitud de onda "i", $\min(I_i)$ es el valor mínimo de intensidad de fluorescencia emitida en el rango de longitudes de onda de 305 nm a 450 nm, y $\max(I_i)$ es el valor máximo de intensidad de fluorescencia emitida en ese mismo rango de longitudes de onda.

Con objeto de cuantificar los cambios de posición del espectro de emisión de fluorescencia, se calculó el centro de masas o longitud de onda promedio ponderada por la intensidad, $\langle \lambda \rangle$, mediante la siguiente ecuación:

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

Ecuación 3. I_i representa el valor de intensidad de fluorescencia emitida medido a una longitud de onda específica, λ_i .

3.5 Monitorización por fluorescencia de la desnaturalización térmica de las proteínas.

Los ensayos de desnaturalización térmica se realizan para estudiar la estabilidad térmica de las proteínas ante temperaturas crecientes y para determinar la temperatura de desnaturalización (t_m). La t_m es el punto donde la mitad de la proteína está desnaturalizada y la otra mitad está en su estado nativo. A mayor valor de t_m , más estable será el canal, ya que hará falta un incremento mayor en la temperatura para desnaturalizarlo.

En KirBac 1.1, el aumento en la estabilidad térmica y por lo tanto del valor de la t_m , está influenciado por la unión de iones al filtro de selectividad ya que estabilizan la estructura cuaternaria de la proteína, influyendo en el proceso de despliegue y la disociación térmica al funcionar como un "cemento" puesto que al unirse al SF interaccionan con las cuatro subunidades del canal, similar a lo que se ha publicado para KcsA (Montoya et al. 2017). Además, en anteriores investigaciones sobre KcsA y KirBac 1.1, se ha demostrado que, ante cambios de temperatura crecientes, los canales pasan de un estado tetramérico a uno monomérico, perdiendo parte de su estructura de manera irreversible, fenómeno que se puede observar mediante la monitorización de la fluorescencia de los triptófanos presentes en el canal (Triano et al. 2010; Rodríguez 2023).

Durante la desnaturalización térmica, la intensidad de la fluorescencia emitida a 340 nm en función de la temperatura sigue una curva sigmoideal. Esto se debe a que, en el estado tetramérico, los triptófanos emiten con mayor intensidad al no estar en contacto directo con el disolvente. Sin embargo, a medida que la temperatura aumenta y la proteína se desnaturaliza, la fluorescencia disminuye debido a la mayor exposición de los triptófanos al solvente, hasta que solo se registra la fluorescencia del monómero.

El ensayo de desnaturalización térmica se realizó en un espectro fluorímetro Varian Cary Eclipse, con una velocidad de calentamiento de 0,6 °C/min. Se excitó la muestra a una longitud de onda de 280 nm y se registró la intensidad de fluorescencia emitida a 340 nm. Los experimentos se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. Se utilizaron muestras con una concentración de 1 μ M de proteína solubilizada en un tampón a pH 7 y pH 4, con concentraciones variables de diferentes cationes. Los datos obtenidos de la monitorización de la desnaturalización térmica mediante fluorescencia se representaron en una gráfica que muestra la intensidad de fluorescencia emitida a 340 nm en función de la temperatura en grados Celsius. Esta representación da lugar a la conocida curva de desnaturalización térmica, la cual sigue una función sigmoidea y el punto en el que se produce la

inflexión se conoce como la temperatura media de desnaturalización, representada como t_m (Renart et al. 2012).

Utilizando el *software* Kaleida Graph (Synergy Software), se determinó la t_m para cada una de las muestras mediante un ajuste no lineal de la curva de desnaturalización térmica utilizando la siguiente ecuación:

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

Ecuación 4. F_{340} es la medida de fluorescencia de emisión a 340 nm a una temperatura dada; α_N y α_D , la fluorescencia intrínseca del estado nativo y desnaturalizado de la proteína a 298 °K; β_N y β_D , las pendientes de la variación de fluorescencia en el estado nativo y desnaturalizado de la proteína; T , la temperatura en grados Kelvin; T_m , la temperatura media de desnaturalización en grados Kelvin; ΔH_{D-N} , el cambio de entalpía de desnaturalización, relacionado con la pendiente de la curva de desnaturalización y R , la constante de los gases ideales con un valor de 1,987207 cal/mol · K (Triano et al. 2010).

Cabe concretar que la t_m se refiere a la temperatura en grados Celsius necesaria para desnaturalizar la mitad del material proteico presente en la muestra y la T_m se refiere al mismo fenómeno en grados Kelvin.

Una vez calculada la t_m para cada muestra en presencia de concentraciones crecientes de Na^+ y K^+ , se utilizaron estos valores para determinar las constantes de disociación de estos iones con el filtro de selectividad del canal iónico.

Para calcular estas constantes, se representó el incremento en la temperatura de desnaturalización $\Delta T_m/T_m$, en función de la concentración de iones añadidos en mM. Luego, se realizó un ajuste no lineal de estos datos utilizando el *software* Origin 9.1 (Origin Lab) con la siguiente ecuación:

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

Ecuación 5. ΔT_m es el cambio en el punto medio de la temperatura de desnaturalización, T_m es la temperatura de desnaturalización en presencia de ligando o catión, $(T_m)_0$ es la temperatura de desnaturalización en ausencia de ligando o catión, R es la constante de los gases, ΔH_0 es el cambio de entalpía en la desnaturalización de la proteína en ausencia de ligando, $[L]$ es la concentración del ligando o catión en molar, y K_D es la constante aparente de disociación del complejo proteína-ligando (ion) (Renart et al. 2010).

Esta ecuación se utiliza para determinar las constantes de disociación de los complejos proteína-ligando (ion) y, por lo tanto, evaluar la afinidad de los iones K^+ y Na^+ por el filtro de selectividad del canal iónico, que a su vez nos informan de la conformación adoptada por el mismo.

3.6 Reconstitución de la proteína en liposomas.

Reconstituir una proteína de membrana consiste en devolverla desde su forma solubilizada en detergente a su forma o función original, en este caso en una membrana lipídica artificial.

Los liposomas se crean cuando se hidratan láminas lipídicas finas y los apilamientos de bicapas cristalinas líquidas se fluidifican e hinchan. Durante la agitación, estas láminas lipídicas hidratadas se desprenden y se autocierrea formando vesículas multilamelares grandes (MLVs), las cuales evitan la interacción del agua con el núcleo hidrocarbonado de la bicapa en sus bordes. Una vez formadas estas estructuras, es necesario aplicar energía para reducir su tamaño, lo cual se puede lograr mediante sonicación (energía sónica) o extrusión (energía mecánica). La técnica de extrusión de lípidos implica pasar la suspensión de MLVs a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro específico, produciendo partículas cuyo diámetro es cercano al del poro del filtro empleado. La extrusión a través de filtros con poros de 100 nm típicamente resulta en vesículas unilamelares grandes (LUVs) (Lasic 1988).

Para reconstituir a KirBac F101W, se empleó asolectina (Avanti Polar Lipids), un extracto lipídico de soja compuesto por un 45,7% de fosfatidilcolina (PC), 22,1% de fosfatidiletanolamina (PE), 18,4% de fosfatidilinositol (PI), 6,9% de ácido fosfatídico (PA) y un 6,9% de otro componente desconocido. Se utilizó un extrusor Liposofast (figura 8) para conseguir vesículas unilamelares a partir de un stock de MLVs de asolectina ya preparados con anterioridad en el grupo y conservados en $N_2(l)$. Después de la extrusión, el volumen se ajustó a 12 mL utilizando un tampón 10 mM HEPES, 150 mM KCl, pH 7 y se añadió detergente DDM en una relación molar de 0,8 de detergente por cada mol de lípido, para solubilizar la asolectina y facilitar así la incorporación de la proteína a la membrana. En este punto, la proteína purificada solubilizada en DDM se agregó lentamente a la muestra gota a gota mientras se agitaba vigorosamente con un vortex. Luego, se diluyó la muestra a un volumen total de 25 mL en el mismo tampón y se dejó en agitación constante durante 30 minutos.



Figura 8. Imagen del extrusor (Liposofast), empleado en la obtención de los LUVs con tampón 10 mM HEPES, 150 mM KCl a pH 7.

Para eliminar el detergente y obtener así liposomas, se utilizó el método de las bio-beads, partículas de poliestireno que adsorben detergente en su superficie. Antes de su uso, las bio-beads se sometieron a un proceso de preparación mediante lavado de la siguiente manera. Se tomaron 2-4 gramos de bio-beads y se lavaron en tubos cónicos de 15 mL. Se realizaron varios ciclos de lavado con diferentes solventes: metanol se usó primero y se agitó en un vórtex durante 5 minutos. Luego, se lavaron dos veces con etanol y dos veces con agua, repitiendo el proceso de agitación. Finalmente, se lavaron dos veces con el tampón mencionado en el párrafo anterior.

Una vez que el detergente se eliminó completamente, las bio-beads se retiraron por decantación, lo que resultó en la obtención de proteína reconstituida en vesículas lipídicas. Para concentrar y eliminar cualquier residuo soluble, se centrifugó esta mezcla durante 65 minutos a 60.000 rpm utilizando el rotor T-70 a una temperatura de 4 °C. Luego, se dividió en alícuotas de 40 µL cada una y se almacenaron a -80 °C (Poveda et al. 2019).

En este proceso, se obtuvieron un total de 8 alícuotas, cada una con una relación en masa de lípido a proteína de 50:1.

3.7 Ensayo de actividad mediante sondas fluorescentes.

El propósito de este ensayo, el cual se esquematiza en la figura 9, es medir la actividad del canal mediante la monitorización de la fluorescencia de la sonda ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina). Para ello se crea un gradiente de K^+ , con K^+ en el interior del liposoma y el catión NMDG⁺ (N-Metil-D-Glucamina) en el exterior, el cual no permea a través del canal. En el caso de estar ante un canal selectivo a K^+ , este ion saldrá del liposoma a través del mismo. Para contrarrestar el gradiente de carga generado por la salida de K^+ , se emplea el protonóforo CCCP (Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona), que permite el flujo de protones hacia el interior del liposoma. Al ser la sonda ACMA sensible a protones, su fluorescencia se verá disminuida por el flujo de estos.

La reducción de la fluorescencia de la sonda es la que se mide para determinar si el canal presenta actividad, siendo inversamente proporcionales. Es decir, a mayor reducción de la fluorescencia, mayor cantidad de protones habrán ingresado en el liposoma, ya que habría una gran permeación de K^+ hacia el exterior, por lo que el canal presentaría actividad. En el caso de que no se observara disminución en la fluorescencia significaría que no existe actividad por parte de la proteína.

Como control positivo y para establecer el 100% de flujo de potasio, se emplea valinomicina. Este compuesto es un dodecadepsipéptido natural que se añade para permitir el flujo de K^+ independiente del canal a testar (Su et al. 2016; Matamoros and Nichols 2021; Jin et al. 2022; Black et al. 2020; Amani et al. 2003).

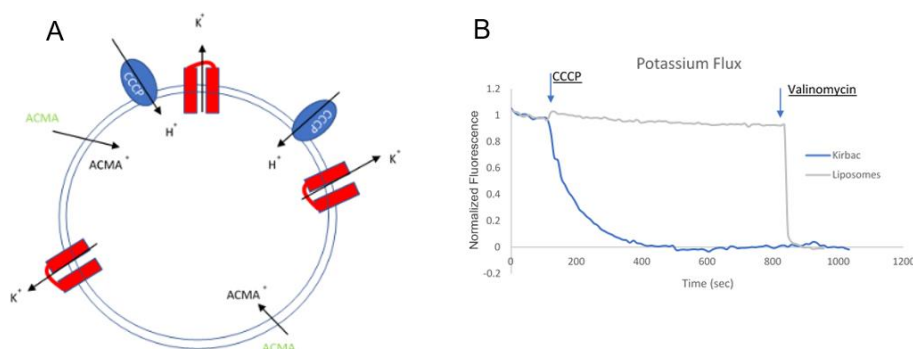


Figura 9. A): Esquema de los procesos que ocurren en el liposoma durante el ensayo de actividad mediante sondas fluorescentes. B) Gráfica que representa la fluorescencia medida conforme avanza el ensayo, tanto en liposomas sin canal como control negativo (liposomas), como con liposomas que contienen el canal reconstituido (KirBac).

Para realizar este ensayo, en primer lugar, se prepararon dos soluciones stock: una de ACMA a una concentración de 3,87 mM en 1,5 mL de metanol (MeOH) y otra de CCCP a una concentración de 11,6 mM en 0,63 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Estas soluciones se almacenaron en el refrigerador. A continuación, se descongeló una alícuota de KirBac F101W reconstituido en liposomas a 37°C durante 30 minutos y luego se dejó a temperatura ambiente. Estos liposomas estaban preparados en un tampón que contenía 10 mM de HEPES a pH 7 y 100 mM de KCl, y debido a su alta concentración, se sometieron a sonicación en baño durante 60 segundos para facilitar su dispersión.

Después de la sonicación, los liposomas se diluyeron a una concentración de 0,25 mg/mL en diferentes tampones para crear un gradiente de iones. Estos tampones fueron HEPES-200 mM Na⁺ a pH 7, HEPES-200 mM de NMDG⁺ a pH 7 y en ácido succínico y 200 mM de NMDG⁺ a pH 4. Luego, se prepararon las diluciones necesarias para las muestras que se medirían en el fluorímetro. Se agregaron 2 µL de ACMA a 1 mL de cada tampón comentado previamente y se agitaron en un vortex inmediatamente después de la dilución. De manera similar, se preparó una solución de CCCP agregando 1 µL de CCCP a 1 mL de cada tampón y se agitaron en el vortex. Para la dilución de la proteína, se añadieron 5,2 µL de proteína (con una relación en masa de lípido a proteína de 50:1) a 200 µL de cada uno de los tampones.

Una vez que se prepararon estas tres diluciones (ACMA, CCCP y KirBac F101W), se procedió a medir la actividad mediante la monitorización de la fluorescencia. En una cubeta de fluorescencia de 0,5 mm, se agregaron 200 µL de cada tampón por separado (HEPES-Na⁺ 200 mM a pH 7, o HEPES-NMDG⁺ 200 mM a pH 7, o ácido succínico y NMDG⁺ 200 mM a pH 4), 100 µL de la dilución de ACMA y 100 µL de la dilución de KirBac F101W en el tampón correspondiente con una relación en masa de lípido a proteína de 50:1.

La fluorescencia se midió utilizando un espectrofluorímetro SLM con ranuras de excitación y emisión en 2/2 y 4/4, respectivamente, sin polarizadores. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 410 y 490 nm. Se registró la señal cada dos segundos con un tiempo de integración de un segundo. Una vez que el fluorímetro estuvo listo, se introdujo la cubeta con la muestra. Al inicio del ensayo, se observó una evolución lineal de la fluorescencia. Cuando alcanzó una cierta estabilidad, se añadieron 50 µL de CCCP en el tampón correspondiente a la cubeta, lo que resultó en una disminución significativa de ésta debido a la dilución. A continuación, se observó una disminución exponencial de la fluorescencia debido a la actividad de la proteína. Finalmente, una vez que se estabilizó nuevamente, se añadieron 0,13 µL de valinomicina (1 mM en etanol) como control positivo y para calcular el 100% de flujo.

4. Resultados:

Como se mencionó en la introducción, a pH 7 KirBac 1.1 está abierto y a pH 4 está cerrado. En los siguientes experimentos se estudiará la interacción de KirBac F101W ante diferentes concentraciones de iones, concretamente K^+ y Na^+ y a estos dos pHs para obtener datos sobre las conformaciones adoptadas por el SF del canal en estado abierto y cerrado (Giudici et al. 2019; Renart et al. 2023, 2020). La idea es comparar el comportamiento de este mutante con el nativo para evaluar el impacto de la mutación introducida y su posible uso como sensor de la conformación del SF del canal.

4.1 Caracterización estructural de KirBac F101W.

Tras la purificación de KirBac F101W se cuantificó el rendimiento del proceso, el cual fue de 0,44 mg por cada litro de cultivo. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% y una tinción con azul de Coomassie para poder visualizar bien las bandas correspondientes de la proteína. Se visualizó una banda principal de 38,8 kDa (figura 10) que corresponde al peso molecular del monómero de KirBac F101W. También se observa una banda menos intensa de aproximadamente 78 kDa que corresponde al dímero de monómero. La menor intensidad de esta banda se debe a que el tetrámero no resiste al SDS y se rompe, lo cual es común en proteínas oligoméricas (Wang et al. 2009).

Para asegurar el estado tetramérico de la proteína se realizó una cromatografía de filtración en gel (Superdex 200 Increase 10/300 GL) y se observó que la proteína eluía en un solo pico, correspondiente al peso molecular del tetrámero (resultados previos en el laboratorio).

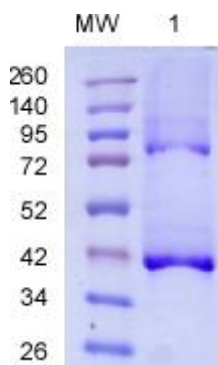


Figura 10. SDS-PAGE de las fracciones de KirBac F101W obtenidas en su purificación. En la primera calle por la izquierda se encuentra el marcador de peso molecular (MW). En la calle marcada como "1", la fracción de la proteína obtenida en la cromatografía de afinidad. La banda de peso molecular 38,8 kDa pertenece al monómero.

4.1.1 Caracterización de la estructura terciaria de KirBac F101W por estudio mediante emisión de fluorescencia intrínseca.

El monitoreo de la fluorescencia intrínseca de la proteína ante diferentes condiciones de pH y diversas concentraciones de iones permite hacer una caracterización de su estructura terciaria, como se ha reportado para el canal KcsA (Renart et al. 2010).

Siguiendo los pasos explicados en el apartado correspondiente de materiales y métodos, se analiza la emisión de fluorescencia, De esta forma se obtiene información de la estructura terciaria general de la proteína, especialmente de la región C-terminal donde se encuentran los 7 triptófanos nativos, y del SF, región adyacente a la que contiene la mutación (triptófano mutado adicional).

4.1.1.1 Espectros de KirBac F101W.

Los espectros se realizaron a pH 7 y 4 para tener el canal en conformación abierta o cerrada respectivamente. También se usarán altas y bajas concentraciones de cada ion (KCl y NaCl) para evaluar su impacto en la conformación del SF del canal. En la figura 11, se muestran los espectros de emisión de fluorescencia a pH 7 (paneles A, B y C) y a pH 4 (paneles D, E y F). Las gráficas A y D muestran las condiciones de alta y baja concentración de NaCl, mientras que B y E corresponden a alta y baja concentración de KCl. Las gráficas C y F muestran ambos iones a alta concentración (500 mM).

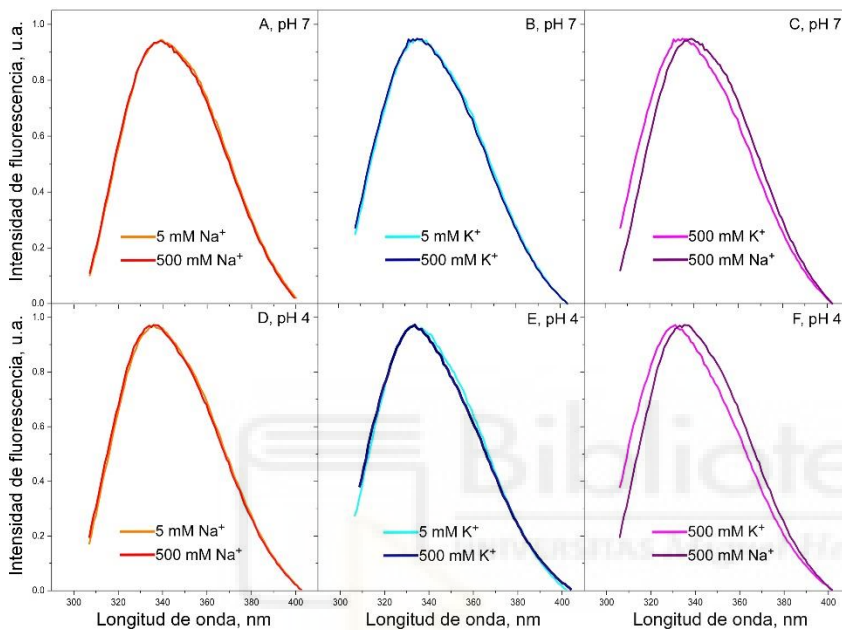


Figura 11. Espectros de emisión de fluorescencia normalizados para KirBac F101W a pH 7 y pH 4 y distinta concentración de iones Na⁺ y K⁺.

En esta figura se puede observar la similitud de los espectros a baja y alta concentración de K⁺ y Na⁺ independientemente del pH (gráficas A, B, D y E), lo que ya se había visto en el canal silvestre en estudios anteriores. Sin embargo, se observan diferencias entre los espectros en Na⁺ y K⁺ tanto a pH 7 como 4 (gráficas C y F), lo que supone una novedad frente al canal WT donde esta variación no era apreciable y que ahora sí lo es gracias a la mutación realizada en KirBac F101W.

Por otro lado, también se compararon los espectros de fluorescencia intrínseca a una misma concentración de cada ion (5 o 500 mM) a pH 7 y a pH 4, representado en la figura 12.

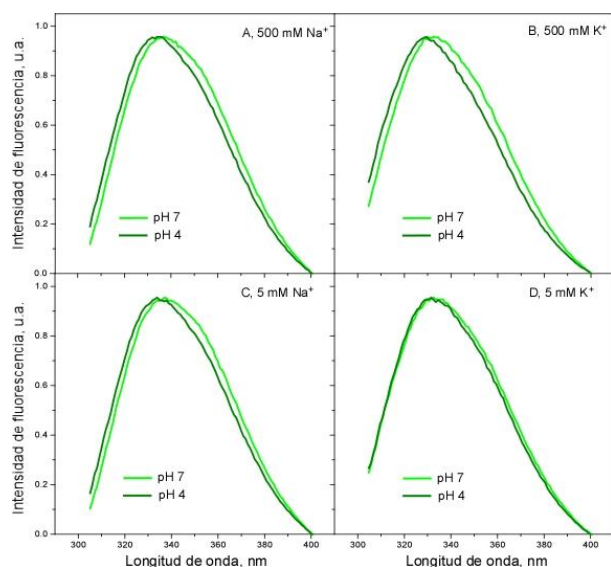


Figura 12. Espectros de emisión de fluorescencia normalizados para KirBac F101W a altas y bajas concentraciones de KCl y NaCl a pH 4 y pH 7.

En todas las gráficas de esta figura se aprecia que los espectros a pH 4 y pH 7 se encuentran desplazados entre sí, estando siempre la de pH 4 más al azul, al igual que pasaba con el canal WT, indicativo de que los triptófanos colocados en el C-terminal son sensibles a la apertura de la compuerta interna del canal.

Para cuantificar los cambios en los espectros, se comparan los centros de masas de estos. El centro de masa se define como el punto promedio del espectro, medido por la intensidad de la señal de cada longitud de onda. Por tanto, el punto central promedio se determina considerando la distribución de intensidad del espectro al completo (Skoog et al. 2017).

En la tabla 1 se muestran los valores de los centros de masa calculados. Se puede observar que estos no varían al aumentar la concentración de ion a un mismo pH. Sin embargo, sí que se observa un desplazamiento hacia el azul en el centro de masas de aproximadamente 1 a 1,5 nm a pH 4 con respecto a pH 7, siendo esta variación independiente de si el ion es Na^+ o K^+ . Estos resultados concuerdan con lo estudiado para el canal WT. Asimismo, también se aprecia un desplazamiento de aproximadamente 2 nm hacia el azul entre los centros de masa de los espectros cuando está en K^+ respecto a Na^+ a un mismo pH, lo que no se vio en el canal nativo y por tanto siendo consecuencia de la mutación añadida.

Na^+ (mM)	pH 7	pH 4	K^+ (mM)	pH 7	pH 4
5	346,8	345,1	5	344,6	343,7
500	346,4	344,9	500	344,7	343,1

Tabla 1. Centros de masas (nm) de los espectros de emisión de fluorescencia de las Figuras 11 y 12 de KirBac F101W.

4.1.2 Monitorización de la desnaturalización térmica mediante la intensidad de fluorescencia de KirBac F101W.

Como se comentó en el apartado de Materiales y Métodos 3.5, la temperatura de desnaturalización o t_m , ofrece información sobre la estabilidad térmica del canal en las condiciones del estudio. A mayor valor de t_m , más estable será el canal, ya que hará falta un incremento mayor en la temperatura para desnaturalizarlo. El aumento en la estabilidad y por tanto el valor de t_m está influenciado por la presencia en el medio de iones que son capaces de unirse al SF del canal e interactuar con las cuatro subunidades del mismo, influyendo en el proceso de despliegue y disociación térmica.

En la figura 13 se muestran los datos normalizados de los cambios en la emisión de fluorescencia intrínseca de KirBac F101W en función del aumento de la temperatura bajo diferentes condiciones de pH y misma concentración de ion (150 mM K^+ o 150 mM Na^+) respectivamente. Para el ion K^+ , el valor de la t_m del canal a pH 4 es de 56°C mientras que a pH 7 es de 73°C . En el caso del ion Na^+ , a pH 4 presenta una t_m de 65°C y a pH 7 es de 59°C . Se observa que la estabilidad se invierte respecto al pH cuando se compara Na^+ y K^+ . Para K^+ el canal es más estable a pH 7 y para Na^+ a pH 4, ya que respectivamente presentan los mayores valores de t_m , lo que indica una interacción muy diferente para ambos iones con el SF según el canal está abierto o cerrado.

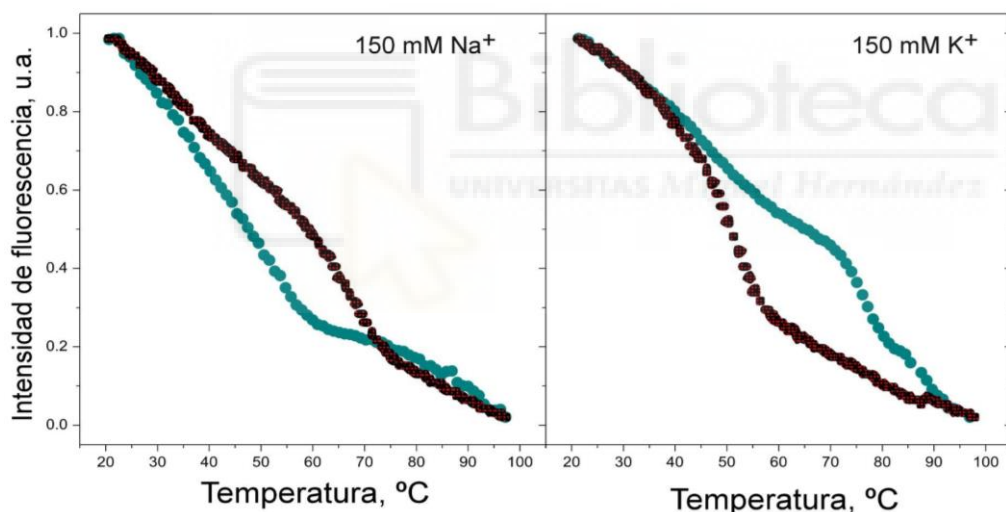


Figura 13. Monitorización por fluorescencia de la desnaturalización térmica de KirBac F101W a pH 7 (color azul) y pH 4 (color negro), en 150 mM KCl y 150 mM NaCl .

4.1.2.1 Efecto de iones K^+ y Na^+ a pH 4.

Los iones Na^+ y K^+ compiten por la unión al SF del canal en mayor o menor medida dependiendo de la concentración del ion contrario que se encuentre en el medio. Es decir, la adición de un ion al entorno del canal condiciona la unión del ion contrario, pudiendo ser desplazado.

En la figura 14 se muestra la desnaturalización térmica a pH 4 (estado cerrado) de KirBac F101W a concentraciones crecientes de los iones K^+ o Na^+ respectivamente, con la finalidad de estudiar si es posible cuantificar la unión de estos iones al SF del canal. Las curvas de las gráficas A, B y C representan concentraciones crecientes del ion K^+ (5, 50 y 150 mM) bajo una condición fija de concentración del ion Na^+ (0, 5 y 150 mM), para así poder determinar la posible unión de K^+ . Por otro

lado, en las gráficas D, E y F se representa la situación contraria, para determinar la posible unión de Na^+ . Las curvas en este caso representan concentraciones crecientes del ion Na^+ (5, 50 y 150 mM) bajo una condición fija de K^+ (0, 5 y 150 mM).

En la gráfica A se puede confirmar que existe unión de K^+ cuando la condición inicial de Na^+ es 0, de manera que cuando la concentración de K^+ es la mayor, también lo es la estabilidad térmica del canal. Sin embargo, al aumentar la concentración de Na^+ en el medio (gráficas B y C) ya no se aprecia esta unión de K^+ , lo que indica una pérdida de afinidad aparente ya que este ion no ejerce efecto sobre la estabilidad del canal, como se puede apreciar observando las t_m , las cuales son muy similares. Esto es debido a que el Na^+ está compitiendo y logra desplazar al K^+ .

En el caso de las gráficas D, E y F, existe unión de Na^+ , ya que la estabilidad térmica del canal es mayor cuanto más grande es la concentración de Na^+ añadida. Puesto que la presencia de K^+ no parece alterar demasiado el cambio inducido por el Na^+ , parecería que el canal tiene una mayor afinidad por Na^+ que por K^+ en esta condición.

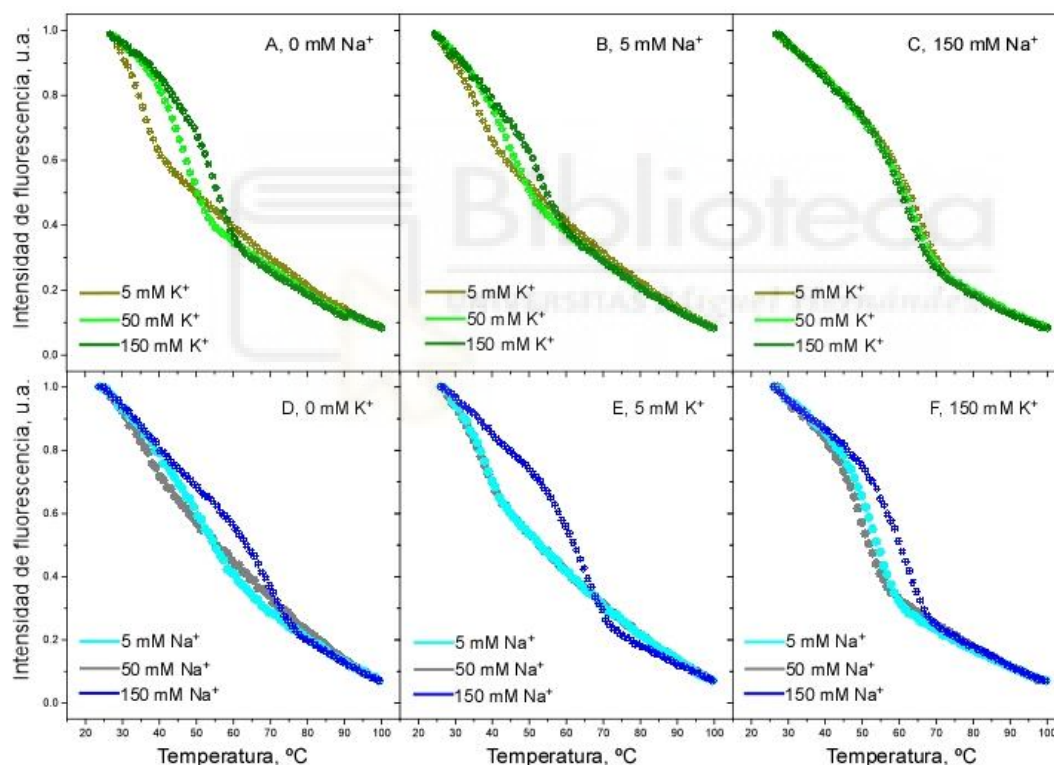


Figura 14. Se muestran los datos normalizados de los cambios en la emisión de fluorescencia intrínseca de KirBac F101W debido a la desnaturalización térmica en función del aumento de la temperatura a diferentes concentraciones de KCl y NaCl a pH 4.

4.1.2.2 Efecto de iones K^+ y Na^+ a pH 7.

En la figura 15 se muestra el mismo ensayo comentado anteriormente, es decir, la desnaturalización térmica de KirBac F101W a concentraciones crecientes de los iones K^+ o Na^+ respectivamente, pero esta vez a pH 7, con el canal abierto. Las curvas de las gráficas A, B y C representan concentraciones crecientes del ion K^+ (5, 50 y 150 mM) bajo una condición fija de concentración del ion Na^+ (0, 5 y 150

mM), para así poder determinar la posible unión de K^+ . Por otro lado, en las gráficas D, E y F se representa la situación contraria, para determinar la posible unión de Na^+ . Las curvas en este caso representan concentraciones crecientes del ion Na^+ (5, 50 y 150 mM) bajo una condición fija de K^+ (0, 5 y 150 mM).

En las gráficas A, B y C se confirma que existe unión de K^+ cuando la concentración inicial de Na^+ es baja (0 y 5 mM), sin embargo, se observa una pérdida aparente de la afinidad por este ion cuando se aumenta la concentración inicial de Na^+ (gráfica C). Esto aparentemente se produce porque el Na^+ podría competir y desplazar al K^+ . Además, tanto Na^+ como K^+ estabilizan al canal, por lo que al unirse el Na^+ y sustituir al K^+ , la estabilidad no aumenta, pero tampoco se ve afectada.

Por último, en el caso de las gráficas D, E y F no existe unión de Na^+ independientemente de la concentración de K^+ inicial, ya que la adición de este ion no induce un aumento de la estabilidad de la proteína en ningún caso.

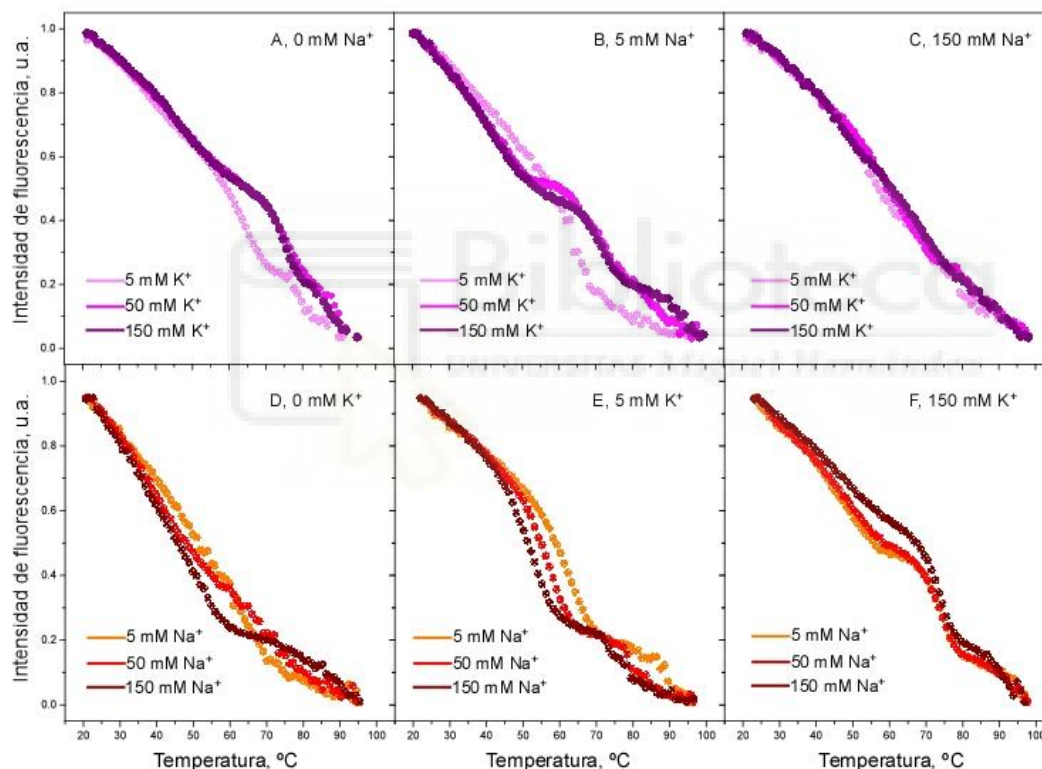


Figura 15. Se muestran los datos normalizados de los cambios en la emisión de fluorescencia intrínseca de KirBac F101W debido a la desnaturalización térmica en función del aumento de la temperatura a diferentes concentraciones de KCl y NaCl a pH 7.

4.1.3 Unión de iones Na^+ y K^+ al canal a pH 7 y pH 4.

Con este ensayo, y previa confirmación de que los iones inducen cambios en la estabilidad térmica de KirBac F101W, se pretende cuantificar la afinidad de la unión de los iones Na^+ y K^+ por el SF de la proteína, y por tanto obtener información sobre su conformación cuando la proteína está abierta o cerrada (pH 7 y 4 respectivamente). Los resultados de los ensayos de estabilización térmica sobre el canal KirBac F101W se muestran en las siguientes figuras 16 y 17.

En la figura 16, se representa en las gráficas A y C, las t_m respecto a la concentración del ion K^+ en diferentes condiciones iniciales de Na^+ (0, 5 y 150 mM) a pH 4 y 7 respectivamente.

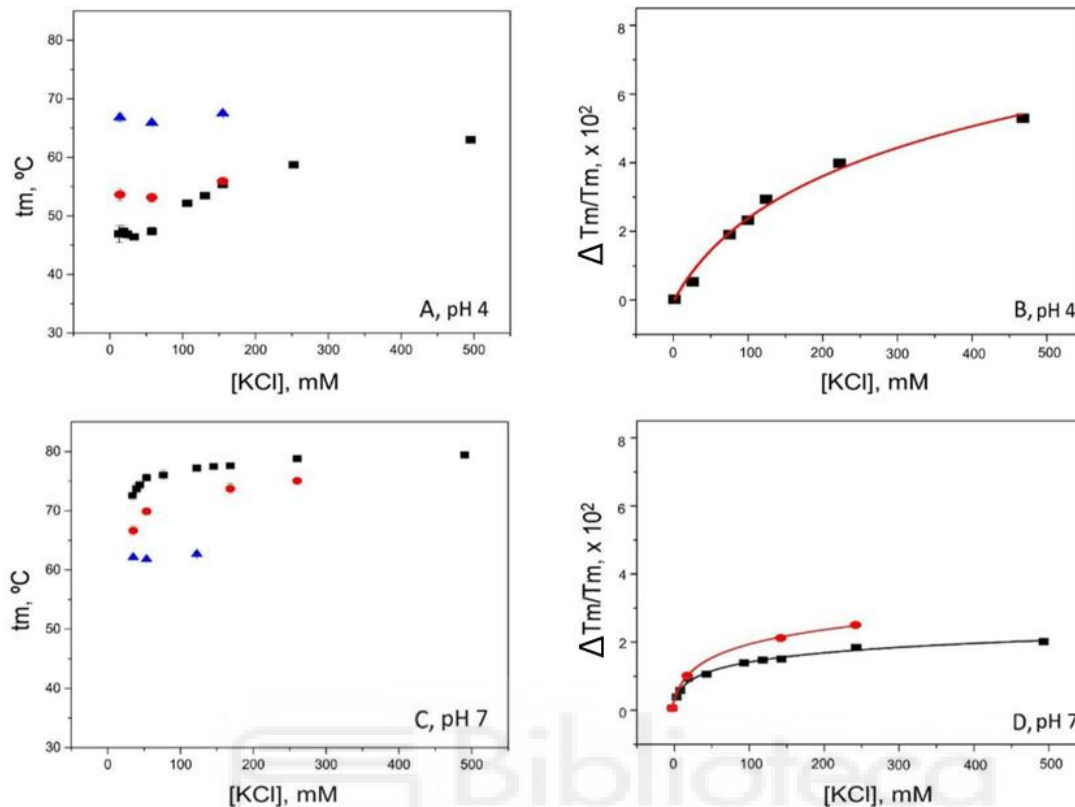


Figura 16. Estabilidad térmica de KirBac F101W dependiendo de la concentración de KCl, a pH 7 y a pH 4. A y C representan la t_m (temperatura media de desnaturalización) del canal en función de la concentración de K^+ . Los resultados experimentales son la media de las t_m (en Celsius) \pm SD (desviación estándar) en cada concentración de catión. B y D expresan el ajuste matemático de los datos experimentales obtenidos de A y C a la Ecuación 5. Las líneas continuas muestran el mejor ajuste matemático no lineal de los puntos experimentales. Se muestra la unión de K^+ en diferentes condiciones iniciales de Na^+ , 0 mM (■), 5 mM (●) y 150 mM (▲). A partir de estos datos se obtienen las constantes de disociación (K_D) recogidas en la tabla 2.

A pH 7 (gráfica C) se observa un aumento en la estabilidad térmica del canal, lo cual se refleja en el aumento del valor para las t_m a medida que se aumenta la concentración del ion K^+ , en los casos en los que la condición inicial de Na^+ es 0 mM y 5 mM. Para la concentración mayor de Na^+ inicial, las t_m se mantienen prácticamente constantes independientemente de la concentración de K^+ añadido, lo que sugiere que no habría unión de este ion, debido a la competencia del Na^+ . Sin embargo, a pH 4 (gráfica A) se aprecia una disminución en la estabilidad térmica del canal respecto a pH 7, ya que en este caso, las t_m alcanzadas tras la adición de K^+ alcanzan valores más bajos. Además solo se observa unión de K^+ en la condición más baja de Na^+ inicial en el medio (0mM) con valores inferiores de las t_m conseguidas para el mismo ensayo realizado a pH 7. A este pH, conforme aumenta la concentración de Na^+ , se observa un menor efecto, lo que indica una pérdida de afinidad por el K^+ , debido a la competición del ion Na^+ .

En las gráficas B y D, se hizo un ajuste matemático de las t_m obtenidas a distintas concentraciones de ion con el fin de calcular los valores de las constantes de disociación aparente (K_D) para cada ion. Los valores de las K_D quedan recogidos en la tabla 2.

En la figura 17, se muestra lo mismo que en la figura comentada anteriormente, pero en este caso para la unión de Na^+ .

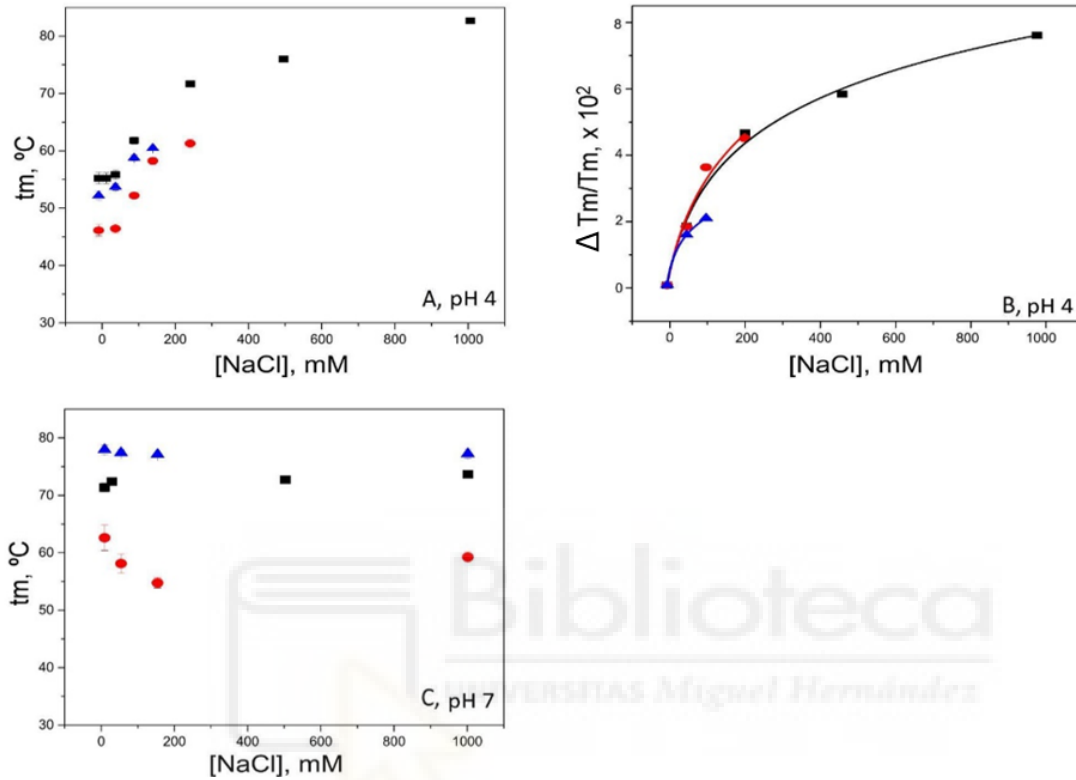


Figura 17. Estabilidad térmica de KirBac F101W dependiendo de la concentración de NaCl , a pH 7 y 4. A y C representan la t_m (temperatura media de desnaturalización) del canal en función de la concentración de Na^+ . Los resultados experimentales son la media de las t_m (en Celsius) \pm SD (desviación estándar) en cada concentración de catión. B expresa el ajuste matemático de los datos experimentales obtenidos de A a la Ecuación 5. Las líneas continuas muestran el mejor ajuste matemático no lineal de los puntos experimentales. Se muestra la unión de Na^+ en diferentes condiciones iniciales de K^+ , 0 mM (■), 5 mM (●) y 150 mM (▲). A partir de estos datos se obtienen las constantes de disociación (K_D) recogidas en la tabla 2.

A pH 7 (gráfica C) no se observa influencia en la adición de Na^+ sobre la estabilidad térmica del canal, como se puede ver reflejado en los valores de las t_m , las cuales permanecen prácticamente constantes o incluso disminuyen. Sin embargo, a pH 4 (gráfica A) existe un aumento en la estabilidad térmica del canal según se añade Na^+ , independientemente de la concentración inicial de K^+ . En la gráfica B, se muestra el ajuste matemático para las tres condiciones de K^+ inicial a pH 4, a partir de las cuales se calcularán las K_D que se muestran en la tabla 2.

K_D (mM)

	Unión K^+			Unión Na^+		
	0 mM Na^+	5 mM Na^+	150 mM Na^+	0 mM K^+	5 mM K^+	150 mM K^+
pH 4	$(9 \pm 2) \cdot 10^1$	-	-	$(9 \pm 1) \cdot 10^1$	$(0,9 \pm 3) \cdot 10^1$	$(5,9 \pm 0,2) \cdot 10^1$
pH 7	$8,0 \pm 0,8$	$11,1 \pm 0,7$	-	-	-	-

Tabla 2. Resumen de las constantes de afinidad y los errores del ajuste matemático resultantes de la unión de K^+ y Na^+ a pH 4 y pH 7 al canal KirBac F101W.

De esta tabla, podemos observar que a pH 7 el canal presenta afinidad por K^+ , pero no por Na^+ . Además, a este pH sólo se observa competición a una alta concentración de Na^+ . Sin embargo, a pH 4 hay un cambio sustancial en las afinidades del SF de KirBac F101W por ambos iones. A este pH los dos se unen al canal y aumentan su t_m , aunque en el caso de K^+ su afinidad es menor que a pH 7. En el caso del Na^+ parecería que tiene algo más de afinidad que por el K^+ en condiciones competitivas, puesto que obtenemos unión incluso a altas concentraciones de K^+ .

4.2 Caracterización funcional:

4.2.1 Ensayo de actividad con sonda fluorescente ACMA.

La reconstitución de KirBac F101W en liposomas se llevó a cabo mediante extrusión con el Liposofast tal y como se explicó en el apartado de materiales y métodos correspondiente.

En este estudio, se examina la función del canal iónico utilizando la fluorescencia como un marcador al establecer un gradiente de K^+ , con K^+ dentro de los liposomas y NMDG⁺ (N-metil-D-Glucamina), un catión que no puede atravesar el canal, en el exterior. Para contrarrestar este gradiente, se emplea el protonóforo CCCP. Cuando el canal selectivo a potasio está presente, el K^+ sale del liposoma y, simultáneamente, los protones ingresan para compensar el gradiente de carga generado, apagando la fluorescencia de la sonda ACMA que es sensible a protones. Por tanto, la bajada de fluorescencia y la actividad del canal son inversamente proporcionales ya que una pronunciada disminución en la fluorescencia indica un activo transporte de protones, es decir, un gran flujo de K^+ y aumento en la actividad del canal.

Para este ensayo se midió la actividad de la proteína con tres tampones externos: pH 7 con NMDG⁺, pH 7 con Na^+ , o bien pH 4 con NMDG⁺. En todos estos experimentos se usa una concentración de 100 mM de K^+ y pH 7 en el interior del liposoma.

Observando la figura 18 se concluye que la proteína presenta la máxima actividad a pH 7 con NMDG⁺, mientras que a pH 4 y NMDG⁺ la fluorescencia no decrece y por tanto no hay actividad. En el caso de pH 7 y Na^+ , existe una ligera bajada en la emisión de fluorescencia, ya que como se ha comentado a lo largo de todo el estudio, KirBac F101W también presenta cierta permeabilidad por el Na^+ . El Na^+ por tanto penetra en el liposoma y en el canal mientras que el K^+ sale y los protones entran para compensar la carga, presentando la proteína cierta actividad.

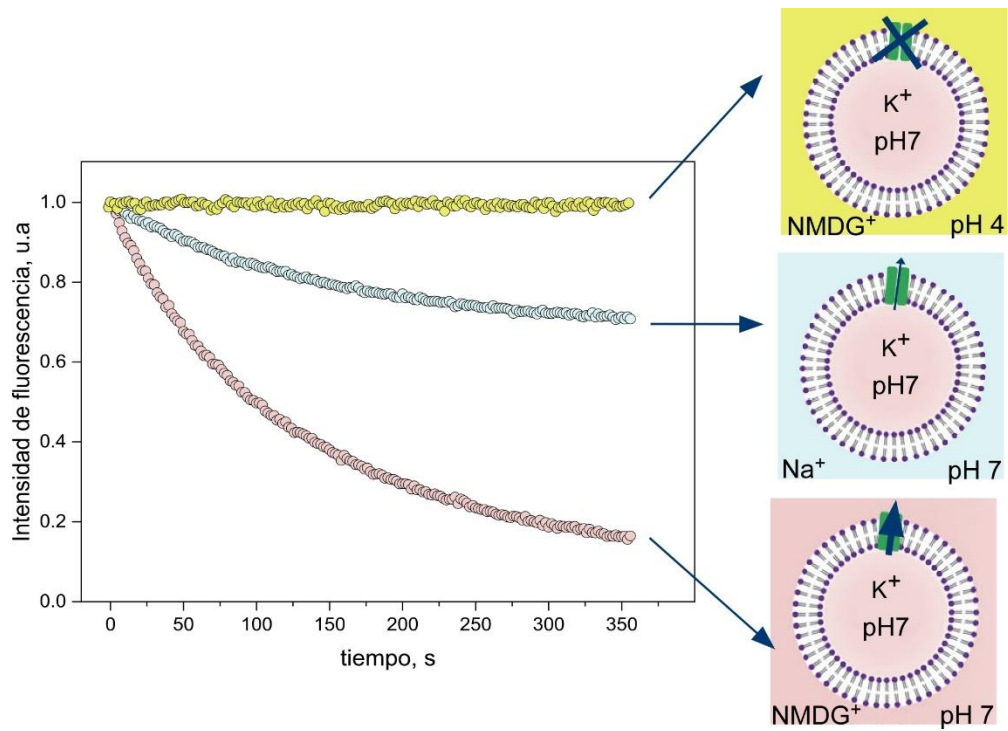
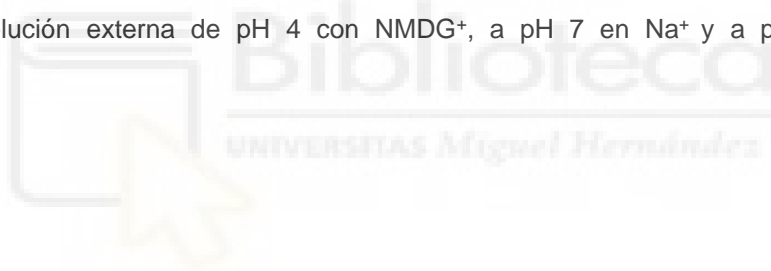


Figura 18. Ensayo de actividad de KirBac F101W mediante la monitorización de la fluorescencia de la sonda ACMA. En amarillo, azul y rosa se muestra la fluorescencia de la sonda cuando KirBac F101W está en una disolución externa de pH 4 con NMDG⁺, a pH 7 en Na⁺ y a pH 7 con NMDG⁺ respectivamente.



5. Discusión:

A lo largo de este trabajo se ha caracterizado estructural y funcionalmente el canal de potasio mutante KirBac F101W, el cual contiene una mutación de una fenilalanina por un triptófano en la posición 101 de la hélice del poro respecto al canal WT. El objetivo de realizar dicha mutación es determinar si se puede usar para medir los posibles cambios conformacionales del SF (región adyacente a la hélice del poro) a través de la monitorización de la fluorescencia de ese triptófano. El canal además presenta de forma nativa 7 triptófanos en el extremo C-terminal, que, junto al triptófano mutado, permiten medir mediante ensayos de fluorescencia los cambios conformacionales en la estructura de la proteína en condiciones de pH 4 y pH 7, que inducen el cierre y apertura del canal respectivamente, y con iones Na^+ y K^+ , no conductor y conductor respectivamente.

Las variaciones en la estructura terciaria de KirBac F101W fueron evaluadas mediante el análisis de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína, así como por ensayos de desnaturalización térmica, demostrándose que la unión de los distintos iones al filtro de selectividad modula cambios en su estructura que repercuten directamente en la estabilidad del canal.

En relación con el efecto que ejerce el pH sobre la estructura terciaria del canal, se observó un comportamiento similar al canal WT. Los centros de masas de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a pH 4 se encuentran desplazados hacia el azul entre 1 y 1,5 nm respecto a pH 7, cambio que se ha asociado a la apertura y cierre del canal que tiene lugar en el dominio C-terminal donde se encuentran los siete triptófanos nativos del canal, explicando por qué también se detecta este cambio en el canal silvestre (Enkvetchakul et al. 2004). Por otro lado, el resultado más relevante para esta memoria, y que confirma que la mutación introducida sirve de “reporter” de la conformación del SF, ya que no se pudo observar con el canal WT, es que se aprecia un desplazamiento de aproximadamente 2 nm hacia el azul de los centros de masa de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca en K^+ frente a Na^+ a un mismo pH. Estos iones se unirán al SF, próximo a la ubicación de la mutación en la hélice del poro de la proteína induciendo una conformación diferente. Este tipo de cambio con el ion presente en el filtro también ha sido observado en el canal KcsA a través de un triptófano localizado en una posición homóloga (Renart et al. 2010).

Respecto a la estabilización térmica del canal, KirBac F101W presenta un comportamiento similar al canal WT. La estabilidad se invierte respecto al pH cuando se compara Na^+ y K^+ . Para K^+ el canal es más estable a pH 7 (t_m de 73 °C) y para Na^+ a pH 4 (t_m de 65°C), lo que indica una interacción muy diferente para ambos iones con el SF según el canal está abierto o cerrado dependiendo del pH del medio.

A partir del ajuste matemático de los datos de desnaturalización térmica del canal a pH 4 y pH 7 en diferentes concentraciones de Na^+ y K^+ se calcularon las constantes de afinidad (K_D) por cada ion, manteniéndose de nuevo un comportamiento similar al WT. En cuanto al ion K^+ , la mejor afinidad en su unión se consigue a pH 7 y concentraciones bajas de Na^+ inicial ($K_D = (8,0 \pm 0,8)$ y $K_D = (11,1 \pm 0,7)$), mientras que a pH 4 se observa una reducción en la afinidad, y que sólo se da a 0 mM de Na^+ inicial ($K_D = (9 \pm 2) \cdot 10^1$). En el caso del Na^+ , a pH 7 no se observa que exista unión de este ion al canal independientemente de la concentración de K^+ inicial en el medio, mientras que a pH 4 sí en todos los

casos, si bien las constantes de afinidad son elevadas ($K_D = (9 \pm 1) \cdot 10^1$; $(0,9 \pm 3) \cdot 10^1$; $(5,9 \pm 0,2) \cdot 10^1$ en 0, 5 y 100 mM inicial de K^+ respectivamente). De estos datos, se deduce que a pH 4 ambos iones aparentemente competirán por los mismos sitios de unión al SF del canal, siendo el que más tendencia tendrá a unirse el Na^+ , ya que, aunque el ion K^+ esté presente en el medio, consigue unirse, aunque con baja afinidad, mientras que el K^+ cuando aumenta la concentración de Na^+ pierde la capacidad de unión. Por otro lado, a pH 7 únicamente se unirá el ion K^+ sin necesidad de competición. Como conclusión se extrae que las diferentes afinidades de unión de los iones dependiendo del pH del medio plantean una conformación diferente para el filtro de selectividad en K^+ respecto a Na^+ , pudiendo haber una pérdida de selectividad del canal hacia el K^+ a pH 4 respecto a pH 7.

Este tipo de comportamiento ya se vio para el canal nativo, y se ha interpretado como que a pH 7 el ion K^+ se deshidrataría al interactuar con las cuatro subunidades que conforman el SF, induciendo un estrechamiento en el mismo y provocando el aumento observado en la estabilidad del canal. Debido a esta deshidratación, el K^+ tendría menores dimensiones que el Na^+ hidratado, lo que, junto al estrechamiento del SF, explicarían que solo el K^+ se uniera sin existir competición. A ese pH el ion Na^+ no induciría este cambio y el SF se quedaría en una conformación más ancha pudiendo pasar este ion en su forma hidratada, pero sin interactuar con el canal, y, por ende, sin aumentar la estabilidad del mismo. Sin embargo, a pH 4 ambos iones inducirían dicho estrechamiento, aunque el Na^+ lo haría con algo más de eficacia que el K^+ en condiciones competitivas, permitiendo una mejor unión al SF del canal del primer ion.

Por último, en la caracterización funcional, mediante el ensayo de fluorescencia de la sonda ACMA, se determinó la actividad de KirBac F101W. La actividad observada fue similar a la del canal WT y mayor en K^+ que en Na^+ a pH 7, lo que indica que el primero pasa mejor que el segundo por el filtro del canal. A pH 4 no se registró actividad ya que a ese pH el canal está cerrado, también como ocurre en el nativo.

6. Conclusiones y proyección futura:

KirBac F101W ha sido expresado y purificado con éxito, mostrándose como un mutante estable. A nivel funcional, se comporta como el canal WT, cerrado a pH 4 y por tanto sin actividad, y abierto a pH 7, con más facilidad para el paso de iones K^+ que de Na^+ . Estructuralmente también es equivalente al canal WT.

Las t_m indicaron que la estabilidad del canal es mayor a pH 4 en Na^+ y a pH 7 en K^+ . El aumento en la estabilidad de la proteína se debe a las interacciones que se producen entre las 4 subunidades que conforman el SF del canal y los iones durante el ajuste inducido. Este ajuste o estrechamiento a las medidas exactas del ion, que discrimina cuál puede interaccionar, es dependiente del estado abierto o cerrado de la compuerta interna del canal (dominio C-terminal) que está regulada por el pH de medio (a pH 4 está cerrada y a pH 7 está abierta). Existe por tanto una regulación alostérica entre el dominio C-terminal del canal (compuerta interna) y el SF (compuerta externa).

Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca son sensibles al pH del medio, desplazándose hacia el azul a pH 4 respecto a pH 7, como pasaba en el canal WT. Este resultado se refiere al cambio conformacional de apertura o cierre de la compuerta interna del canal que depende del pH. Este cambio conformacional ha sido medido gracias a la emisión de fluorescencia de los 7 triptófanos presentes de manera nativa en el dominio C-terminal de KirBac F101W.

Por último, se observó que los espectros de emisión de fluorescencia también son sensibles al ion presente en el medio (Na^+ y K^+). Este es el resultado más relevante para la memoria, ya que confirma que la mutación que fue realizada en KirBac F101W, con el objetivo de monitorizar cambios en los estados del SF del canal, cumple su función. La mutación realizada fue la sustitución de una fenilalanina por un triptófano en la posición 101, concretamente en la hélice del poro del canal que está próxima al SF. Las variaciones en la emisión de fluorescencia de este triptófano mutado indican que el SF del canal cambia su conformación, según el SF contenga iones Na^+ o K^+ .

En estudios futuros, y ya que la mutación realizada es exitosa, proporcionando información que no se pudo observar con el canal WT, se pretende sustituir los 7 triptófanos presentes en el dominio C-terminal del canal a fenilalanina, para que la monitorización de la señal de fluorescencia provenga únicamente del triptófano 101 mutado. De esta manera se obtendrá información exclusivamente de la región del SF del canal. Otro enfoque es mutar el resto de las fenilalaninas de la hélice del poro del canal KirBac 1.1 (F102 y F103) a triptófanos para determinar si estos residuos también actúan de "reporters" de las conformaciones del filtro de selectividad de la proteína, de la misma forma que se hizo en el presente trabajo con la mutación F101W.

7. Bibliografía:

- Amani, R., Borcik, C. G., Khan, N. H., Versteeg, D. B., Yekefallah, M., Do, H. Q., Coats, H. R., & Wylie, B. J. (2003). Conformational Changes upon Gating of KirBac1.1 into an Open-Activated State Revealed by Solid-State NMR and Functional Assays. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915010117/-/DCSupplemental>.
- Black, K. A., He, S., Jin, R., Miller, D. M., Bolla, J. R., Clarke, O. B., Johnson, P., Windley, M., Burns, C. J., Hill, A. P., Laver, D., Robinson, C. V., Smith, B. J., & Gulbis, J. M. (2020). A Constricted Opening in Kir Channels Does Not Impede Potassium Conduction. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16842-0>.
- Chen, F., Steele, D., & Fedida, D. (1997). Allosteric Effects of Permeating Cations on Gating Currents during K Channel Deactivation. *J Gen Physiol*, 110(2). doi: 10.1085/jgp.110.2.87.
- Cheng, W.L., Enkvetchakul, D., & Nichols, C.G. (2009). KirBac1.1: It's an Inward Rectifying Potassium Channel. *Journal of General Physiology*, 133(3), 295–305. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810125>.
- Cuello, L. G., Cortes, D. M., Jogini, V., Sompornpisut, A., & Perozo, E. (2010). A Molecular Mechanism for Proton-Dependent Gating in KcsA. *FEBS Letters*, 584 (6), 1126–32. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.003>.
- Enkvetchakul, D., Bhattacharyya, J., Jeliaskova, I., Groesbeck, D. K., Cukras, C. A., & Nichols, C. G. (2004). Functional Characterization of a Prokaryotic Kir Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 47076–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400417200>.
- Giudici, A. M., Renart, M. L., Díaz-García, C., Morales, A., Poveda, J. A., & González-Ros, J. M. (2019). Accessibility of Cations to the Selectivity Filter of KcsA in the Inactivated State: An Equilibrium Binding Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030689>.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & Mackinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ Channel Signature Sequence. *Biophysical Journal* 66(4). doi: 10.1016/S0006-3495(94)80887-2.
- Hellgren, M., Sandberg, L., & Edholm, O. (2006). A Comparison between Two Prokaryotic Potassium Channels (KirBac1.1 and KcsA) in a Molecular Dynamics (MD) Simulation Study. *Biophysical Chemistry*, 120(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2005.10.002>.
- Hoshi, T., & Armstrong, C. M. (2013). C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels: Pore constriction or dilation? *Journal of General Physiology* 141(2). <https://doi.org/10.1085/jgp.201210888>.
- Jin, R., He, S., Black, K. A., Clarke, O. B., Wu, D., Bolla, J. R., Johnson, P., Periasamy, A., Wardak, A., Czabotar, P., Colman, P. M., Robinson, C. V., Laver, D., Smith, B. J., & Gulbis, J. M. (2022). Ion Currents through Kir Potassium Channels Are Gated by Anionic Lipids. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28148-4>.
- Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., & Doyle, D. A. (2003). Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. *Science* 300(5627). doi: 10.1126/science.1085028.
- Lasic, D. D. (1988). The Mechanism of Vesicle Formation. *Biochemical Journal* (Vol. 256).

- Matamoros, M., & Nichols, C. G. (2021). Pore-Forming Transmembrane Domains Control Ion Selectivity and Selectivity Filter Conformation in the Kirbac1.1 Potassium Channel. *Journal of General Physiology*, 153(5). <https://doi.org/10.1085/jgp.202012683>.
- Mazia, C. (2017). *Miastenia Gravis y Problemas Relacionados*. ISBN N° 978-950-555-452-2. Publisher: Editorial Inter- Médica S.A.I. C.I.
- Mironenko, A., Zachariae, U., de Groot, B. L., & Kopec, W. (2021). The Persistent Question of Potassium Channel Permeation Mechanisms. *Journal of Molecular Biology* 433(17). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167002>.
- Montoya, E., Lourdes Renart, M., Marcela Giudici, A., Poveda, J. A., Fernández, A. M., Morales, A., & González-Ros, J. M. (2017). Differential Binding of Monovalent Cations to KcsA: Deciphering the Mechanisms of Potassium Channel Selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1859(5). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.014>.
- 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>.
- 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., & González-Ros, J. M. (2012). Contribution of Ion Binding Affinity to Ion Selectivity and Permeation in KcsA, a Model Potassium Channel. *Biochemistry*, 51(18). <https://doi.org/10.1021/bi201497n>.
- Renart, M. L., Triano, I., Poveda, J. A., Encinar, J. A., Fernández, A. M., Ferrer-Montiel, A. V., Gómez, J., & González Ros, J. M. (2010). Ion Binding to KcsA: Implications in Ion Selectivity and Channel Gating. *Biochemistry*, 49(44). <https://doi.org/10.1021/bi101235v>.
- Renart, M. L., Barrera, F. N., Molina, M. L., Encinar, J. A., Poveda, J. A., Fernández, A. M., Gómez, J., & González-Ros, J. M. (2006). Effects of Conducting and Blocking Ions on the Structure and Stability of the Potassium Channel KcsA. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40). <https://doi.org/10.1074/jbc.M602636200>.
- 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>.
- 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21072554>.
- Renart, M. L., Giudici, A. M., González-Ros, J. M., & Poveda, J. A. (2024). Steady-State and Time-Resolved Fluorescent Methodologies to Characterize the Conformational Landscape of the Selectivity Filter of K⁺ Channels. *Methods*, 225. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2024.02.010>.

- Rodríguez García, M. T. (2023). Expresión y Purificación Del Canal de Potasio KirBac 1.1: Caracterización de Su Estructura y Función. Trabajo de fin de grado. Universidad Miguel Hernández.
- Sadler, E. E., Kapanidis, A. N., & Tucker, S. J. (2016). Solution-Based Single-Molecule FRET Studies of K⁺ Channel Gating in a Lipid Bilayer. *Biophysical Journal*, 110(12). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.05.020>.
- Skoog, D. A., H. F. J., & C. S. R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis*.
- Su, Z., Brown, E. C., Wang, W., & MacKinnon, R. (2016). Novel Cell-Free High-Throughput Screening Method for Pharmacological Tools Targeting K⁺ Channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.1602815113>.
- Tilegenova, C., Cortes, D. M., & Cuello, L. G. (2017). Hysteresis of KcsA Potassium Channel's Activation-Deactivation Gating Is Caused by Structural Changes at the Channel's Selectivity Filter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.1618101114>.
- 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>.
- Wang, S., Alimi, Y., Tong, A., Nichols, C. G., & Enkvetchakul, D. (2009). Differential Roles of Blocking Ions in KirBac1.1 Tetramer Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5). <https://doi.org/10.1074/jbc.M807474200>.