

TRABAJO DE FIN DE GRADO



Mecanismo de modulación lipídica de las compuertas de un canal de K⁺

Autor: *Javier Soriano Botella*

Tutora: *Ana Marcela Giudici Besseghini*

Co-tutor: *José Antonio Poveda Larrosa*

Facultad de Ciencias Experimentales

Área de Conocimiento Química Física

Departamento Agroquímico y Medio Ambiente

Curso 2024/2025

Grado en Biotecnología

1. Introducción	4
1.1 Canales iónicos	4
1.2 Estructura del canal de potasio KcsA	4
1.3 Actividad del canal KcsA	5
1.4 Interacción de KcsA con lípidos de membrana	7
1.5 Lípidos unidos a sitios “no anulares”	8
1.6 Estudio del efecto directo o indirecto de los fosfolípidos aniónicos	8
1.7 Espectroscopía y anisotropía de fluorescencia	10
1.8 Fenómeno FRET y Homo-FRET y cómo afecta a la anisotropía	11
2. Antecedentes y objetivos	13
3. Materiales y métodos	16
3.1 Expresión de las proteínas:	16
3.1.1 Transformación	16
3.1.2 Preinóculo	16
3.1.3 Inóculo-inducción	17
3.2 Purificación de las proteínas:	17
3.2.1 Resuspensión	17
3.2.2 Solubilización	18
3.2.3 Cromatografía de afinidad	18
3.2.4 Electroforesis SDS-PAGE	18
3.2.5 Diálisis	19
3.2.6 Espectroscopía de absorción UV-Visible	19
3.3 Anisotropía de fluorescencia	20
3.4 Reconstitución de la proteína en liposomas de ASOL y ASOL POPA	22
3.5 Formación de nanodiscos	23
3.6 DLS	24
3.7 Preparación de muestras para TEM	24
3.8 Marcaje con sonda fluorescente (TMR)	25
4. Resultados	27
4.1 Expresión y purificación de mutantes de KcsA	27
4.1.1 Electroforesis	27
4.1.2 Espectroscopía UV-Visible	27
4.2 Estudio de la modulación lipídica de la conformación del filtro de selectividad de KcsA	28
4.2.1 Caracterización de los sistemas de reconstitución utilizados	28
4.2.2 TEM de Nanodiscos	30
4.2.3 Estudio de los cambios conformacionales en el SF del canal KcsA mediante anisotropía de fluorescencia	30
4.2.4 Conformación del mutante KcsA W67	31
4.2.5 Conformación del mutante KcsA W67 R64A	33
4.3 Caracterización estructural de la compuerta interna	34
4.3.1 Marcaje TMR	34
5. Discusión	36
6. Conclusión y proyecciones futuras	37
7. Bibliografía	38

Palabras Clave:

Canales iónicos, anisotropía de fluorescencia, Homo-FRET, modulación lipídica, fosfolípidos aniónicos, nanodiscos.

Resumen

Investigaciones previas indican que los fosfolípidos aniónicos como POPA influyen en la actividad del canal de potasio KcsA ralentizando su inactivación. Este estudio examinó si el efecto de POPA es directo (por unión específica al canal) o indirecto (por cambios en las propiedades físicas de la membrana) y cómo afecta a las compuertas que controlan la función del canal (compuerta externa (SF) y a la compuerta interna), utilizando mutantes reconstituidos en liposomas y nanodiscos con o sin POPA. El análisis Homo-FRET reveló que la afinidad del SF por K^+ es pH-dependiente. A pH 7 (estado cerrado), SF exhibe una alta afinidad por K^+ , mientras que a pH 4 (estado abierto/inactivado), esta afinidad disminuye. La modulación por POPA incrementa la afinidad de SF por K^+ a pH 4, estabilizando así el estado conductor. Concomitantemente, POPA promueve la apertura de la puerta interna a pH neutro mediante el aumento del pKa de este proceso conformacional. Utilizando la mutación KcsA R64A, que bloquea el SF en conformación conductora se puede concluir que POPA modula de forma independiente las compuertas del canal de potasio KcsA. Este trabajo demuestra que los fosfolípidos aniónicos modulan las transiciones conformacionales del canal KcsA de manera directa, actuando de forma independiente sobre el filtro de selectividad y la compuerta interna, y que los nanodiscos constituyen un sistema modelo válido para estos estudios.

Key Words:

Ion channels, fluorescence anisotropy, Homo-FRET, anionic phospholipids, nanodiscs.

Abstract

Previous research indicates that anionic phospholipids such as POPA influence the activity of the KcsA potassium channel by slowing its inactivation. This study examined whether the effect of POPA is direct (by specific binding to the channel) or indirect (by changes in the physical properties of the membrane) and how it affects the gates that control channel function (external gate (SF) and internal gate), using mutants reconstituted in liposomes and nanodiscs with or without POPA. Homo-FRET analysis revealed that the affinity of SF for K^+ is pH-dependent. At pH 7 (closed state), SF exhibits a high affinity for K^+ , while at pH 4 (open/inactivated state), this affinity decreases. Modulation by POPA increases the affinity of SF for K^+ at pH 4, thus stabilizing the conductive state. Concomitantly, POPA promotes the opening of the internal gate at neutral pH by increasing the pKa of this conformational process. Using the KcsA R64A mutation, which blocks SF in the conducting conformation, it can be concluded that POPA independently modulates the gates of the KcsA potassium channel. This work demonstrates that anionic phospholipids directly modulate the conformational transitions of the KcsA channel by acting independently on the selectivity filter and the internal gate, and that nanodisks are a valid model system for these studies.

1. Introducción

1.1 Canales iónicos

Los canales iónicos son una superfamilia de proteínas integrales de membrana presentes en todos los organismos vivos, desde procariotas hasta eucariotas. Todos los canales iónicos comparten una estructura y funcionalidad básica a pesar de que intervienen en diversas funciones fisiológicas tales como la excitabilidad celular, la contracción muscular, la señalización celular o la transmisión sináptica [1].

Los iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- pasan a través de estos canales siguiendo un gradiente electroquímico, determinado por la combinación del campo eléctrico y el gradiente químico de la membrana plasmática. Este flujo es extremadamente rápido, llegando a velocidades cercanas a 10^6 - 10^8 iones por segundo [2]. La apertura o cierre del canal está regulada a su vez por diversos estímulos, que pueden ser el potencial eléctrico de la membrana (canales activados por voltaje), la unión de ligandos (canales activados por ligandos) o estímulos mecánicos (canales mecanosensibles) [3]. Los canales no permanecen abiertos de manera continua, una vez activados, tienden a inactivarse espontáneamente, lo que interrumpe el flujo iónico [4].

La disfunción de estos canales puede dar lugar a enfermedades conocidas como canalopatías, que afectan a sistemas como el nervioso, cardiovascular y respiratorio. Dada su importancia en la señalización eléctrica y en procesos como la liberación de insulina y el control del volumen celular, entre otros, los canales iónicos son objetivos terapéuticos clave [5].

1.2 Estructura del canal de potasio KcsA

KcsA es un canal de potasio (K^+) procariota de la bacteria *Streptomyces lividans*, estudiado principalmente por su similitud estructural con los canales de K^+ eucariotas. De este modo, este canal se considera un modelo para tratar de describir la estructura, función y mecanismos de los canales de K^+ , así como para explorar cómo las interacciones lípido-proteína pueden modular su actividad [3].

Este canal es una proteína integral de membrana formado por cuatro subunidades idénticas, organizadas en un homotetrámero alrededor de un poro central acuoso por donde fluyen los iones [6]. La apertura del canal está regulada por dos compuertas que controlan el paso de los iones de manera rápida y selectiva. El poro tiene una amplia región llamada vestíbulo, que anticipa al filtro de selectividad que es la parte más estrecha y se encarga de seleccionar los iones que pueden o no pasar a través del canal. El filtro de selectividad (SF), con la secuencia consenso de aminoácidos 75-TVGYG-79, homóloga a la de los canales eucariotas de K^+ , es responsable de la unión de los iones K^+ en el poro, bloqueando el paso de otros iones como Na^+ [7].

Cada una de las cuatro subunidades, denominadas monómeros, contiene un extremo amino (N-terminal) orientado hacia el citoplasma, dos hélices transmembrana (TM1 y TM2) conectadas por una hélice corta que forma la región del poro, responsable de la selectividad del canal hacia los iones K^+ , y una región carboxilo terminal (C-terminal) ubicada en el citoplasma, que actúa como compuerta interna sensible a pH [8,11]. La estructura de KcsA, determinada mediante cristalografía de rayos X, ofrece una visión detallada a nivel atómico que ha permitido desentrañar los mecanismos de selectividad y regulación de los canales de K^+ [10] (figura 1).

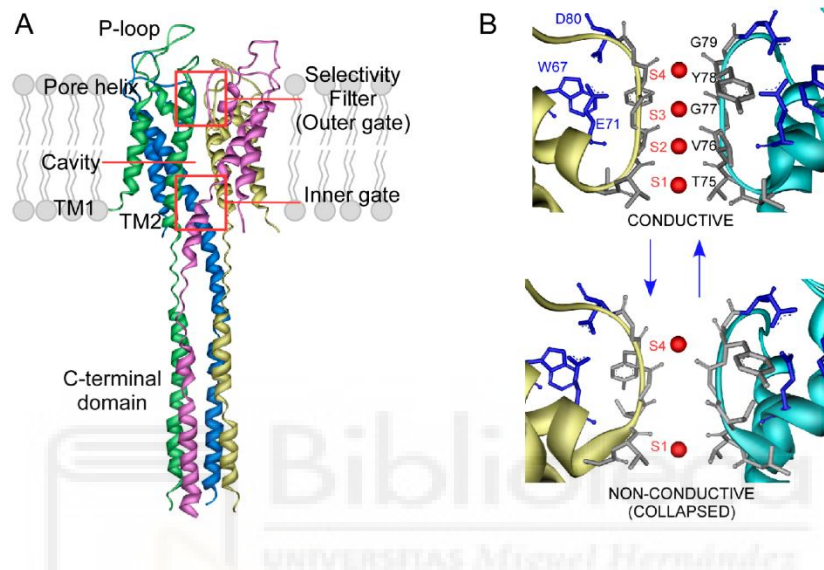


Figura 1: Esquema de la estructura del canal KcsA. (A) Estructura cristalográfica en estado cerrado de KcsA (base de datos PDB: 3EEF). (B) Estructura del filtro de selectividad, secuencia consenso, y triada de inactivación (E71-D80-W67) en dos conformaciones distintas, conductora y no conductor [8].

Gracias al análisis de la estructura cristalográfica, se ha mostrado que KcsA tiene una conformación de cono invertido, con una cavidad central que actúa como un depósito de K^+ en el lado intracelular [6]. La región transmembrana de la proteína tiene aproximadamente 34 Å de longitud, con un poro que se estrecha en el lado extracelular, lo que contribuye a su capacidad de selectividad iónica. Además, el dominio C-terminal de la proteína que está compuesto por aproximadamente 40 aminoácidos, está implicado en la regulación del canal adoptando una conformación helicoidal que da lugar a interacciones entre las cuatro subunidades por puentes de hidrógeno [20].

1.3 Actividad del canal KcsA

El canal KcsA es activado en condiciones de pH ácido en el lado intracelular, lo que provoca la apertura de la compuerta interna formada por los C-terminales de las hélices TM2 [11,12]. Este proceso está principalmente mediado por la protonación de residuos específicos que induce un cambio conformacional permitiendo el paso de los iones K^+ a través del canal [11,13]. Sin embargo, esta

activación es transitoria y el canal tiende a inactivarse rápidamente lo que provoca que entre en un estado no conductor que implica cambios en la conformación del filtro de selectividad, por lo que se considera la compuerta externa del canal [13] .

El canal presenta una comunicación alostérica entre estas dos compuertas que define el ciclo de actividad de este [15,16]. Este consta de cuatro estados conformacionales: cerrado/conductor, abierto/conductor, abierto/inactivado y cerrado/no conductor. En el estado cerrado/conductor, que ocurre a pH neutro (pH 7) y en presencia de K^+ , los C-terminales de los segmentos TM2 se entrecruzan, formando una barrera o compuerta interna que impide el paso de los iones de K^+ , mientras que la compuerta externa (SF) se encuentra en una conformación conductora [15,16]. Debido a la protonación de los residuos involucrados cuando el pH intracelular se acidifica la compuerta interna se abre, haciendo que el canal pase a un estado abierto/conductor y permita el flujo de iones [11,13], aunque este estado no es estable y tan solo dura unos segundos, ya que el SF pasa a un estado inactivo, impidiendo el paso de los iones provocando que el canal se encuentre en el estado abierto/inactivado [8,14]. Este estado de inactivación está mediado por la triada de inactivación, compuesta por tres residuos clave en cada monómero de KcsA: E71, D80 y W67 (Figura 1). Estos residuos se encuentran en contacto con el SF y estabilizan el estado inactivado mediante la formación de puentes de hidrógeno [11,13,18]. Cuando el pH vuelve a valores neutros, la compuerta interna se cierra, lo que impide el paso de iones y hace que el canal adopte un estado no conductor. Al mismo tiempo, el SF recupera su capacidad de conducción, completando así el ciclo de regulación del canal (Figura 2). Esta coordinación entre la compuerta interna y la compuerta externa asegura un control preciso sobre la actividad del canal, permitiendo su regulación en respuesta a cambios tanto en el pH como en la concentración de K^+ [8,14,16] .

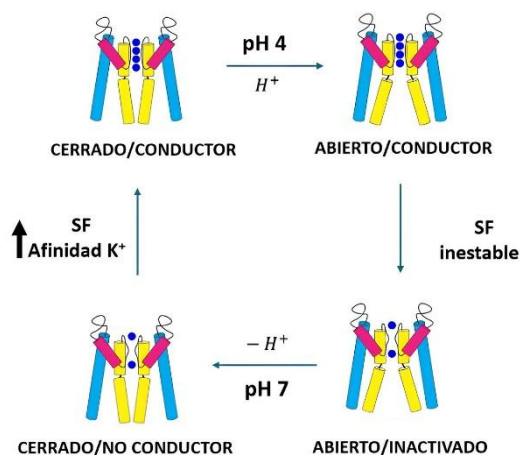


Figura 2: Ciclo de actividad del canal KcsA, representando los 4 estados conformacionales que puede adoptar KcsA a altas concentraciones de K^+ en función del pH: estado cerrado/conductor a pH 7, abierto/conductor y estado abierto/inactivado a pH 4, y estado cerrado/no conductor a pH 7 [16].

El SF de KcsA presenta cuatro sitios de unión para el K^+ (S1-S4), donde los carbonilos del esqueleto de la proteína interactúan con los iones. Dependiendo de la concentración de K^+ , este filtro puede adoptar dos conformaciones diferentes: una conformación colapsada, no conductora, que ocurre cuando la concentración de K^+ es baja y solo se ocupan los sitios S1 y S4, y una conformación conductora cuando la concentración de K^+ es alta, lo que permite la ocupación de todos los sitios y el paso de los iones a través del canal (Figura 1B) [7].

1.4 Interacción de KcsA con lípidos de membrana

El canal KcsA, al tratarse de una proteína de membrana, en su estado nativo en la bicapa lipídica se encuentra rodeado por lípidos de diversa naturaleza. Estos pueden llegar a modular la estructura y función del canal al influir en las propiedades físicas de la membrana como la curvatura, la tensión y el grosor de la bicapa [1]. Por otro lado, también pueden afectar de manera directa al canal uniéndose a sitios específicos, en las tres potenciales regiones de unión de los lípidos a la proteína [18]. Una de estas regiones está ubicada en el lado citoplasmático C-terminal, cerca de la membrana lipídica, y se caracteriza por ser rica en argininas, específicamente los residuos R27, R117, R121 y R122 (Figura 3, amarillo). Esta región confiere mayor estabilidad al tetramero de KcsA frente a procesos de desnaturalización química [18]. Además, en el extremo N-terminal del canal, los aminoácidos R11, R19 y K14 forman otra región importante y se ha propuesto como una especie de "antena" sensible a la carga que, al interactuar con fosfolípidos aniónicos, estabiliza la conformación abierta de la compuerta interna del canal (Figura 3, violeta) [18]. Otra de estas regiones serían los sitios anulares, que rodean directamente la superficie de la proteína en contacto con la bicapa lipídica. En estos sitios, los lípidos están en interacción directa con la superficie de KcsA, actuando como una "capa de lípidos asociados" que se encuentra en contacto continuo con la proteína [12].

Por otra parte, existen los sitios no anulares, donde los lípidos se sitúan en los surcos formados entre cada dos monómeros proteicos de KcsA (Figura 3). Esta área se encuentra entre los segmentos TM1 y TM2 de dos monómeros adyacentes en el lado extracelular del canal, permitiendo que los lípidos aniónicos queden intercalados y se establezcan interacciones con los residuos R64 de un monómero y R89 del otro [18].

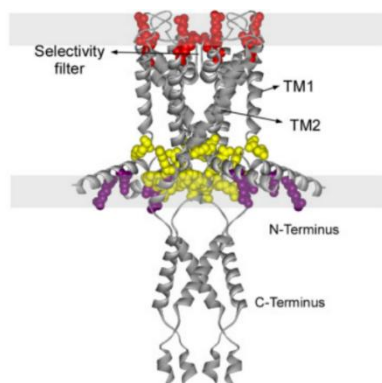
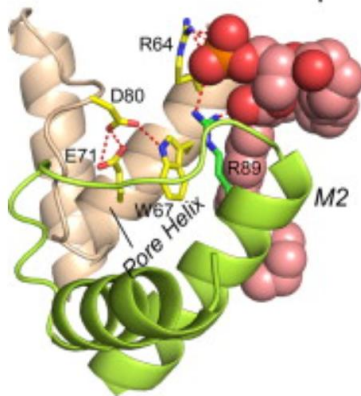


Figura 3: Estructura de KcsA con los sitios de unión a fosfolípidos aniónicos. Los lípidos no anulares están representados en rojo mientras que los que están unidos a la zona citoplasmática y a la zona N-terminal están representados en amarillo y violeta respectivamente [18].

1.5 Lípidos unidos a sitios “no anulares”

Los lípidos aniónicos, como el ácido fosfatídico (PA) o el fosfatidilglicerol (PG), se enlazan a sitios “no anulares”, neutralizando las cargas positivas de los residuos R64 y R89. Este proceso resulta esencial tanto para el correcto plegamiento como para la regulación de la función del canal KcsA [18]. Adicionalmente, la presencia de estos lípidos aumenta la carga negativa en la superficie de la membrana, lo que incrementa la concentración de moléculas con carga positiva, como el ion K^+ , en la



cercanía de la membrana, mejorando así la conductancia del canal [1,12]. Asimismo, su unión de forma no covalente refuerza la estabilidad estructural del tetrámero (Figura 4) [22].

Figura 4: Representación de la interacción en los sitios “no anulares” del canal KcsA de los residuos R64 y R89 de monómeros adyacentes con un fosfolípido aniónico como POPA. La estructura de la proteína se muestra en forma de cintas, con cada subunidad

representada en un color diferente: las hélices transmembranales M2 se destacan en verde, mientras que las regiones circundantes, como la hélice de poro (pore helix), se muestran en beige. Los residuos clave R64, R89, D80, E71 y W67, involucrados en la interacción con el lípido, se indican en azul y amarillo en formato de líneas para resaltar sus posiciones. El fosfolípido aniónico (POPA) se representa en forma de esferas, con los átomos de oxígeno en rojo y los átomos de carbono en rosa, evidenciando su interacción con los residuos en los sitios no anulares [18].

Resultados previos sugieren que la arginina R64 interactúa con el residuo W67 para estabilizar la triada de inactivación, favoreciendo el cierre del canal. Así, la mutación de R64 a alanina (R64A) elimina esta interacción, lo que previene la inactivación del canal [19]. De manera similar, se ha propuesto que los lípidos aniónicos ralentizan así la inactivación del canal KcsA WT al unirse de manera no covalente a R64, evitando la interacción entre este residuo y W67, generando un efecto comparable al de la mutación R64A [18].

1.6 Estudio del efecto directo o indirecto de los fosfolípidos aniónicos

Los fosfolípidos aniónicos desempeñan un papel crucial en la modulación de la estructura y función de canales iónicos como KcsA, pero determinar si su efecto es directo (por unión específica al canal) o indirecto (por cambios en las propiedades físicas de la membrana) ha sido un desafío en la investigación de proteínas de membrana. Para abordar esta cuestión, se han diseñado estrategias experimentales que comparan el comportamiento del canal en diferentes entornos, como bicapas lipídicas y sistemas solubilizados en detergente, en presencia o ausencia de fosfolípidos aniónicos (figura 5) [18]. Estas aproximaciones permiten discernir si los cambios observados en la actividad del

canal se deben a interacciones específicas con los lípidos o a alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de la membrana, como la fluidez o la presión lateral [18].

Un método comúnmente utilizado para integrar proteínas de membrana en un entorno lipídico es la reconstitución en vesículas lipídicas, como las vesículas unilamelares grandes (LUVs). Este proceso comienza con la formación de estructuras lipídicas apiladas, que se transforman en vesículas multilaminares grandes (MLVs) mediante agitación, un paso que desestabiliza las capas lipídicas y permite su cierre espontáneo en vesículas [34]. Posteriormente, las MLVs se convierten en LUVs mediante extrusión, un procedimiento que implica el paso forzado de la suspensión lipídica a través de membranas de policarbonato con poros de tamaño definido, típicamente entre 60 y 100 nm, para obtener vesículas de tamaño homogéneo [26]. Este tipo de vesículas ha sido ampliamente empleado en estudios de canales iónicos para analizar cómo los lípidos, especialmente los aniónicos, influyen en su dinámica y función [18].

Otro sistema destacado es el uso de nanodiscos, que consisten en bicapas lipídicas estabilizadas por polímeros o proteínas, como el N-(2-metil-1,3-bis(O- β -D-glucopropil)-3-(dodeciltiol)propanamida (DDDG). A diferencia de los liposomas, que pueden presentar problemas de agregación y heterogeneidad en el tamaño de las vesículas, los nanodiscos ofrecen un entorno nanométrico estable y monodisperso, lo que reduce interferencias en mediciones espectroscópicas y biofísicas (figura 5) [16, 34]. Esta estabilidad los hace ideales para el análisis de proteínas oligoméricas o complejos proteicos que requieren un entorno de membrana controlado [16]. Además, las interacciones lípido-proteína en estos sistemas han sido estudiadas mediante técnicas espectroscópicas, como la fluorescencia, que permiten analizar la dinámica molecular de canales iónicos como KcsA en la interfaz con el entorno lipídico [17].

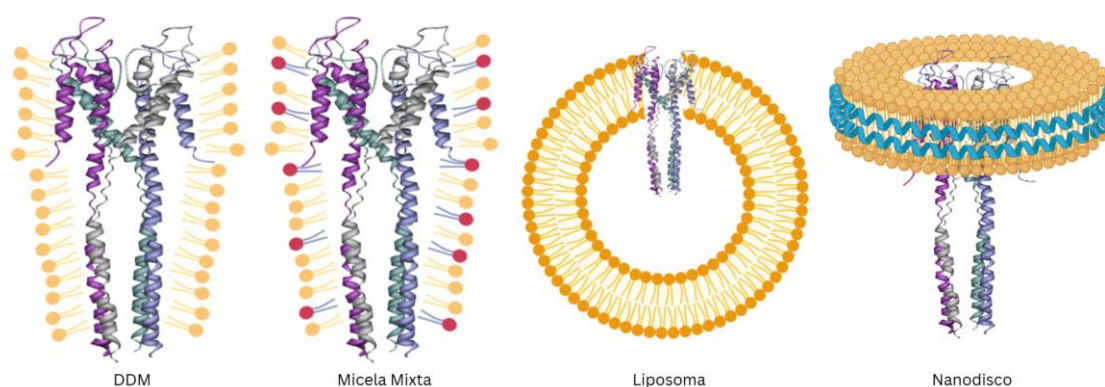
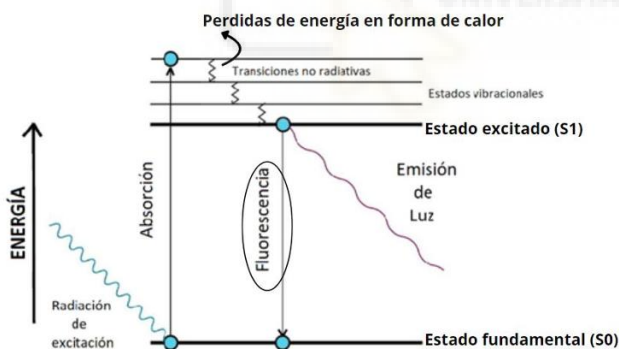


Figura 5: Representación esquemática de los diferentes sistemas lipídicos utilizados en el estudio de KcsA.

1.7 Espectroscopía y anisotropía de fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada en el estudio de proteínas de membrana, ya que permite analizar interacciones proteína-proteína y proteína-ligando, así como obtener información estructural y funcional de manera tanto cualitativa como cuantitativa [17, 31]. En el caso de canales iónicos como KcsA, esta técnica ha sido fundamental para investigar los cambios conformacionales y las dinámicas moleculares en respuesta a estímulos como el pH, la concentración de iones o la composición lipídica del entorno [17]. La anisotropía de fluorescencia, en particular, es una herramienta poderosa para estudiar la movilidad y la orientación de fluoróforos, proporcionando datos sobre las transiciones conformacionales de las proteínas y su interacción con el entorno lipídico [24].

El fenómeno de fluorescencia se produce cuando una molécula capaz de absorber energía es excitada a una determinada longitud de onda, provocando que absorba parte de esta energía y se produzca la transición desde su estado fundamental (S_0) hacia un estado excitado (S_1) [24]. A medida que esta molécula permanece en ese estado, se produce una pérdida parcial de la energía absorbida en forma de calor (desplazamiento de Stokes) durante su tiempo de vida media y con esto, ocurre una relajación vibracional. Finalmente, la molécula vuelve a su estado fundamental emitiendo fluorescencia con una longitud de onda mayor que la de la excitación original ($\lambda_{\text{emisión}} > \lambda_{\text{excitación}}$), debido a la pérdida



de energía en forma de calor que se produce durante las relajaciones vibracionales [24]. Este fenómeno se puede ver representado gráficamente en el diagrama de Jablonski, donde aparecen las distintas transiciones de energía que una molécula experimenta durante la fluorescencia (Figura 6) [24].

Figura 6: Diagrama de Jablonski que muestra los procesos de absorción y emisión de energía [24]. El eje vertical representa la energía, y el horizontal los estados vibracionales. El estado fundamental (S_0) y el excitado (S_1) se indican con líneas gruesas, y los niveles vibracionales con líneas delgadas. La flecha ascendente señala la absorción (S_0 a S_1), y la descendente la emisión de fluorescencia (S_1 a S_0). Las líneas onduladas indican transiciones no radiativas, como relajación vibracional, con pérdida de energía en forma de calor.

En el caso específico de KcsA, los residuos de triptófano desempeñan un papel crucial, ya que presentan fluorescencia intrínseca. Los triptófanos son aminoácidos aromáticos que, al ser excitados por luz UV en torno a los 280 nm, emiten fluorescencia en el rango de 320-350 nm, lo que los convierte

en herramientas útiles para estudiar la conformación y dinámica de proteínas [24]. La fluorescencia de estos residuos es sensible a su entorno, lo que permite detectar cambios estructurales y conformacionales en la proteína [17].

Una de las variantes dentro de la espectroscopía de fluorescencia es la anisotropía de fluorescencia que proporciona información sobre el tamaño, forma y principalmente, dinámica molecular de proteínas. Este método se basa en la excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Durante el proceso, los fluoróforos cuyas transiciones de dipolo de absorción están alineadas con el vector eléctrico de la luz polarizada son selectivamente excitados, resultando en una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada. Esta mide la orientación de la luz emitida respecto a la luz excitada. En un entorno donde los fluoróforos tienen gran libertad rotacional, como en una solución no viscosa, la anisotropía será baja, ya que las moléculas que se encuentran en ella rotan rápidamente y emiten luz en direcciones aleatorias. Por otro lado, si los fluoróforos están inmovilizados, su rotación es más lenta, lo que resulta en una mayor anisotropía (Figura 7). Esta técnica es especialmente útil para estudiar interacciones proteína-proteína, cambios conformacionales o la fluidez y composición de membranas lipídicas [27].

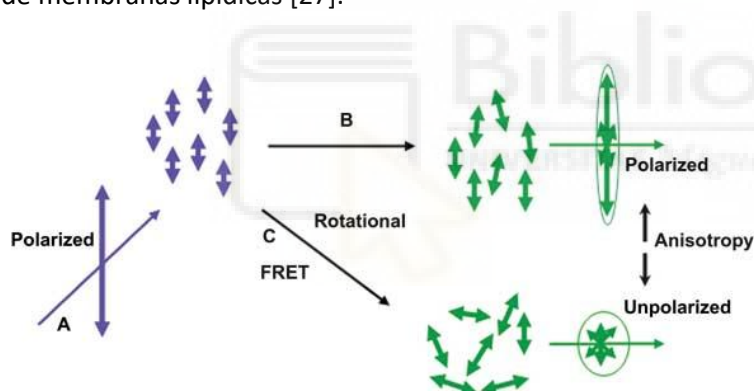


Figura 7: Medida de anisotropía de fluorescencia: (A) La luz incidente polarizada se utiliza para excitar selectivamente aquellos fluoróforos con su dipolo alineado con dicha la luz. (B) Los fluoróforos unidos o en medios de alta viscosidad difunden o rotan más lentamente, dando una alta anisotropía. (C) La difusión rotacional o la transferencia de energía por resonancia reducen la polarización y por lo tanto una menor anisotropía [27].

1.8 Fenómeno FRET y Homo-FRET y cómo afecta a la anisotropía

El Fenómeno de Transferencia de Energía por Resonancia de Förster (FRET) es un proceso fotofísico que se basa en la transferencia de energía no radioactiva desde un fluoróforo donante en su estado excitado a un fluoróforo aceptor en su estado fundamental a través de la interacción electrostática dipolo-dipolo de largo alcance entre el donante y el aceptor. Su eficiencia depende fuertemente de la distancia entre ellos, ocurriendo típicamente en el rango de 1-10 nm [24]. El fenómeno FRET es extremadamente sensible a pequeños cambios en la distancia entre los fluoróforos, por lo que hace que sea una herramienta muy utilizada para estudiar interacciones moleculares y cambios conformacionales [29].

Para representarlo empleamos el diagrama de Jablonski (Figura 8), donde se observa una vía alternativa para la pérdida de energía a través de FRET. En lugar de emitirse fluorescencia directa desde el donante, la energía se transfiere al aceptor [24]. Este proceso, además de ser útil para detectar cambios de distancia, implica que las moléculas involucradas deben cumplir ciertas condiciones, como un solapamiento adecuado entre el espectro de emisión del donante y el de absorción del aceptor [29]. En este contexto, los residuos de triptófano del canal KcsA, en particular el W67, son especialmente importantes ya que este residuo se encuentra localizado adyacente del filtro de selectividad del canal, lo que lo convierte en un marcador clave para estudiar cambios conformacionales en el mismo [18].

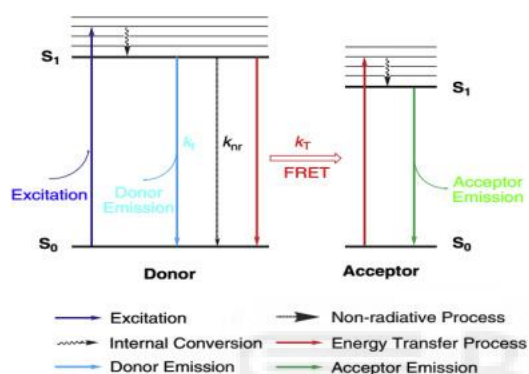


Figura 8: Diagrama de Jablonski, donde se representa el fenómeno FRET entre un donante y un aceptor. Los estados electrónicos fundamental (S_0) y excitado (S_1) se indican para ambos fluoróforos. En el donante (izquierda), una flecha azul ascendente muestra la excitación desde S_0 a S_1 , mientras que una flecha azul descendente indica la emisión del donante. Una flecha negra representa la conversión interna (proceso no radiativo). La transferencia de energía no radiativa (FRET) al aceptor se señala con una flecha roja horizontal (k_{FRET}) que compite con la conversión interna (k_{nr}) y la emisión del donante (k_f). En el aceptor (derecha), una flecha verde descendente indica su emisión tras recibir la energía [24].

La eficiencia del proceso de FRET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el donante y el aceptor, como bien describe la ecuación de Förster (Ecuación 1) que implica que incluso cambios muy pequeños en la distancia entre los fluoróforos pueden detectarse mediante FRET [24].

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

donde E_{FRET} es la eficiencia del proceso de transferencia de energía, r es la distancia real donante-aceptor y R_0 es la distancia Förster a la que la eficiencia de FRET es del 50% y que depende de las pareja donador-aceptor utilizada.

El fenómeno FRET puede presentarse en diferentes modalidades, una de ellas es el Homo-FRET, en el que tanto el donante como el aceptor son moléculas idénticas, como los residuos de triptófano mencionados. En este caso, la transferencia de energía provoca un desplazamiento angular o despolarización, lo que puede medirse mediante la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario [28]. A diferencia del Hetero-FRET, donde el donante y el aceptor son moléculas químicamente

distintas y presentan variaciones en la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida media, en el Homo-FRET estos parámetros permanecen inalterados [28]. Por ello, en el estudio de Homo-FRET se emplea la anisotropía de fluorescencia como indicador (figura 8), mientras que en Hetero-FRET se analizan los cambios en intensidad y tiempo de vida para evaluar el proceso de transferencia de energía [28].

En concreto, y como ya he comentado anteriormente, el Homo-FRET es el que principalmente se usa para estudiar proteínas oligoméricas como el canal KcsA, donde se pueden monitorizar los cambios conformacionales mediante mediciones de anisotropía de fluorescencia [18]. Teniendo en cuenta lo anterior, los residuos de triptófano del canal KcsA, como W67 son muy útiles para su estudio mediante Homo-FRET, ya que permiten evaluar la conformación del canal en base a las distancias relativas entre sus cuatro monómeros a nivel del SF [17].

Otra utilidad que se le ha dado al Homo-FRET en el estudio de KcsA, es mediante el marcaje con tetrametilrodamina (TMR) en el residuo 116 del mismo, cerca de la compuerta interna. Esta es una herramienta valiosa para investigar la dinámica de la compuerta interna en respuesta a estímulos como variaciones de pH, gracias a las propiedades espectroscópicas sensibles de este fluoróforo [29]. En condiciones de pH bajo, que inducen la apertura del canal, se ha observado que la anisotropía de fluorescencia de TMR aumenta debido a una mayor distancia entre los marcadores, lo que reduce la eficiencia del Homo-FRET [31]. Este enfoque ha permitido obtener información detallada sobre los estados conformacionales de la compuerta interna de KcsA, contribuyendo a una mejor comprensión de cómo los cambios estructurales en el canal se relacionan con su función en diferentes condiciones fisiológicas [31].

2. Antecedentes y objetivos

En estudios previos se determinó que la actividad del canal KcsA está modulada por la presencia de fosfolípidos aniónicos que ralentizan el proceso de inactivación y dan lugar a unas mayores corrientes de K^+ a través del canal. En ese mismo trabajo también se vio que el mutante R64A presenta una inactivación ralentizada independientemente de la presencia o no de lípido aniónico [8,18].

En este TFG se describen los cambios conformacionales que tienen lugar en las dos compuertas del canal debido a la presencia de fosfolípidos aniónicos. Para ello empleamos los mutantes de KcsA W67, W67 R64A, G116C, y R64A G116C. En la mutante KcsA W67 se han eliminado todos los residuos de triptófano de la proteína, dejando sólo el W67, adyacente al SF, y muy sensible a su conformación [18]. Mientras, la cisteína introducida en los mutantes G116C, se utilizará para marcar la proteína con la

sonda fluorescente tetrametilrodamina (TMR) en una posición cercana a la compuerta interna y por tanto sensible a su conformación [31].

Por otro lado, la mutación R64A se ha utilizado para bloquear el filtro de selectividad en una conformación conductora no inactivante y ver cómo afecta esto al efecto de los lípidos sobre las dos compuertas del canal [8].

La técnica de anisotropía de fluorescencia, basada en procesos de Homo-FRET, se utilizó para medir los cambios conformacionales en el SF y la compuerta interna, reflejando las distancias entre los residuos W67 (SF) y C116 (compuerta interna) en función del pH y la concentración de K^+ (Figuras 9, 10 y 11) [18]. En el SF, las distancias entre los W67 varían según el estado conformacional: a bajas concentraciones de K^+ , el SF adopta un estado no conductor con mayor separación entre los W67, mientras que a altas concentraciones de K^+ , el canal pasa a un estado conductor con distancias menores (Figuras 9, 10 y 11) [17]. En la compuerta interna, el marcaje con TMR en G116C permite detectar su apertura a pH ácido, lo que se refleja en un aumento de la anisotropía debido a una mayor separación entre subunidades (Figura 11) [31].

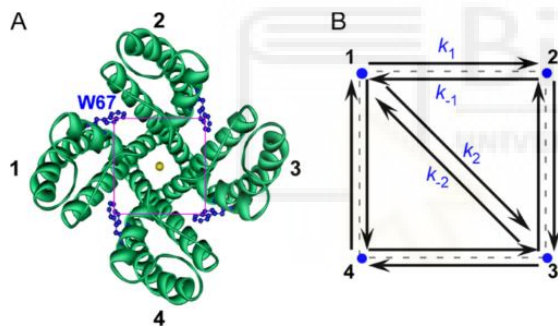


Figura 9: Relación entre geometría y homo-FRET en KcsA. A: canal de KcsA desde una vista superior, donde los residuos W67 están representados en azul y cada monómero está numerada del 1 al 4 aleatoriamente. B: diagrama de Homo-FRET donde se representa el homotetrámero simétrico de KcsA, los W67 se

representan en las esquinas generando una geometría cuadrada (W67 son equidistantes) con una distancia lateral R (monómeros contiguos), y una distancia diagonal (monómeros opuestos) $\sqrt{2} R$ [17].

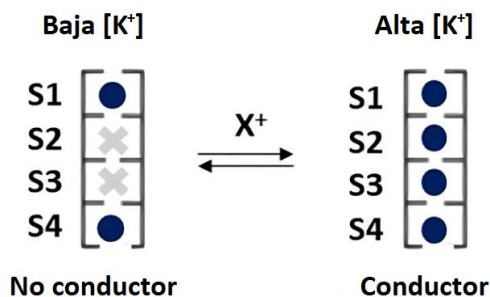


Figura 10: Comparación entre las diferentes conformaciones del filtro de selectividad de KcsA a alta y baja concentración de K^+ . Con baja concentración de ion los sitios S2 y S3 están vacíos y el filtro colapsado y en estado no conductor mientras que, a altas concentraciones de ion, los sitios S1-S4 están ocupados y el canal pasa a estado conductor [13].

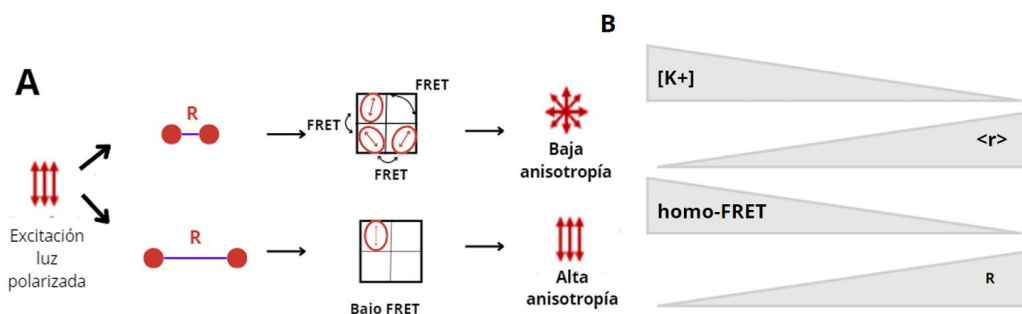


Figura 11: A: Representación gráfica de cómo a distancias pequeñas ocurre Homo-FRET dando lugar a movimientos rotacionales de las moléculas resultando en una baja anisotropía. Mientras que si la distancia entre las moléculas es relativamente mayor, no ocurren fenómenos de Homo-FRET. B: Correlación entre $[K^+]$, $\langle r \rangle$ (anisotropía de fluorescencia en estado estacionario), Homo-FRET y la distancia entre las moléculas.

Para estudiar el efecto del entorno lipídico, se emplearon liposomas de ASOL y ASOL-POPA, así como nanodiscos estabilizados con DDDG, que permiten un análisis más controlado del canal y reducen la dispersión en las mediciones espectroscópicas (Figura 5) [16, 34]. Estos sistemas lipídicos se caracterizaron mediante técnicas como dispersión dinámica de luz (DLS) para evaluar su homogeneidad y estabilidad.

Por todo lo expuesto, se expone el siguiente objetivo general:

- Estudiar cómo los lípidos de la membrana modulan la apertura y cierre de las dos compuertas que determinan la actividad del canal de K^+ KcsA.

Para lograr el objetivo general se proponen los objetivos específicos:

- Determinar el tamaño y la homogeneidad de los sistemas lipídicos utilizados para reconstituir KcsA: liposomas y nanodiscos formados con DDDG.
- Analizar la interacción de los lípidos con el filtro de selectividad del canal KcsA W67 y el mutante KcsA W67 R64A a pH 7 y 4
- Analizar la interacción de los lípidos con la compuerta interna del canal KcsA y el mutante R64A a pH 7 y 4.
- Determinar si la mutación R64A que bloquea al filtro de selectividad en conformación no inactivante, afecta a la modulación lipídica de ambas compuertas.

3. Materiales y métodos

3.1 Expresión de las proteínas:

3.1.1 Transformación

La transformación de las bacterias *E.coli* M15 se realizó mediante shock térmico añadiendo los plásmidos pQE-30 y pQE-1 que codifican para las proteínas KcsA W67 y KcsA W67 C116; KcsA C116 y KcsA R64A C116 respectivamente y los cuales contienen un gen que les confiere resistencia a ampicilina, permitiendo seleccionar las colonias objetivo durante el plaqueo. Además, para dicha selección se ha de tener en cuenta que las células *E.coli* M15 cuentan con resistencia a kanamicina.

En un eppendorf se añadieron 100 μ L de células M15 a las que se le adicionaron 1,7 μ L de β -mercaptoetanol 1.67 % (v/v) y 1 μ L de ADN (plásmido) a una concentración 100 ng/ μ L. Este eppendorf se incubó durante 30 minutos en hielo. A continuación, se realizó el “shock” térmico donde se inoculan las células con el plásmido durante 45 segundos a 42°C seguido de dos minutos en hielo. Posteriormente, se añadió 1 mL de LB estéril y se incubó en un agitador durante una hora a 37°C (225 rpm).

Pasado el tiempo de incubación, se plaquearon 50 μ L en condiciones estériles en una placa LB agar suplementada con 25 μ L de ampicilina (stock 100 mg/mL) y 25 μ L de kanamicina (stock 25 mg/mL). Finalmente se dejaron las placas crecer durante toda la noche (overnight (O/N)) en estufa a 37°C.

En paralelo se siguió el mismo procedimiento de transformación de las bacterias *E.coli* M15 pero sin añadir el plásmido y se plaquearon en placas LB agar ampicilina y kanamicina como control negativo de transformación (Figura 12).

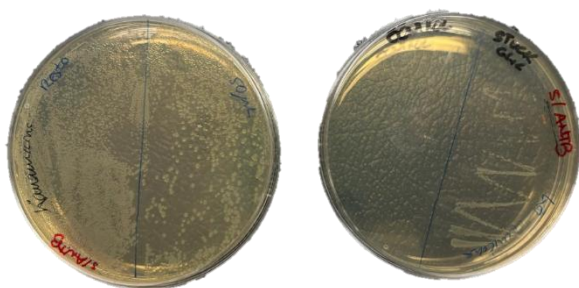


Figura 12. Imágenes placas LB Agar suplementadas con Kanamicina. Izquierda, placa con 50 μ L M15 KcsA W67 transformadas. Derecha placa control con células competentes sin transformar con el plásmido.

3.1.2 Preinóculo

Con una única colonia seleccionada, se preparó un preinóculo haciéndola crecer a 30°C con agitación de 200 rpm en 250 mL de LB estéril líquido suplementado con 250 μ L de ampicilina (100 mg/mL), 250 μ L de kanamicina (25 mg/mL) y 250 μ L de glucosa (0,4 μ g/mL) y se mantuvo durante toda la noche en agitación a 30 °C y 200 rpm O/N.

3.1.3 Inóculo-inducción

Se prepararon y autoclavaron cuatro matraces de medio líquido 2xYT añadiendo en un litro de agua 36 g de medio (16 g de Tryptona, 10 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl). Una vez preparados, en cada matraz se añadió en condiciones estériles 1 mL de kanamicina (stock de 25 mg/mL) y 1 mL de ampicilina (stock de 100 mg/mL) y 1 mL de glucosa (stock de 0,4 µg/mL) para seguidamente añadir en cada uno de ellos 50 mL de preinóculo de KcsA R64A crecidos O/N por cada litro de medio. El inóculo, así preparado, se creció a 37°C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar un valor de 0,6 - 0,7 de densidad óptica a 600 nm (Figura 13).



Figura 13. Matraces utilizados en la preparación del inóculo.

Una vez llegado a la densidad óptica adecuada se llevó a cabo la inducción añadiendo 600 µL de IPTG 1 M (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). Se dejó induciendo 2 horas a 30°C en agitación (200 rpm).

Previo a la inducción se preparó un tubo de glicerol-stock con el fin de almacenar células ya transformadas en N₂ líquido y evitar la transformación en una posible purificación posterior. Para ello, se mezclaron 800 µl de células con 200 µl de glicerol estéril (80%).

Una vez pasado el tiempo de inducción indicado anteriormente, se centrifugaron los cultivos en una centrífuga refrigerada Beckman Coulter Avanti J-30 I con un rotor JA-10 durante 15 minutos, a 6.000 rpm a 4 °C. Por último, se descartó el sobrenadante y se congelaron los pellets a -20 °C hasta el día siguiente [18].

3.2 Purificación de las proteínas:

3.2.1 Resuspensión

Tras descongelar los pellets y eliminar cualquier resto de medio que pudiese quedar en los tubos de centrífuga, se prepararon 50 mL de tampón de resuspensión (20 mM HEPES, 0.45 M sacarosa y 8 mM EDTA a pH 7.5) por cada litro de cultivo. Se añadió al tampón un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free ROCHE, 1 pastilla/200 mL) y se dejó agitar mediante imán. Después, con esta mezcla se resuspendieron todos los pellets para proceder a sonicar en hielo con potencias crecientes

en ciclos de 45 segundos a cada potencia. Finalmente se centrifugaron en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K con el rotor T-45 durante 45 minutos a 35.000 rpm a 4°C.

3.2.2 Solubilización

Tras finalizar la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido en tampón de solubilización (20 mL/litro de cultivo) 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10 mM DDM (β -D-dodecilmaltósido) y 50 mM Imidazol a pH 7.5. La idea es extraer la proteína, que es una proteína de membrana, de su entorno lipídico, quedando soluble en medio acuoso en forma de micela de detergente. El DDM es un detergente no iónico que en este caso nos permite aislar y estabilizar las proteínas de membrana hidrofóbicas [19,34].

Se pasó el líquido a tubos Falcon y se terminó la resuspensión mediante politrón a fuerza 3 durante 45 segundos, con 3 o 4 ciclos por tubo manteniéndolos en todo momento en hielo.

A continuación, se solubilizaron en agitación las muestras con el tampón durante 2 horas y tras esto se centrifugaron en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K con el rotor T-45 durante 45 minutos a 4°C a una velocidad de 35.000 rpm, para eliminar los restos no solubilizados.

3.2.3 Cromatografía de afinidad

La proteína presenta una cola de Histidinas en el C-terminal. Ésta favorece la unión específica a una matriz que contiene grupos quelantes de Ni^{2+} , formándose un complejo (Ni^{2+} / His-tag) entre los componentes de la fase estacionaria y el grupo imidazol de los residuos de la cola de histidinas. Antes de llevar a cabo la cromatografía por la que las proteínas fueron separadas, se prepararon los tampones de elución y lavado. El tampón de elución está compuesto por 20 mM HEPES, 150 mM KCl, 5 mM DDM y 500 mM Imidazol a pH 7. Para el tampón de lavado en cambio se preparó 100 mL/litro de cultivo, el cual está compuesto por 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM DDM y 50 mM Imidazol a pH 7 [33].

En un primer paso, la resina se dejó incubando en agitación durante al menos dos horas en la noria a 4°C con el sobrenadante de la fracción solubilizada del paso anterior.

Tras este paso, se procedió a trasvasar la mezcla a la columna cromatográfica de vidrio BioRad y se dejó que decantara hasta depositarse de forma uniforme la resina al final de la columna sin llegar a secarse. Tras esto, se vertió el tampón de lavado y luego se procedió a eluir con el tampón de elución.

Para la elución se prepararon 10 tubos eppendorf de 1.5 mL cada uno y se llenaron hasta 1 mL por tubo, controlando el flujo de salida a una velocidad constante [33].

3.2.4 Electroforesis SDS-PAGE

Las fracciones obtenidas de la purificación se verificaron mediante electroforesis en gel de

poliacrilamida al 12% en presencia de dodecilsulfato sódico 10% (SDS), con el propósito de detectar la presencia y comprobar el estado de la proteína en condiciones desnaturalizantes. La preparación de muestras que se cargarán en el gel consta de 12 μL de la fracción de proteína eluída a la cual se le añade 3 μL de sample buffer 5x. Posterior a la electroforesis, se procedió a la tinción del gel con Azul de Coomassie para poder observar con claridad las bandas correspondientes a la proteína. Esta tinción se mantiene durante toda la noche en una relación de metanol, ácido acético y agua en proporciones 5:1:5 y Coomassie 0,05% peso/volumen y posteriormente se destiñó con una disolución de metanol, ácido acético y agua en proporciones 5:1:5.

3.2.5 Diálisis

Tras la elución, se agruparon los tubos Eppendorf según la concentración de proteína. Los más concentrados se separaron en diferentes bolsas de diálisis (*Sigma-Aldrich*, MWCO 12.4 kDa), mientras que los más diluidos se incluyeron en una misma bolsa. Fueron dializadas frente a tampón 20 mM HEPES, 5 mM DDM y 150 mM KCl a pH 7, con el objetivo de eliminar el imidazol de las muestras gracias al equilibrio de los gradientes dentro y fuera de las membranas de diálisis, dejando fuera de ellas este pequeño compuesto que es capaz de atravesar el reducido tamaño del poro. Las proteínas, más grandes, por el contrario, quedan retenidas en su interior (Figura 14). La diálisis se llevó a cabo en nevera con agitación débil y para ello se utilizó 1 litro de tampón renovado con otro litro a las 3 horas.

Dado que los experimentos se realizaron en un rango de pH de 3 a 7.5 y con diferentes concentraciones de iones, la diálisis también se empleó para ajustar las condiciones de las muestras a los valores específicos requeridos en cada ensayo. Para ello, se utilizaron tampones adaptados como 20 mM HEPES, 5 mM DDM para pH 7, o 20 mM ácido succínico, 5 mM DDM para pH 4, ajustando la condición iónica (por ejemplo, 150 mM KCl o 100 mM NaCl) según las necesidades de cada experimento [33].

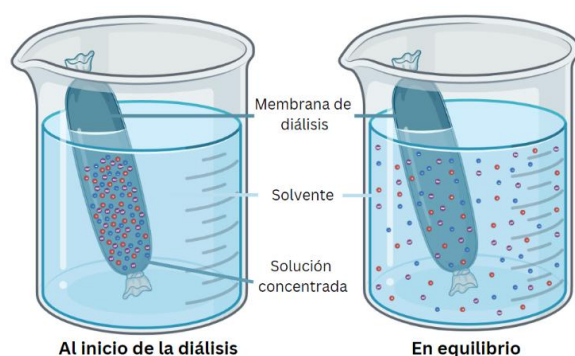


Figura 14. Esquema ilustrativo de una diálisis, mostrando el proceso de intercambio de solutos a través de una membrana semipermeable. A la izquierda, se representa el inicio de la diálisis, con una solución concentrada dentro de la membrana rodeada de nuestra solución tampón. A la derecha, se muestra el estado de equilibrio, donde los solutos se han difundido hacia el exterior, igualando las concentraciones a ambos lados de la membrana.

3.2.6 Espectroscopía de absorción UV-Visible

Una vez llevada a cabo la diálisis, se procedió a una centrifugación a 21000 x g durante 5 minutos a 4°C para eliminar cualquier impureza o agregado, y así determinar la concentración de proteína purificada

que se ha obtenido. Para la cuantificación se realizó un barrido de longitudes de onda iniciado en 340 nm y finalizado en 230 nm en un espectrofotómetro *Varian Cary 50 BIO*.

En espectroscopía de absorción UV-Vis, la luz pasa a través de una muestra en una determinada longitud de onda en el ultravioleta o del espectro visible. Si la muestra absorbe parte de la luz, no toda la luz será capaz de pasar o transmitirse. La transmisión equivale al cociente entre la intensidad de la luz transmitida y la luz incidente y se relaciona con la absorbancia. Ésta puede utilizarse de una manera o bien cualitativa para identificar un compuesto, teniendo en cuenta que, por ejemplo, las proteínas absorben a una longitud de onda de 280 nm debido a la presencia de triptófanos en su estructura; o bien de una manera cuantitativa, como es el caso, para obtener la concentración de una muestra. Para ello se tiene en cuenta la ley de *Lambert-Beer*:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde A es la absorbancia medida a 280 nm, ε es el coeficiente de extinción molar de las proteínas KcsA G116C y KcsA R64A G116C ($34850 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y de las proteínas KcsA W67 y KcsA W67 R64A ($12950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 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 hacer el barrido y medir la absorbancia hasta 340 nm ya que, en principio, las proteínas no absorben a esta longitud de onda, y el valor de absorbancia esperado es 0. Si no lo hacen es porque puede haber algo de turbidez en la muestra incluso después de centrifugarla. Para tratar de corregirla en caso de producirse, se volvería a centrifugar, o bien se restaría ese valor a la medida de absorbancia a 280 nm.

3.3 Anisotropía de fluorescencia

Para llevar a cabo la medición de los espectros de emisión de fluorescencia de proteínas, es fundamental considerar que solo ciertos aminoácidos, en particular los aromáticos, pueden absorber energía y emitir fluorescencia. Entre ellos, la fenilalanina (Phe) tiene un pico de absorción en el rango de 250-260 nm, aunque su contribución al espectro en la región del ultravioleta cercano es mínima. La tirosina (Tyr) presenta su máximo de absorción a 275 nm, mientras que el triptófano (Trp) destaca por su máximo de absorción entre 295-300 nm, lo que lo convierte en un indicador clave para el estudio de proteínas debido a su alta sensibilidad al entorno molecular [24].

Las mediciones en estado estacionario de la fluorescencia fueron realizadas utilizando un espectrofluorómetro SLM-8000C (SLM-Aminco, Urbana, IL, EE. UU.), empleando cubetas de cuarzo con un paso óptico de 0,5 cm. Para estudiar específicamente el residuo de triptófano W67, la longitud de onda de excitación se fijó en 300 nm, con el fin de evitar interferencias de otros residuos aromáticos como Phe o Tyr presentes en la proteína y además porque a esta longitud de onda, la anisotropía

fundamental (R_0) del triptófano es mayor, lo que otorga un mayor rango dinámico a la medida de anisotropía [17,24].

Durante las mediciones de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario, se utilizaron monocromadores con rendijas de 4 nm en la excitación y de 8 nm en la emisión, lo que garantiza una adecuada resolución espectral. Adicionalmente, se descontaron las señales de fondo generadas por componentes como las vesículas unilamelares grandes (LUVs), con el fin de obtener valores precisos y sin artefactos.

El cálculo de la anisotropía en estado estacionario se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$\langle r \rangle = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde I_{VV} e I_{VH} corresponden a las intensidades de fluorescencia polarizada vertical y horizontal, respectivamente, cuando la muestra es excitada con luz polarizada vertical. El factor G se define como la relación $G = \frac{I_{VH}}{I_{HH}}$, que corrige la sensibilidad del instrumento para las diferentes orientaciones de emisión de la luz. Esta ecuación permite calcular un valor promedio de anisotropía, reflejando la movilidad rotacional de la proteína en diferentes condiciones.

Para determinar la constante de afinidad (K_D) del catión K^+ al filtro selectivo (SF) a partir de los cambios en anisotropía del residuo W67, se empleó la siguiente ecuación:

$$\langle r \rangle = \langle r \rangle_{NC} + (Q \langle r \rangle_{c/l} - \langle r \rangle_{NC}) \frac{[X^+]^h}{K_D^h + [X^+]^h} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde $\langle r \rangle_{NC}$ representa la anisotropía en el estado no conductor, mientras que $\langle r \rangle_{c/l}$ es la anisotropía en el estado conductor o inactivo. El término $[X^+]$ corresponde a la concentración del catión, K_D es la constante de disociación del catión, y h es el coeficiente de Hill, que describe la cooperatividad en la unión del catión a la proteína. El parámetro Q indica el cambio relativo en el rendimiento cuántico entre las formas conductoras y no conductoras de la proteína.

Para analizar la dependencia con el pH de la apertura de la compuerta interna, se empleó la ecuación de Hill, que describe un comportamiento sigmoide típico en procesos cooperativos. Esta ecuación permite modelar la variación de la anisotropía de fluorescencia ($\langle r \rangle$) en función del pH:

$$r = r_{min} + \frac{(r_{max} - r_{min})}{1 + 10^{n(pKa - pH)}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde r es la anisotropía medida, r_{min} y r_{max} son los valores de anisotropía correspondientes a los estados completamente cerrado y abierto de la compuerta interna, respectivamente, n es el

coeficiente de Hill que indica el grado de cooperatividad, y pK_a es el pH al que la transición está al 50% de su valor máximo.

Este enfoque proporciona una visión detallada de la interacción entre el SF del canal iónico y los cationes, así como de las transiciones conformacionales dependientes del pH, ayudando a entender mejor los mecanismos subyacentes en la selectividad, conducción y compuerta de iones a través de canales como KcsA [8].

3.4 Reconstitución de la proteína en liposomas de ASOL y ASOL POPA

Las proteínas se reconstituyeron en vesículas unilamelares grandes (LUVs) de asolectina (ASOL), un extracto de soja compuesto por una mezcla de fosfolípidos (45,7% fosfatidilcolina (PC), 22,1% fosfatidiletanolamina, 18,4% fosfatidilinositol, 6,9% ácido fosfatídico y 6,9% de otros componentes) que recrea un entorno similar al de la membrana celular y en una mezcla de ASOL:POPA (75:25 en peso), donde POPA (1,2-palmitoil-oleoil-ácido fosfatídico) es un lípido aniónico [34]. El procedimiento de preparación comenzó con la creación de vesículas multilamelares grandes (MLVs). Para las MLVs de ASOL, se pesaron 100 mg de ASOL, que se disolvieron en 10 mL de una mezcla de cloroformo (2:1 v/v). Esta disolución se secó usando un rotavapor durante 30 minutos, tras lo cual el residuo seco se resuspendió en 10 mL de una disolución de 10 mM HEPES y 100 mM NaCl, a pH 7 o 10 mM Ácido succínico y 100 mM NaCl pH 4 ajustando el pH según las condiciones experimentales requeridas, que abarcaron un rango de 3 a 7.5 para evaluar el efecto del pH en las transiciones conformacionales del canal KcsA. La mezcla resultante se dejó en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos, y finalmente se alicuotó en tubos de criocongelación y se almacenó en nitrógeno líquido. Para preparar MLVs de ASOL:POPA, se empleó el mismo protocolo, pero partiendo de 75 mg de ASOL, a los que se añadieron 5 mL de POPA a una concentración de 5 mg/mL, consiguiendo una relación 75:25 en peso.

Para obtener las vesículas unilamelares grandes (LUVs), se utilizó el método de extrusión mediante el dispositivo Liposofast (Avestin Inc., Ottawa, Canadá) (Figura 15) [34].



Figura 15. Extrusor (Liposofast) montado para la preparación de liposomas. El dispositivo incluye un soporte central que aloja una membrana de policarbonato con poros de tamaño definido (por ejemplo, 100 nm), utilizada para homogeneizar el tamaño de los liposomas mediante extrusión. En

lugar de jeringas convencionales, se emplean dos jeringas Hamilton de 0,5 mL.

Este método implica pasar la suspensión de MLVs a través de un filtro de policarbonato con poros de

100 nm, lo que reduce el tamaño de las vesículas hasta obtener LUVs, que presentan una distribución casi simétrica de lípidos entre las hemicapas interna y externa de la bicapa, tal como se observa en vesículas de aproximadamente 95 nm (figura 16).

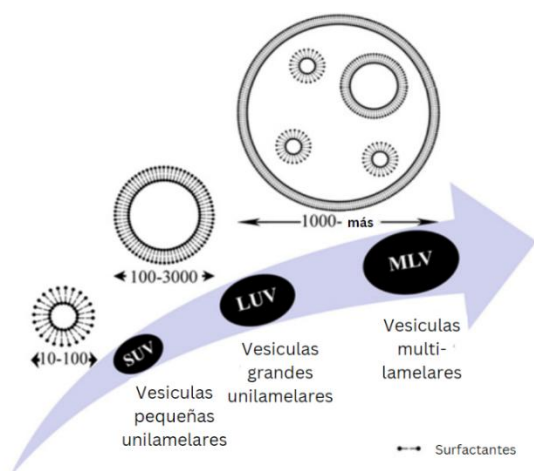


Figura 16. Esquema de los diferentes tipos de liposomas que se pueden producir.

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 adsorben 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 el buffer de interés. 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 [34].

3.5 Formación de nanodiscos

Para la formación de nanodiscos, se utilizó el polímero N-(2-metil-1,3-bis(O-β-D-gluco)propan-2-il)-3-(dodeciltiol)propanamida (DDDGG) en combinación con vesículas de ASOL y ASOL : POPA (75:25) a una relación final 1:2 de lípido:DDDGG (Figura 17) [16].

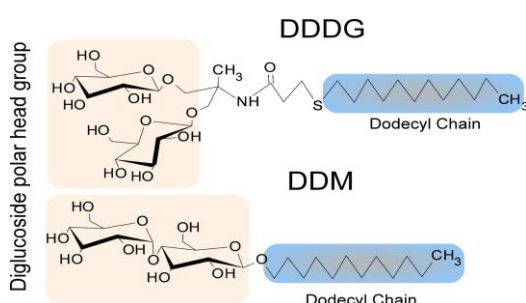


Figura 17. Estructura química del polímero DDDGG empleado en el procedimiento de formación de nanodiscos en comparación a la estructura del detergente DDM [16].

Para preparar cada muestra, se tomaron 3 µL de una solución inicial de proteína reconstituida en lípido a una concentración de 83 mg/mL de lípido, que se mezcló con la proporción correspondiente de DDDGG según las relaciones en masa mencionadas anteriormente. El proceso de incubación se llevó a cabo añadiendo gota a gota la solución de proteína reconstituida en lípido al volumen de DDDGG disuelto en

el tampón, mientras se mantenía en agitación continua mediante un agitador. Esta agitación asegura una mezcla homogénea y facilita la interacción entre los lípidos, el DDDG y la proteína, promoviendo la formación de nanodiscos estables. La temperatura se mantuvo a 25 °C (temperatura ambiente controlada), ya que esta condición favorece la solubilidad y ensamblaje de los componentes sin inducir desnaturalización del canal KcsA ni alterar las propiedades de los lípidos aniónicos como el POPA.

Tras la adición completa, se llevó la mezcla a un volumen final de 50 μ L añadiendo tampón 20 mM HEPES y 100 mM NaCl, pH 7, asegurando que la concentración final de lípido en la muestra fuera de 1 mg/mL para no interferir posteriormente con las mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) [16]. La mezcla se incubó durante 2 horas adicionales a 25 °C bajo agitación suave (100 rpm), para permitir la formación y estabilización de los nanodiscos. Este tiempo de incubación asegura que los lípidos y el DDDG se autoensamblen alrededor de la proteína, formando discos lipídicos de aproximadamente 10-12 nm de diámetro, dependiendo del tamaño de la membrana proteica y la relación lípido:DDDG utilizada. Posteriormente, las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su uso [16].

3.6 DLS

Las mediciones del tamaño de las micelas de detergente, liposomas y nanodiscos se realizaron utilizando la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) con el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern, Reino Unido), el cual está equipado con un láser de 633 nm que detecta el retrodispersado a un ángulo de 173°. Las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C, con un tiempo de equilibrado de 60 segundos antes de iniciar el experimento.

Para cada muestra se midió el tamaño y la distribución de las nanopartículas en un volumen total de 50 μ L. Los datos mostrados corresponden a un promedio de 7 mediciones, cada una compuesta por al menos 10 lecturas de 10 segundos cada una. Se utilizó un modelo de análisis de propósito general con resolución normal, bajo la suposición de que las partículas son esféricas, lo cual es coherente con la morfología esperada de las micelas, liposomas y nanodiscos formados por ASOL o ASOL:POPA y DDDG.

3.7 Preparación de muestras para TEM

La técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó para caracterizar los nanodiscos obtenidos utilizando el polímero DDDG para estabilizar las bicapas lipídicas, las cuales contenían POPC como lípido principal, a una concentración final de 1 mg/mL. La relación de lípido:polímero utilizada en esta muestra fue de 1:2, garantizando la correcta estabilización de los nanodiscos. El tampón empleado para la preparación de las muestras consistía en 10 mM HEPES y 100 mM KCl, ajustado a pH 7.0.

Se utilizaron las rejillas utilizadas fueron rejillas circulares de cobre de 300 mallas recubiertas con una capa de carbono en la cara brillante, según las especificaciones del fabricante (Ted Pella, Inc., Redding, California, Estados Unidos). Estas rejillas se manejaron con cuidado para evitar daños durante la preparación.

Para la tinción negativa, se preparó una solución de acetato de uranilo al 2% disolviendo 2 g de acetato de uranilo en 100 mL de agua desionizada (dH_2O), filtrada previamente con un filtro de $0.22\ \mu\text{m}$ lavado con agua doblemente destilada. La solución se almacenó a 4°C en oscuridad y se llevó a temperatura ambiente antes de su uso, manejándola como residuo radiactivo según las normativas de seguridad.

El protocolo de tinción negativa se realizó sobre una superficie de parafilm dentro de una placa Petri. Se depositaron cinco gotas de $10\ \mu\text{L}$ de dH_2O (etiquetadas del 1 al 5) y una gota de $10\ \mu\text{L}$ de la suspensión de nanodiscos (etiquetada "M"). La rejilla se colocó con la cara recubierta de carbono hacia abajo sobre la gota 1 de dH_2O durante 1 minuto, retirando el exceso de líquido con papel absorbente en posición perpendicular. Posteriormente, se trasladó a la gota "M" durante 2 minutos, secando el exceso de la misma manera. La rejilla se lavó colocando la cara de carbono sobre las gotas 2 y 3 de dH_2O durante 20 segundos cada una, secando tras cada paso. En condiciones de oscuridad, se añadieron dos gotas de $10\ \mu\text{L}$ de acetato de uranilo al 2% (etiquetadas "UA1" y "UA2"); la rejilla se colocó sobre "UA1" durante 30 segundos, se secó, y se repitió el proceso con "UA2". Finalmente, se lavó con las gotas 4 y 5 de dH_2O durante 20 segundos cada una, secando tras cada lavado, y se dejó secar a temperatura ambiente.

La observación se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokio, Japón), operando a un voltaje de 100 kV, obteniendo micrografías a una escala de 200 nm que muestran nanodiscos con un diámetro promedio de 12 nm [16].

3.8 Marcaje con sonda fluorescente (TMR)

Para el estudio de los cambios conformacionales en la compuerta interna del canal KcsA bajo diferentes condiciones, se empleó la sonda fluorescente tetrametilrodamina (TMR) conjugada al aminoácido Cisteína 116. Para llevar a cabo el marcaje, se prepararon alícuotas con sonda TMR-M (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) en DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a una concentración de 30,5 mM, que fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C , siempre protegidas de la luz. Las alícuotas se prepararon justo antes de su uso a concentraciones entre 1-10 mM, según las recomendaciones del fabricante, asegurando que la sonda no permaneciera más de 24 horas en solución para evitar su degradación.

Las proteínas KcsA G116C y KcsA R64A G116C se prepararon en un tampón que contenía 100 mM de NaCl, 5 mM de DDM y 20 mM de HEPES, ajustado a un pH de 7.5, alcanzando una concentración aproximada de 25 μ M. Previo al marcaje, la proteína se incubó con un exceso de TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (10 veces la cantidad de proteína) durante 30 minutos a temperatura ambiente, con el fin de reducir los enlaces disulfuro de los residuos de cisteína. A continuación, la sonda TMR-M disuelta en DMSO se añadió a la proteína en una proporción de 10:1 (sonda: proteína), vertiéndola gota a gota mientras se agitaba suavemente la solución para garantizar una mezcla homogénea. Esta mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, o alternativamente, durante toda la noche a 4°C, manteniendo la solución protegida de la luz mediante papel de aluminio [31].

La solución se centrifugó a 18,000 x g durante 5 minutos tanto antes como después del proceso de marcaje para eliminar cualquier agregado insoluble que pudiera haberse formado. Este paso es crucial para asegurar la homogeneidad de la muestra y evitar interferencias en los análisis posteriores. La proteína marcada con TMR se purificó a través de una columna de resina de níquel, siguiendo el mismo protocolo que el apartado 3.2.3 para la purificación del canal sin marcar.



4. Resultados

4.1 Expresión y purificación de mutantes de KcsA

Para la realización de este trabajo se expresaron en *E. Coli* y se purificaron cuatro mutantes del canal de K⁺ KcsA: KcsA W67, KcsA W67 R64A, KcsA G116C, KcsA G116C R64A.

4.1.1 Electroforesis

La electroforesis en gel de poliacrilamida permitió verificar la purificación de los mutantes de KcsA. En la Figura 18 se observan las diferentes fracciones obtenidas de la columna de purificación para el caso particular de KcsA W67R64A, junto con el marcador de peso molecular (calle MW). De este gel podemos deducir la alta pureza de la muestra obtenida, con dos bandas principales que corresponden al tetrámero de KcsA (aproximadamente 68 kDa) y al monómero (17 kDa). La intensidad de las bandas varía según la concentración de proteína, de modo que las fracciones con mayor intensidad indican una mayor concentración de KcsA.

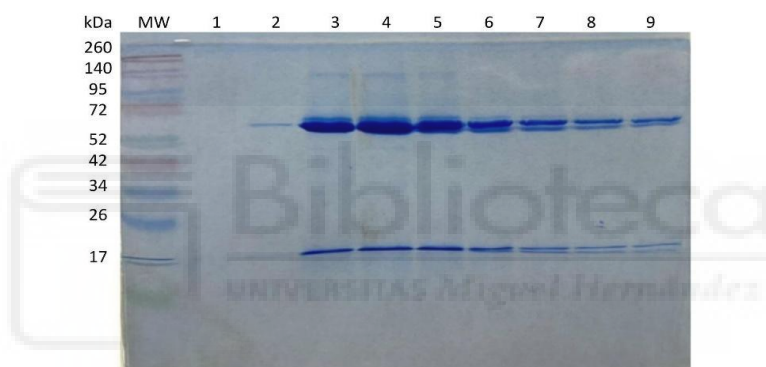


Figura 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida del 12% (SDS-PAGE) de la purificación KcsA W67 R64A. La calle MW corresponde al marcador de peso molecular. El resto de calles corresponden a diferentes fracciones recogidas de la columna de purificación en las que se ven dos bandas: una mayoritaria del tetrámero de KcsA (68 kDa), y la del monómero de 17 KDa.

4.1.2 Espectroscopía UV-Visible

La cuantificación de la proteína KcsA purificada se realizó mediante espectroscopía de absorción UV-Visible, midiendo la absorbancia en un rango de 340 nm a 230 nm. La Figura 19 muestra el espectro de absorbancia de una alícuota de proteína (curva roja) y su correspondiente blanco (tampón 20 mM HEPES, 5 mM DDM y 150 mM KCl, pH 7; curva negra). El pico de absorbancia a 280 nm permitió determinar la concentración de la proteína utilizando la ley de Lambert-Beer, confirmando la presencia de proteína purificada en las fracciones analizadas. A partir de estas medidas se calcularon los rendimientos, que fueron los siguientes para cada mutante: KcsA W67 ([0,4] mg/L), KcsA W67 R64A ([0,17] mg/L), KcsA G116C ([0,68] mg/L) y KcsA R64A G116C ([2,5] mg/L). Estos valores reflejan diferencias en la expresión y estabilidad de cada mutante durante la purificación.

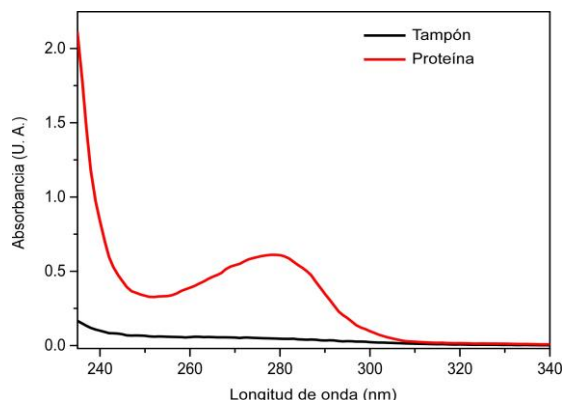


Figura 19. Barrido de absorbancia de una alícuota de proteína KcsA W67R64A purificada. La curva de color rojo corresponde a la fracción de proteína y la negra corresponde al blanco (tampón 20 mM HEPES, 5 mM DDM y 150 mM KCl; pH 7).

4.2 Estudio de la modulación lipídica de la conformación del filtro de selectividad de KcsA

4.2.1 Caracterización de los sistemas de reconstitución utilizados

Como se ha explicado en la introducción, en esta memoria se va a trabajar con KcsA en diferentes sistemas, o bien en micelas del detergente DDM, en micelas mixtas detergente-lípido, reconstituida en liposomas, o finalmente en nanodiscos.

Como se puede observar en la figura 20, cuando la proteína se encuentra en DDM y micela mixta (DDM:POPA), el medio resulta más uniforme y transparente gracias a la habilidad del detergente DDM para mantener las proteínas solubilizadas y dispersas en micelas únicas. La combinación de DDM con POPA aporta un poco de complejidad al sistema, sin embargo, el detergente continúa siendo predominante, manteniendo las partículas en forma de micela y por tanto bastante transparente. Por otro lado, las cubetas que contienen proteína incubadas con nanodiscos de DDDG se encuentran en un punto intermedio de turbidez entre estas últimas y las reconstituida en bicapas que en cambio sí muestran una apariencia más turbia. Esto es a causa de la creación de bicapas lipídicas, lo que sugiere una estructura supramolecular más grande y heterogénea que dispersa más la luz, lo que conduce a una solución menos transparente.

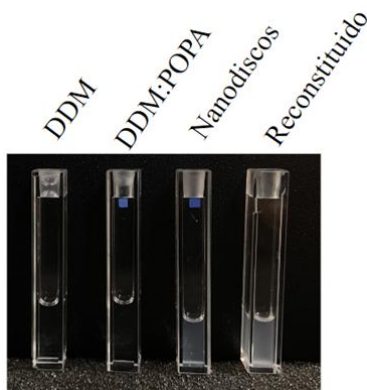


Figura 20: Comparación visual de la muestra de KcsA solubilizada en micelas de detergente y reconstituido en liposomas y nanodiscos. De izquierda a derecha: proteína en DDM, proteína en micela mixta (DDM:POPA), proteína incubada con nanodiscos de DDDG y proteína reconstituida en bicapas lipídicas (ASOL).

Con el fin de hacer una cuantificación del tamaño y heterogeneidad de todos estos sistemas, se procedió a realizar un estudio mediante DLS ("dynamic light scattering"). En la figura 21 se puede

observar los resultados obtenidos.

Los datos obtenidos muestran variaciones importantes en el tamaño de las partículas de acuerdo con los diferentes tipos de muestra. Para la muestra reconstituida en bicapa lipídica de ASOL, el tamaño medio de las partículas fue de cerca de 100 nm, tamaño esperado para estas muestras, ya que fueron extruidas en filtros con ese tamaño de poro [34]. También se puede observar una cierta heterogeneidad de tamaños a partir de la anchura del pico, lo que es habitual en muestras reconstituidas.

Por otro lado, las muestras preparadas en micelas mixtas combinadas de DDM y POPA mostraron un pico estrecho y situado en torno a los 7 nm, lo que indica la formación de micelas pequeñas y muy homogéneas, típicas de este detergente, lo que indica que la adición de POPA no altera significativamente las micelas de DDM. El contraste notable entre estas muestras y las reconstituidas resalta la diversidad estructural del sistema dependiendo del ambiente lipídico y las condiciones de preparación.

Finalmente, las muestras de nanodiscos de asolectina, estabilizados por el polímero DDDG, presentaron un tamaño promedio de 12 nm, confirmando la correcta formación de los nanodiscos [34]. Estos resultados coinciden con las observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) que observaremos a continuación, donde se determinó un tamaño similar para las estructuras discoidales.

Los resultados obtenidos mediante DLS corroboran la capacidad del polímero para formar nanodiscos de tamaño controlado, diferenciándose claramente de las micelas mixtas y las vesículas de mayor tamaño observadas en las muestras reconstituidas (Figura 21).

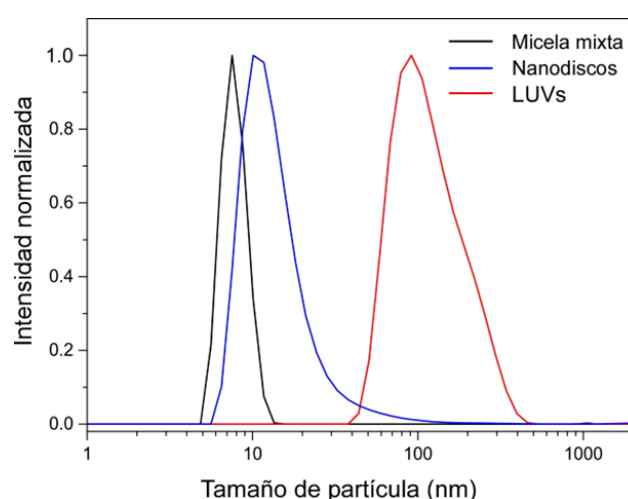


Figura 21: Distribuciones de tamaño de partícula ponderadas por volumen de las diferentes muestras estudiadas. Las muestras reconstituidas presentan un diámetro hidrodinámico promedio de ~100 nm (LUVs), las micelas mixtas (DDM y POPA) muestran un diámetro de ~7 nm, y los nanodiscos presentan

un diámetro de ~ 12 nm.

4.2.2 TEM de Nanodiscos

Con el fin de confirmar la formación de nanodiscos por acción del polímero DDDG se prepararon muestras para TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión) con las condiciones explicadas en el apartado 3.7.

En la micrografía a escala de 200 nm (Figura 22), se pueden observar claramente las estructuras discoidales características de los nanodiscos formados, con un diámetro homogéneo en torno a los 10 nm [16]. Se intentó realizar este tipo de experimentos con nanodiscos de Asolectina con y sin KcsA, pero no se pudieron obtener buenas imágenes por lo que se empleó POPC para poder realizar liposomas más simples [16]. En cualquier caso, el tamaño de los discos observados concuerda con los resultados obtenidos mediante Dynamic Light Scattering (DLS), que también arrojaron un tamaño promedio similar, lo que sugiere la correcta formación de los nanodiscos también a partir de liposomas de asolectina.

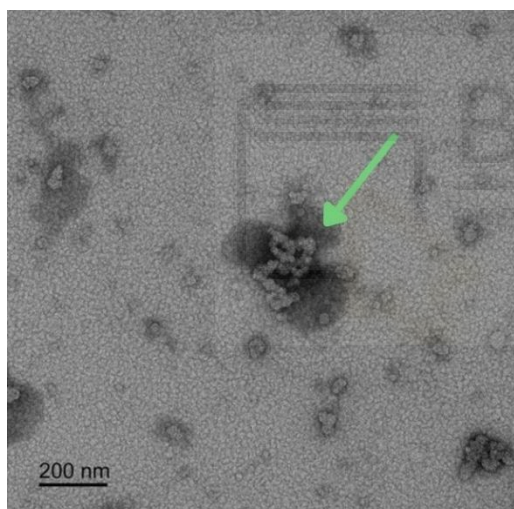


Figura 22: Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los nanodiscos formados a partir de POPC y estabilizados por el polímero DDDG a una relación de 1:2 lípido:polímero. Las estructuras discoidales observadas corresponden a nanodiscos con un diámetro aproximado de 10 nm.

4.2.3 Estudio de los cambios conformacionales en el SF del canal KcsA mediante anisotropía de fluorescencia

En esta parte del trabajo se va a estudiar el efecto del lípido aniónico POPA sobre la compuerta externa del canal (SF). Para ello, se utilizarán dos mutantes de KcsA (KcsA W67 y KcsA R64A W67) reconstituidos en LUVs tanto de ASOL como de una mezcla de ASOL y POPA (75:25), un fosfolípido aniónico [18]. Gracias a estudios anteriores, sabemos que el SF en un estado inactivado presenta baja afinidad por K^+ , pero esta afinidad aumenta cuando está en conformación conductora [13]. De manera que, para cuantificar esta afinidad, mediremos la anisotropía de fluorescencia de los residuos W67 de KcsA 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 (0.16 – 0.18), mientras que a altas concentraciones de K^+ , 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 (0.12-0.14) [17].

4.2.4 Conformación del mutante KcsA W67

Se llevaron a cabo ensayos de afinidad por K^+ tanto a pH 7, donde el canal KcsA está en estado cerrado y el filtro de selectividad suele adoptar una conformación conductora con alta afinidad por K^+ , como a pH 4, donde el canal está abierto y el filtro suele inactivarse, evidenciando una baja afinidad por K^+ . La figura 23 muestra los resultados obtenidos bajo cuatro condiciones: el canal reconstituido en bicapas lipídicas de ASOL y ASOL:PA, y en nanodiscos estabilizados con el polímero DDDG (ASOL nanodisc y ASOL:PA nanodisc), evaluando así el efecto de la formación de nanodiscos en la dinámica conformacional del canal a ambos pH.

A pH 7, las curvas de anisotropía exhiben un perfil sigmoide en todas las condiciones experimentales. En un principio, se observa una anisotropía elevada (alrededor de 0.17-0.18) que disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de K^+ , alcanzando valores cercanos a 0.12 - 0.14 a concentraciones de 100 mM. Este comportamiento refleja una aproximación de las subunidades del canal, lo que incrementa la señal de Homo-FRET y, en consecuencia, reduce la anisotropía. En esta condición, la ubicación de las curvas sigmoides es similar entre las bicapas lipídicas y los nanodiscos, indicando que la afinidad por K^+ no varía significativamente entre las distintas condiciones. Los resultados de la constante de disociación (Tabla 1) confirman que la afinidad por K^+ es elevada en todas las circunstancias a pH neutro, lo que sugiere que el canal adopta predominantemente una conformación conductora en estas condiciones.

En cambio, a pH 4 donde el canal está abierto y el filtro de selectividad tiende a inactivarse, las curvas presentan diferencias marcadas según la composición del entorno. La presencia del fosfolípido aniónico POPA (ASOL:PA) desplaza la curva sigmoide hacia la izquierda, indicando un aumento en la afinidad por K^+ en comparación con ASOL solo, donde la curva refleja una baja afinidad por K^+ , característica de un filtro inactivado. Este desplazamiento sugiere que POPA favorece una conformación conductora del filtro, protegiendo al canal contra la inactivación y desempeñando un papel clave en la regulación de su estado funcional a pH bajo.

Este efecto del POPA se observa tanto en las muestras reconstituidas en liposomas como en los nanodiscos.

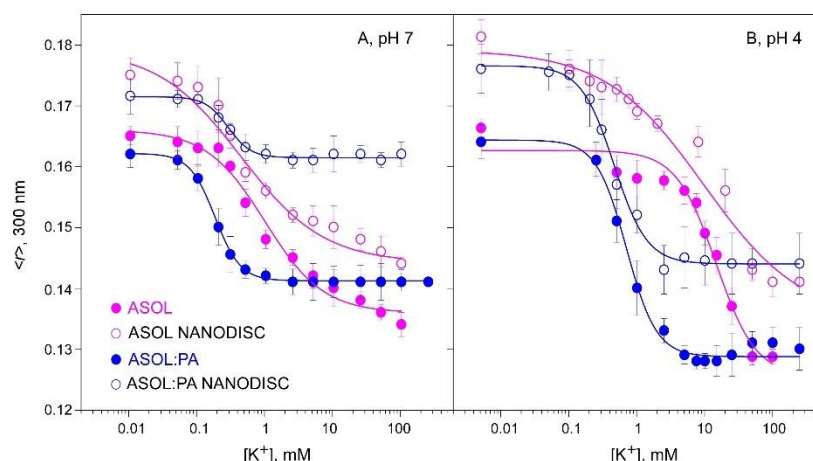


Figura 23: Curvas de anisotropía de fluorescencia $\langle r \rangle$ frente a concentraciones crecientes de K^+ , para el canal KcsA W67 reconstituido en ASOL y ASOL con POPA (ASOL:PA) en una relación 75:25 y en nanodiscos de las mismas composiciones estabilizados por el polímero DDDG con una relación lípido:polímero DDDG de 1:2 a pH 7 (A) y pH 4 (B), respectivamente. Cada punto en las gráficas representa el promedio de tres experimentos independientes, y las barras de error corresponden a la desviación estándar de dichas mediciones. Las líneas continuas son los ajustes de la ecuación 4 a los datos.

A continuación, la Tabla 1 muestra las constantes de disociación (K_D) del mutante KcsA W67 para K^+ en las condiciones experimentales a pH 7 y pH 4. A pH 7, la alta afinidad por K^+ en todas las condiciones confirma un estado conductor del filtro de selectividad. A pH 4, la afinidad disminuye notablemente sin POPA, mientras que su presencia la incrementa, estabilizando el estado conductor ya sea en liposomas o nanodiscos. Estas K_D obtenidas son similares a las publicadas en estudios previos realizados con micelas mixtas de DDM-POPA, donde también se analizó la unión de K^+ al residuo W67 del canal KcsA. Esta similitud sugiere que el efecto del POPA no requiere una membrana lipídica para manifestarse, indicando una interacción directa entre el lípido y sitios específicos de la proteína, como los sitios no anulares [13,17,18].

Condición	KcsA W67	
	K_D (mM) pH 7	K_D (mM) pH 4
ASOL	1.0 ± 0.2	14 ± 3
ASOL NANODISC	0.5 ± 0.1	10 ± 5
ASOL PA	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.3
ASOL PA NANODISC	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.3

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. Los datos corresponden al promedio $\pm SD$ ($n = 3$).

4.2.5 Conformación del mutante KcsA W67 R64A

Se realizaron experimentos similares a los previamente mencionados, pero empleando el mutante KcsA W67 R64A, que a nivel funcional, se distingue por su disminución en la inactivación a causa del reemplazo de la arginina 64 por alanina. La figura 24 muestra los resultados obtenidos bajo cuatro condiciones: el canal reconstituido en bicapas lipídicas de ASOL y ASOL:PA, y en nanodiscos estabilizados con el polímero DDDG (ASOL nanodisc y ASOL:PA nanodisc), evaluando su comportamiento a pH 7 y pH 4.

En todas las condiciones, las curvas de anisotropía muestran sigmoides similares a las observadas en el mutante KcsA W67, disminuyendo progresivamente con el aumento de la concentración de K^+ debido a la aproximación de las subunidades del canal, lo que incrementa la señal de Homo-FRET. Sin embargo, a diferencia de KcsA W67, las curvas del mutante W67 R64A no presentan diferencias entre las condiciones a ninguno de los pH, lo que nos indica que la afinidad por K^+ es estable. Esto nos sugiere que el filtro de selectividad (SF) del mutante W67 R64A no pasa a un estado inactivado, incluso a pH 4.

La estabilidad de las curvas en ambos pH respalda la hipótesis de que la mutación R64A estabiliza el SF en una conformación conductora, impidiendo las transiciones conformacionales hacia un estado inactivado que se observan en el canal KcsA W67, independientemente del entorno lipídico o la formación de nanodiscos.

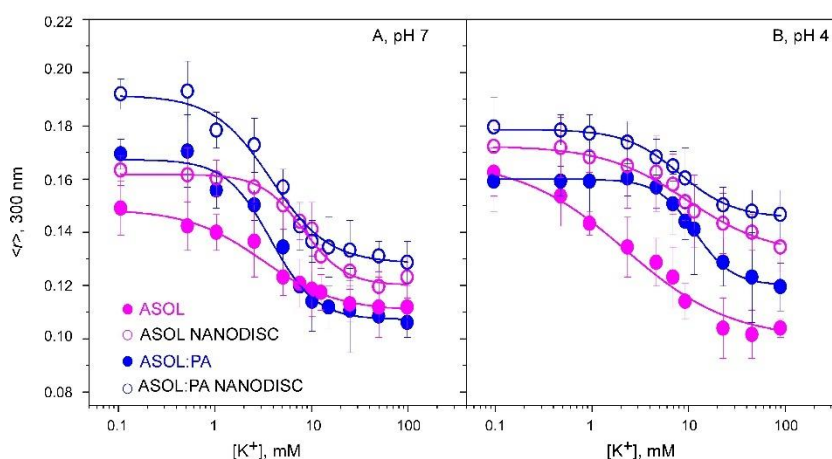


Figura 24: Gráficas A y B: Medición de la anisotropía de fluorescencia $\langle r \rangle$ en función de las concentraciones crecientes de K^+ , con el mutante KcsA W67 R64A reconstituido en ASOL y ASOL con POPA (ASOL:PA) en una relación 75:25 y en nanodiscos (ASOL:POPA) estabilizados por el polímero DDDG con una relación lípido:polímero DDDG de 1:2 a pH 7 y pH 4, respectivamente. Los puntos en las gráficas muestran los valores promedio de tres experimentos independientes, con sus correspondientes

barras de error que indican la desviación estándar. Las líneas continuas son los ajustes de la ecuación 4 a los datos.

Respecto a las K_D , la Tabla 2 muestra 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 pHs. Esto indica que la afinidad por K^+ no cambia de manera significativa y que el SF del canal no entra en un estado claramente inactivado, independientemente de la presencia de fosfolípidos aniónicos o nanodiscos, lo que se corresponde con los estudios funcionales con este mutante R64A en estudios previos [1].

Condición	KcsA W67 R64A	
	K_D (mM) pH 7	K_D (mM) pH 4
ASOL	4 ± 1	3 ± 1
ASOL NANODISC	3.7 ± 0.9	8 ± 3
ASOL PA	3.3 ± 0.6	12 ± 1
ASOL PA NANODISC	8 ± 2	10 ± 2

Tabla 2: 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 ($\langle r^2 \rangle$) del canal KcsA W67. Los datos corresponden al promedio $\pm$ SD ($n = 3$).

4.3 Caracterización estructural de la compuerta interna

4.3.1 Marcaje TMR

Una vez se han caracterizados los cambios conformacionales inducidos por el lípido POPA en la compuerta externa (SF), se procedió al correspondiente estudio de la compuerta interna. Para ello, se llevó a cabo el estudio de la anisotropía de las proteínas KcsA G116C y KcsA R64A G116C, marcadas con TMR que nos permite observar los cambios conformacionales de la compuerta interna del canal inducidos por las variaciones de pH (rango de 3 a 7.5). Los experimentos se realizaron empleando proteína reconstituida en ASOL y una mezcla de ASOL con POPA.

En el sistema KcsA G116C, se observa que, a pH neutro, cuando la compuerta interna está cerrada, los marcadores TMR se ubican con cierta cercanía, favoreciendo el homo-FRET que se refleja en valores bajos de anisotropía (figura 25). Por otro lado, a pH ácido, la apertura de la compuerta interna genera un aumento en las distancias entre las subunidades lo que reduce la eficacia del homo-FRET y conduce a niveles más elevados de anisotropía.

Se puede observar como el lípido POPA induce un incremento del pK_a del proceso tanto en KcsA G116C como en KcsA G116C R64A.

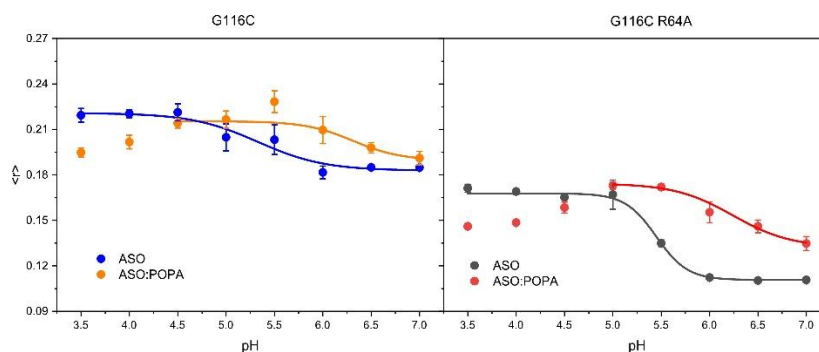


Figura 25: Curvas de anisotropía de fluorescencia $\langle r \rangle$ en función del pH, con las mutantes KcsA G116C (A) y KcsA R64A G116C (B) reconstituidas en ASOL y ASOL con POPA (ASOL:PA), en condiciones de alta concentración de K^+ . Los puntos en las gráficas muestran los valores promedio de tres experimentos independientes, con sus correspondientes barras de error que indican la desviación estándar. Las líneas continuas son los ajustes de la ecuación 5 a los datos, a partir de las cuales se han calculado los pK_a de la tabla 3.

Los valores de pK_a obtenidos reflejan el efecto del POPA en la dinámica de apertura de la compuerta interna. En ausencia de POPA (ASOL), el pK_a es más bajo, indicando que la apertura ocurre a pH más ácidos, mientras que la presencia de POPA (ASOL:PA) desplaza el pK_a hacia valores más altos, facilitando la apertura en condiciones menos ácidas. Este desplazamiento es consistente en ambos mutantes, lo que sugiere que la mutación R64A no altera significativamente la acción del POPA en la compuerta interna.

	pKa	
	ASOL	ASOL:POPA
KcsA G116C	5.3 ± 0.2	6.09 ± 0.09
KcsA G116C R64A	5.45 ± 0.03	6.21 ± 0.07

Tabla 3: Valores de pK_a obtenidos a partir de los ajustes de la ecuación 5 para las mutantes KcsA G116C y KcsA R64A G116C reconstituidas en ASOL y ASOL con POPA (ASOL:PA). Los datos corresponden al promedio $\pm SD$ ($n = 3$).

5. Discusión

En este trabajo, se han estudiado las transiciones conformacionales del canal KcsA mediante medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario ($\langle r \rangle$), tanto para la compuerta externa (SF) como para la interna, utilizando los mutantes KcsA W67 y KcsA W67 R64A para el SF, y KcsA G116C WT y KcsA R64A G116C, marcados con TMR, para la compuerta interna [17,31]. Los resultados obtenidos aportan un correlato estructural al efecto funcional ya conocido de los fosfolípidos aniónicos, como el POPA, sobre la actividad del canal, relacionando su capacidad para modular la inactivación con los estados conformacionales del SF que determinan su afinidad por K^+ [18].

Un hallazgo clave es la similitud en el comportamiento del SF entre los sistemas reconstituidos en liposomas (ASOL y ASOL:PA) y en nanodiscos estabilizados con DDDG (ASOL nanodisc y ASOL:PA nanodisc), tanto a pH 7 como a pH 4 (Figuras 23 y 24). En el mutante KcsA W67, la presencia de POPA aumenta la afinidad por K^+ a pH 4 en ambos sistemas, desplazando las curvas de anisotropía hacia concentraciones más bajas de K^+ y reduciendo los valores de K_D , lo que indica una estabilización del estado conductor del SF (Tabla 1). Esta consistencia entre liposomas y nanodiscos valida el uso de nanodiscos como un sistema modelo fiable para estudiar las transiciones conformacionales del canal KcsA, ya que reflejan dinámicas similares a las observadas en entornos lipídicos más tradicionales [16,18].

Otro aspecto relevante es la actuación independiente del POPA sobre las dos compuertas del canal. En el mutante KcsA W67 R64A, la mutación R64A interfiere con la triada de inactivación (E71-D80-W67), haciendo que el SF quede bloqueado en conformación conductora sin que se inactive, e impidiendo que el POPA module dicho proceso de inactivación, como se observa en la falta de diferencias significativas en la afinidad por K^+ (Tabla 2) y en las curvas de anisotropía similares a pH 7 y 4 (Figura 24). Sin embargo, en la compuerta interna, el POPA sigue ejerciendo su efecto, desplazando el pK_a hacia valores más altos en ambos mutantes KcsA G116C y KcsA R64A G116C (Figura 25). Esto indica que el POPA facilita la apertura de la compuerta interna a pH más cercanos al neutro, independientemente de su acción sobre el SF, lo que sugiere que los efectos del lípido en cada compuerta son independientes y no están alostéricamente acoplados [8,18,31].

Además, los resultados sugieren que el efecto del POPA sobre ambas compuertas del canal KcsA es directo y no requiere la formación de una bicapa lipídica completa para manifestarse. La independencia del efecto del POPA sobre ambas compuertas con respecto al modo de presentación del canal (micelas mixtas donde no hay bicapa lipídica, y liposomas o nanodiscos donde sí la hay) indica que su acción se produce mediante una interacción específica que no requiere de la formación de una bicapa lipídica [18].

En resumen, este trabajo demuestra que los fosfolípidos aniónicos modulan las transiciones conformacionales del canal KcsA de manera directa, actuando de forma independiente sobre el filtro de selectividad y la compuerta interna, y que los nanodiscos constituyen un sistema modelo válido para estos estudios, abriendo nuevas perspectivas para investigar las interacciones lípido-proteína en canales iónicos [17,31].

6. Conclusión y proyecciones futuras

El canal de potasio KcsA es la proteína transmembrana homotetramérica que se ha estudiado en este trabajo, logrando la expresión y purificación exitosa de los mutantes KcsA W67, KcsA W67 R64A, KcsA G116C y KcsA R64A G116C y permitiendo el estudio de las transiciones conformacionales del filtro de selectividad (SF) y la compuerta interna mediante anisotropía de fluorescencia $\langle r \rangle$.

Los fosfolípidos aniónicos, como el ácido fosfatídico (PA), modulan directamente la actividad del canal, aumentando la afinidad por K^+ en el SF a pH ácido y elevando el pK_a de apertura de la compuerta interna, facilitando su apertura a pH más neutros [8,18,31]. El PA actúa de forma independiente en ambas compuertas, ya que su efecto persiste en la compuerta interna incluso cuando el SF está bloqueado (KcsA W67 R64A), y no requiere una bicapa lipídica, mostrando el mismo efecto en micelas, liposomas y nanodiscos [19]. Finalmente, los nanodiscos se validaron como un sistema adecuado para este tipo de estudio de interacciones lípido-proteína [16].

Las proyecciones futuras del grupo de investigación podrían centrarse en tres diferentes puntos:

- Analizar el efecto de otros lípidos aniónicos, como fosfatidilserina o fosfatidilglicerol, en ambas compuertas, para determinar si los efectos observados con PA son generalizables a otros fosfolípidos aniónicos y así profundizar en la especificidad de las interacciones lípido-proteína [18].
- Investigar si esta modulación lipídica en KcsA, un canal procariota, se da también en otros canales procariotas y eucariotas, para establecer si hay patrones generalizables en estos procesos
- Estudiar si compuestos farmacológicos hidrofóbicos como ciertos anestésicos, pueden alterar este proceso de modulación lipídica.

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. Lipid Modulation of Ion Channels through Specific Binding Sites. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2014, 1838, 1560–1567, doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.022.
2. Sansom, M.S.P.; Shrivastava, I.H.; Bright, J.N.; Tate, J.; Capener, C.E.; Biggin, P.C. Potassium Channels: Structures, Models, Simulations. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2002, 1565, 294–307, doi:10.1016/S0005-2736(02)00576-X.
3. González, C.; Baez-Nieto, D.; Valencia, I.; Oyarzún, I.; Rojas, P.; Naranjo, D.; Latorre, R. K(+) Channels: Function-Structural Overview. In *Comprehensive Physiology*; Terjung, R., Ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2012; Volume 2, pp. 2087–2149, doi:10.1002/cphy.c110047.
4. Chakrapani, S.; Cordero-Morales, J.F.; Jogini, V.; Pan, A.C.; Cortes, D.M.; Roux, B.; Perozo, E. On the Structural Basis of Modal Gating Behavior in K⁺ Channels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011, 18, 67–74, doi:10.1038/nsmb.1968.
5. Martínez-Rosas, M. Los Canales Iónicos: La Biología y Patología. *Arch. Cardiol. Mex.* 2004, 74, S141–S149.
6. Doyle, D.A.; Cabral, J.M.; Pfuetzner, R.A.; Kuo, A.; Gulbis, J.M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T.; MacKinnon, R. The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K(+) Conduction and Selectivity. *Science* 1998, 280, 69–77, doi:10.1126/science.280.5360.69.
7. Bernèche, S.; Roux, B. A Gate in the Selectivity Filter of Potassium Channels. *Structure* 2005, 13, 591–600, doi:10.1016/j.str.2004.12.019.
8. Renart, M.L.; Giudici, A.M.; Coll-Díez, C.; González-Ros, J.M.; Poveda, J.A. Anionic Phospholipids Shift the Conformational Equilibrium of the Selectivity Filter in the KcsA Channel to the Conductive Conformation: Predicted Consequences on Inactivation. *Biomedicines* 2023, 11, 1376, doi:10.3390/biomedicines11051376.
9. Renart, M.L.; Giudici, A.M.; Díaz-García, C.; Molina, M.L.; Morales, A.; González-Ros, J.M.; Poveda, J.A. Modulation of Function, Structure and Clustering of K⁺ Channels by Lipids: Lessons Learnt from KcsA. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 2554, doi:10.3390/ijms21072554.
10. Uysal, S.; Vásquez, V.; Tereshko, V.; Esaki, K.; Fellouse, F.A.; Sidhu, S.S.; Koide, S.; Perozo, E.; Kossiakoff, A. Crystal Structure of Full-Length KcsA in Its Closed Conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 6644–6649, doi:10.1073/pnas.0810663106.
11. Cuello, L.G.; Jogini, V.; Cortes, D.M.; Pan, A.C.; Gagnon, D.G.; Dalmás, O.; Cordero-Morales, J.F.; Chakrapani, S.; Roux, B.; Perozo, E. Structural Basis for the Coupling between Activation and Inactivation Gates in K⁺ Channels. *Nature* 2010, 466, 272–275, doi:10.1038/nature09136.
12. Marius, P.; Zagnoni, M.; Sandison, M.E.; East, J.M.; Morgan, H.; Lee, A.G. Binding of Anionic Lipids to at Least Three Nonannular Sites on the Potassium Channel KcsA Is Required for Channel Opening. *Biophys. J.* 2008, 94, 1689–1698, doi:10.1529/biophysj.107.117507.
13. Cordero-Morales, J.F.; Cuello, L.G.; Zhao, Y.; Jogini, V.; Cortes, D.M.; Roux, B.; Perozo, E. Molecular Determinants of Gating at the Potassium-Channel Selectivity Filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006, 13, 311–318, doi:10.1038/nsmb1069.
14. Cuello, L.G.; Jogini, V.; Cortes, D.M.; Perozo, E. Structural Mechanism of C-Type Inactivation in K⁺ Channels. *Nature* 2010, 466, 203–208, doi:10.1038/nature09153.
15. Cuello, L.G.; Cortes, D.M.; Perozo, E. The Gating Cycle of a K⁺ Channel at Atomic Resolution. *eLife* 2017, 6, e28032, doi:10.7554/eLife.28032.
16. Matthies, D.; Bae, C.; Toombes, G.E.S.; Fox, T.; Bartesaghi, A.; Subramaniam, S.; Swartz, K.J. Single-Particle Cryo-EM Structure of a Voltage-Activated Potassium Channel in Lipid Nanodiscs. *eLife* 2018, 7, e37558,

doi:10.7554/eLife.37558.

17. 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. Conformational Plasticity in the KcsA Potassium Channel Pore Helix Revealed by Homo-FRET Studies. *Sci. Rep.* 2019, 9, 6215, doi:10.1038/s41598-019-42405-5.
18. Poveda, J.A.; Giudici, A.M.; Renart, M.L.; Millet, O.; Morales, A.; González-Ros, J.M.; Oakes, V.; Furini, S.; Domene, C. Modulation of the Potassium Channel KcsA by Anionic Phospholipids: Role of Arginines at the Non-Annular Lipid Binding Sites. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2019, 1861, 183029, doi:10.1016/j.bbamem.2019.183029.
19. Cheng, W.W.L.; Arcario, M.J.; Petroff, J.T. Druggable Lipid Binding Sites in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels and Transient Receptor Potential Channels. *Front. Physiol.* 2022, 12, 798121, doi:10.3389/fphys.2021.798121.
20. Molina, M.L.; Encinar, J.A.; Barrera, F.N.; Fernández-Ballester, G.; Riquelme, G.; González-Ros, J.M. Influence of C-Terminal Protein Domains and Protein-Lipid Interactions on Tetramerization and Stability of the Potassium Channel KcsA. *Biochemistry* 2004, 43, 14924–14931, doi:10.1021/bi048889+.
21. Weingarth, M.; Prokofyev, A.; van der Cruysen, E.A.W.; Nand, D.; Bonvin, A.M.J.J.; Pongs, O.; Baldus, M. Structural Determinants of Specific Lipid Binding to Potassium Channels. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 3983–3988, doi:10.1021/ja3119114.
22. 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.; et al. Occupancy of Nonannular Lipid Binding Sites on KcsA Greatly Increases the Stability of the Tetrameric Protein. *Biochemistry* 2010, 49, 5397–5404, doi:10.1021/bi1003712.
23. Schwartz, S.E.; Eberhardt, W.H. The Franck-Condon Principle and the Duration of Electronic Transitions. *J. Chem. Educ.* 2023, 100, 87–92, doi:10.1021/acs.jchemed.2c00645.
24. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: Boston, MA, USA, 2006; doi:10.1007/978-0-387-46312-4.
25. Rojas-Valencia, O.G.; Díaz-Santiago, D.L.; Casas-Espínola, J.L.; Reza-San-Germán, C.M.; Estrada-Flores, M.; Torres-Santillán, E. Síntesis de Partículas Luminiscentes de Carbono a Partir de la Carbonización de Beta vulgaris (Betabel). *Pädi Boletín Científico Ciencias Básicas e Ingenierías ICBI* 2023, 10, 1–8, doi:10.29057/icbi.v10i20.9793.
26. dos Santos Rodrigues, F.H.; Delgado, G.G.; Santana da Costa, T.; Tasic, L. Applications of Fluorescence Spectroscopy in Protein Conformational Changes and Intermolecular Contacts. *BBA Adv.* 2023, 3, 100091, doi:10.1016/j.bbadv.2023.100091.
27. Browne, M.A.; Smith, S.S.; Miller, M.S. Anisotropy Imaging Elucidates Dynamic Molecular Interactions. *Photonics.com*. Available online: https://www.photonics.com/Articles/Anisotropy_Imaging_Elucidates_Dynamic_Molecular/a53279 (accessed on 6 March 2025).
28. Chan, F.T.S.; Kaminski, C.F.; Schierle, G.S.K. HomoFRET Fluorescence Anisotropy Imaging as a Tool to Study Molecular Self-Assembly in Live Cells. *ChemPhysChem* 2011, 12, 817–822, doi:10.1002/cphc.201000664.
29. Shrestha, D.; Jenei, A.; Nagy, P.; Vereb, G.; Szöllősi, J. Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 6718–6756, doi:10.3390/ijms16046718.
30. Piston, D.W.; Kremers, G.J. Fluorescent Protein FRET: The Good, the Bad and the Ugly. *Trends Biochem. Sci.* 2007, 32, 407–414, doi:10.1016/j.tibs.2007.08.003.
31. Díaz-García, C.; Renart, M.L.; Poveda, J.A.; Giudici, A.M.; González-Ros, J.M.; Prieto, M.; Coutinho, A. Probing the Structural Dynamics of the Activation Gate of KcsA Using Homo-FRET Measurements. *Int. J.*

- Mol. Sci. 2021, 22, 11954, doi:10.3390/ijms222111954.
32. Alexandrov, A.I.; Mileni, M.; Chien, E.Y.T.; Hanson, M.A.; Stevens, R.C. Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins. *Structure* 2008, 16, 351–359, doi:10.1016/j.str.2008.02.004.
 33. García-Segura, J.M. *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica*; Reverté: Barcelona, Spain, 1996.
 34. Mahler, F.; Meister, A.; Vargas, C.; Durand, G.; Keller, S. Self-Assembly of Protein-Containing Lipid-Bilayer Nanodiscs from Small-Molecule Amphiphiles. *Small* 2021, 17, 2103603, doi:10.1002/smll.202103603.

