



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante  
**Dr. Ramón Latorre**  
Centro de Estudios Científicos

Profesor Co-Patrocinante  
**Dr. Alejandro Reyes**  
Instituto de Bioquímica  
Facultad de Ciencias

**ESTABILIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL SENSOR DE  
POTENCIAL DEL CANAL DE POTASIO HSLO**

Tesis de Grado presentada como parte  
de los requisitos para optar al grado de  
*Licenciado en Bioquímica* y Título  
Profesional de *Bioquímico*

**JOSÉ EDUARDO ANCALAO GIACOMOZZI**

**VALDIVIA – CHILE**

**2005**

*Son lo único que tengo y  
lo que único que amo.*

*Para Wally, por amarme tal cual soy y estar siempre conmigo,  
para Oscarín por darme una razón para vivir y amar,  
y para Sofi, por ser tan bella, quién me alegra solo con mirarme.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero agradecer a todos los que me apoyaron y soportaron en todo el tiempo que dediqué a realizar este proyecto.

Quisiera agradecer al profesor, Dr. Ramón Latorre, mi jefe y tutor, por la confianza depositada en mí al aceptarme en su laboratorio a sabiendas de mi desconocimiento total de la electrofisiología. Usted me enseñó el placer de trabajar, así como también a pensar y estudiar. Y muchas otras cosas que fui observando y aprendiendo de usted. También quisiera agradecer por medio de usted a su esposa, la Sra. Maria Elena, a pesar de lo poco que hemos compartido siempre me ha hecho sentir que es mi amiga.

En segundo lugar quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio que además son mis amigos: Gerardo, Pancho, Ingrid C, Sebastián, Guillermo, Cristian, Yolima, Charlie, Eddy, Luisita y Bruno, Paola, Marcelo e Ingrid O.

No quiero dejar pasar la oportunidad de agradecer en forma especial a Gerardo, quien sin conocerme me ofreció su ayuda, sus conocimientos y experiencias, para hacer de la electrofisiología mi amiga, sin él aún estaría tratando de hacer un "parche", también a Panchito por enseñarme todo los secretos del análisis.

Profesor Rossenmann, como no agradecerle todo el tiempo y paciencia que depositó en este estudiante, quién gracias a su apoyo aprendió y puso en práctica la biología molecular.

Gracias a mi familia por todo el apoyo brindado en todos estos años, mi madre Nelly, mi padre Max y todos mis hermanos Max, Skarllett, Daniel, Gino y también a Max Eduardo.

Don Rudy y Sra. Guille, muchas gracias por darme su cariño y apoyo en todos estos años.

Wallyta, a ti te agradezco de todo corazón todos estos años de compañía y amor, de penas y alegrías, muchas gracias por apoyarme en mi locura y en mis sueños y gracias por darme los mas lindo que tengo en mi vida, Osear y Sofía. Muchas Gracias !!!.

Gracias también, al Instituto de ciencia y tecnología de los alimentos, y todo el personal del instituto de química, Don Emilio Teixidó y la profesora Carmen Alarcón, por permitirme tener un horario flexible y quisiera agradecer en forma especial a la Sra. Alejandra Ordóñez y la Sra. Carmen Peña, mis amigas personales.

Quiero agradecer al Centro de Estudios Científicos (CECS), por brindarme un lugar acogedor y acorde con las necesidades para realizar este trabajo de tesis.

Mis agradecimientos a Don Claudio Bunster, director del CECS y por medio del él a todo el personal que pertenece a este centro.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biofísica y Fisiología Molecular perteneciente al Centro de Estudios Científicos (CECS). El financiamiento de mi persona y del trabajo de investigación se debe al Centro de Estudios (CECS), a FONDECYT, proyecto de responsabilidad del Dr. Ramón Latorre, y a la Iniciativa Científica Milenio (CECS Milenio. ICM P 04-070-F).

**INDICE DE CONTENIDOS.**

	Página
<b>1. RESUMEN.</b>	1
SUMMARY.	2
<b>2. INTRODUCCIÓN.</b>	3
2.1 Antecedentes generales.	3
2.2 Canales MaxiK.	4
2.3 Sensor de potencial.	9
2.4 Red de interacciones electrostáticas.	12
<b>3. OBJETIVOS.</b>	15
3.1 Hipótesis de trabajo y objetivo general.	15
3.2 Objetivos específicos.	16
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	18
4.1 Biología molecular.	18
4.1.1 Cepas bacterianas.	18
4.1.2 Cultivo de bacterias.	18
4.1.3 Transformación de bacterias.	18
4.1.4 Obtención y purificación del DNA plasmidial.	19
4.1.5 Geles de agarosa.	19
4.1.6 Purificación de los ácidos grasos en general.	19
4.1.7 Clones.	20
4.1.8 Mutagénesis.	21
4.1.9 Selección de colonias que contienen la mutación deseada.	22

4.1.10	Transcripción <i>in vitro</i> .	24
4.2	Ranas, oocitos y microinyección.	24
4.2.1	Ranas.	24
4.2.2	Oocitos.	24
4.2.3	Microinyección.	25
4.2.4	Procedimiento de microinyección.	26
4.3	Células.	26
4.3.1	Células.	26
4.3.2	Transfección.	27
4.3.3	Preparación de las células para electrofisiología y para inmunofluorescencia.	27
4.4	Registros electrofisiológicos.	28
4.5	Pipetas de registro.	28
4.6	Solución de registro.	30
4.7	Registro de corrientes macroscópicas.	30
4.8	Procedimiento de registro de las corrientes microscópicas.	31
4.9	Adquisición y análisis de los datos electrofisiológicos.	32
4.10	Inmunofluorescencia y reconstrucción tridimensional (3D).	33
4.10.1	Protocolo para inmunofluorescencia.	33
4.10.2	Observación de la muestras con microscopía confocal.	34
4.10.3	Procesamiento de imágenes y reconstrucción 3D.	34
5.	<b>RESULTADOS.</b>	40
5.1	Expresión de los canales hSlo silvestre y mutantes en oocitos de <i>X. laevis</i> .	40

5.1.1	Propiedades de la activación de los canales hSlo expresados en oocitos de <i>X. laevis</i> .	40
5.1.2	Mutaciones dobles y triples del segmento S4: expresión funcional y características electrofisiológicas de los mutantes.	44
5.1.3	Mutaciones puntuales de los segmentos S2 y S3: expresión funcional y características de los mutantes.	46
5.2	Inmunofluorescencia de los canales hSlo silvestre y mutantes en células HEK 293.	50
5.3	Rescate génico de las mutaciones E180Q y D186N, presentes en el segmento S3 del canal hSlo.	55
5.4	Reconstrucción y colocación 3D de la estructura celular, a partir de series de fotos (z-Stack).	55
6	<b>DISCUSIÓN.</b>	62
6.1	Los canales hSlo expresados en oocitos de <i>X. laevis</i> conservan los rasgos típicos de los canales K <sub>Ca</sub> .	62
6.2	Rasgos estructurales y activación de los canales K <sub>Ca</sub> .	62
6.3	Residuos involucrados en la detección del potencial de membrana en hSlo.	64
6.4	Las mutaciones que suprimen la expresión de las corrientes hSlo plantean interacciones posibles entre los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4.	64
6.5	Rescate génico de los mutantes dobles del segmento S4 con residuos del segmento S3.	67
6.6	Rescate génico del mutante D153N, presente en el segmento S2.	67

		iv
<b>6.7</b>	Reconstrucción y colocación 3D de la estructura celular.	68
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	70
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	71

**INDICE DE FIGURAS**

	Página
<b>Figura 1</b>	Topología y dominios funcionales propuestos para el canal MaxiK. 8
<b>Figura 2</b>	Alineamiento de las regiones S2, S3 y S4 de los canales hSlo y Shaker. 11
<b>Figura 3</b>	Interacciones electrostáticas putativas de los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4 de hSlo. 14
<b>Figura 4</b>	Mapa de restricción de los vectores ZM4 y pcDNA3- <i>myc</i> . 23
<b>Figura 5</b>	Diagrama representativo de los procedimientos utilizados para la fabricación de los mutantes por medio de biología molecular. 29
<b>Figura 6</b>	Ilustración esquemática de los pasos a seguir para la obtención de imágenes 3D. 36
<b>Figura 7</b>	Secuencia de imágenes ( <i>slices</i> ) de una célula HEK 293 obtenidas por microscopía confocal. 37
<b>Figura 8</b>	Diferencias existentes entre una imagen obtenida por microscopía confocal y un <i>slice</i> . 38
<b>Figura 9</b>	Modelo 3D de una célula HEK 193. 39
<b>Figura 10</b>	Registros electrofisiológicos del canal hSlo silvestre. 41
<b>Figura 11</b>	Activación de hSlo por calcio y potencial, Curvas de Po-V a distintas concentraciones de calcio intracelular. 43
<b>Figura 12</b>	Registros electrofisiológicos del canal hSlo silvestre y los mutantes del segmento S4. 45

<b>Figura 13</b>	Registros electrofisiológicos del canal <i>hSlo</i> silvestre y de los mutantes de los segmentos S2 y S3.	47
<b>Figura 14</b>	Registros electrofisiológicos del canal <i>hSlo</i> E180Q.	48
<b>Figura 15</b>	Gráfica de las conductancias de los canales <i>hSlo</i> , silvestre y la mutante E180Q.	49
<b>Figura 16</b>	Imágenes obtenidas con microscopía confocal de células HEK 293, transfectadas con el canal <i>hSlo-myc</i> silvestre.	51
<b>Figura 17</b>	Imágenes obtenidas con microscopía confocal de células HEK 293, transfectadas con los canales R210N-R213Q- <i>myc</i> , R207Q-R210Q-R213Q- <i>myc</i> y R207Q-R210Q- <i>myc</i> .	52
<b>Figura 18</b>	Imágenes obtenidas con microscopía confocal de células HEK 293, transfectadas con los canales R213N- <i>myc</i> , E180Q- <i>myc</i> y D186N- <i>myc</i> .	53
<b>Figura 19</b>	Imágenes obtenidas con microscopía confocal de células HEK 293, transfectadas con los canales D153N- <i>myc</i> y Y163E- <i>myc</i> .	54
<b>Figura 20</b>	Imágenes obtenidas con microscopía confocal de células HEK 293, transfectadas con los canales D153C- <i>myc</i> y D153I- <i>myc</i> .	56
<b>Figura 21</b>	Imágenes obtenidas con microscopía confocal de células HEK 293, transfectadas con los canales E180Q-R207Q-R210Q- <i>myc</i> y E180Q-R210N-R213Q- <i>myc</i> .	57
<b>Figura 22</b>	Imágenes obtenidas con microscopía confocal de células HEK 293, transfectadas con los canales D186N-R207Q-R210Q- <i>myc</i> y D186N-R210N-R213Q- <i>myc</i> .	58
<b>Figura 23</b>	Reconstrucción 3-D de una célula HEK 293 transfectada con el	60

mutante E180Q-*myc*.

<b>Figura 24</b>	Imágenes obtenidas por microscopía confocal y la representación 3D de la colocalización de ambas.	61
------------------	---	----

**ABREVIATURAS**

<b>[Ca<sup>2+</sup>]</b>	Concentración de calcio
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración interna de calcio
<b>K<sub>Ca</sub></b>	Canal de potasio activado por calcio
<b>K<sub>v</sub></b>	Canal de potasio activado por voltaje
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney</i> , células embriónicas de riñón humano
<b>hSlo</b>	<i>Human Slowpoke</i>
<b>V<sub>1/2</sub></b>	Voltaje al cual existe un 50% de probabilidad de encontrar canales abiertos

## 1 RESUMEN.

Los canales activados por voltaje responden a los cambios del potencial de membrana mediante un "sensor de potencial". Se ha demostrado que dicha estructura está formada, al menos en parte, por los segmentos de transmembrana denominados S2, S3 y S4 (Jiang y col. 2003) y se piensa que los residuos cargados presentes en estos segmentos interactuarían electrostáticamente entre ellos estabilizando la estructura y función del sensor. Los puentes salinos formados entre S2, S3 y S4 se encuentran caracterizados sólo para el canal *Shaker* (Papazian y col., 1995).

Para determinar cuales son los residuos ácidos de los segmentos S2 y S3 en el canal *hSlo* que forman puentes salinos con los residuos básicos del segmento S4 se realizaron mutaciones puntuales a estos segmentos del canal y se estudiaron sus efectos en la función del canal mediante electrofisiología y en la expresión de la proteína a través de inmunofluorescencia.

Los resultados muestran que en *hSlo*, a diferencia de *Shaker*, sólo basta la neutralización de cualquier residuo ácido o básico presente tanto en el S2 o S3, para perder la expresión funcional del canal. Además se estableció que los pares R207-R210 y R210-R213 del segmento S4, son importantes para la estructura y función del canal, pues se necesitan mutar ambos para suprimir la expresión. Por otro lado, los residuos D153 del segmento S2, E180 y D186, del segmento S3, son importantes para la correcta maduración del canal y su funcionamiento. La existencia de interacciones electrostáticas entre los residuos presentes en los segmentos S2, S3 y S4 no puede establecerse aún para *hSlo*, ya que es necesario recuperar la expresión de uno de los mutantes, con otra mutación puntual adicional a la que suprime la expresión (rescate génico).

## **1.1 Summary.**

Voltage activated channels respond to changes in membrane potential using a "voltage sensor". It has been demonstrated that this structure is formed, at least in part, by transmembrane domains denominated S2, S3, and S4 and it is thought that the charged residues in those segments interact electrostatically to stabilize the structure and the function of the sensor. However, it is only in the Shaker channel that the salt bridges formed between S2, S3, and S4 have been found and characterized.

To determine which residues in segments S2 y S3, of the channel hSlo, form salt bridges with charged residues in S4 we have made point mutations in these segments and studied their effects on channel function using electrophysiological methods as well as protein expression using immunofluorescence.

Our results show that in hSlo, unlike Shaker, neutralizing any charged residue that may form a salt bridge with the S4 segment results in a loss of functional channel expression. It was found that residues D153 of segment S2 and E180 and D186 of segment S3 are important for the correct maturation of the channel and its functionality. What is more interesting, however, is that it was found that not only are the pairs R207-R210 and R210-R213, in the S4 segment, important for the structure and function of the channel but it is only when you mutate both residues in a pair that you suppress expression. Moreover, the existence of electrostatic interactions between the residues present in segments S2, S3 and S4 could not be established for hSlo because expression of the mutants cannot be rescued by an additional point mutation of the paired, charged residue as has been shown in Shaker.

## 2 INTRODUCCION.

### 2.1 *Antecedentes generales.*

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana cuyas cadenas polipeptídicas se organizan formando un túnel acuoso, que regula el paso de iones a través de ellos de manera selectiva. Desde el punto de vista funcional pueden ser considerados como enzimas, encargadas de catalizar el paso de una partícula cargada a través de un medio hidrófobo que se caracteriza por una constante dieléctrica baja ( $\epsilon \approx 2$ ; Hille, 2001). Son selectivos a ciertos iones y poseen una regulación de la apertura y cierre de la vía de conducción (conformaciones abierta y cerrada, respectivamente) (Hille, 2001). A diferencia del transporte activo, cuando el canal se abre, el paso de los iones es pasivo, es decir, el transporte de los iones se realiza siempre a favor del gradiente electroquímico.

En una clasificación elemental podemos distinguir dos grupos fundamentales: los canales iónicos altamente selectivos y los canales de iones poco selectivos. En el primer grupo encontramos a los canales de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Cl^-$ . Aquí es importante destacar la gran selectividad de los canales de  $K^+$ , que son capaces de discriminar el ión  $K^+$  con una eficiencia 100 veces mayor sobre el ión  $Na^+$  con igual carga y menor radio atómico (Hille, 2001). En el segundo grupo encontramos los canales de acetilcolina y los canales activados por AMPc y GMPc; estos son menos selectivos y conducen indistintamente  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  (Kaupp, 1991; Hille, 2001; Finn y col. 1996).

Los canales de iones pueden adoptar dos conformaciones: cerrado y abierto. En condiciones basales se encuentran cerrados y no hay conducción de iones. Una vez que el canal ha sido activado, se produce la apertura del poro y la conducción de los iones se realiza a favor del gradiente electroquímico. Algunos canales son activados por cambios en el potencial eléctrico a través de la membrana. Estos canales se definen

como dependientes de voltaje. Otros son activados por ligandos químicos, ya sean neurotransmisores o ciertos cationes entre los cuales podemos destacar al ión  $\text{Ca}^{2+}$ . Existe dentro de esta clasificación un ejemplo de activación mixta. El canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) donde la apertura es regulada tanto por el potencial de membrana como por la unión del ión  $\text{Ca}^{2+}$ . (Blatz y Magleby, 1987; Latorre y col., 1989; McManus, 1991; Hille, 2001; Latorre, 1994).

Los canales dependientes de voltaje poseen 6 segmentos de transmembrana, el cuarto segmento (S4), debido a que posee aminoácidos cargados positivamente, se cree que sería el responsable de detectar el potencial de membrana y ser, por lo tanto, parte del sensor de potencial.

## **2.2 Canales MaxiK.**

Los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje y activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta conductancia, hSlo, BK, o MaxiK, se expresan en muchos tipos diferentes de células excitables, como por ejemplo: neuronas, músculo liso, músculo estriado, células secretoras, epitelios, fibroblastos y linfocitos, entre otros (Meech, 1978; Blatz y Magleby, 1987; Latorre y col., 1989; McManus, 1991; Toro, 1991). La diversidad de los roles que los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  tienen en la fisiología de la célula es muy amplia e imposible de detallar en esta tesis. Con el fin de ilustrar la diversidad se describirá brevemente algunos sistemas donde la función de estos canales ha sido elucidada.

En neuronas y músculo de invertebrados, los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  están involucrados en la fase rápida de repolarización del potencial de acción (Meech, 1978) y por lo tanto son en parte responsables de la forma de las espigas (Adams y col., 1982; Elkins y col., 1986).

Los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  juegan un rol importante en el control de la actividad contráctil del

músculo liso del útero. El bloqueo específico de estos canales con iberitoxina (IbTX) induce la contracción del músculo uterino humano (Ander y col., 1993; Toro y col., 1998). Cuando la toxina se aplica a células de miometrio humano en cultivo, se induce una despolarización de la membrana. El cambio en el potencial de membrana produce a su vez una activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de potencial que tiene como resultado un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la contracción del músculo liso (Ander y col., 1993).

Se ha propuesto que los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  presentes en el músculo liso de las arteriolas cerebrales, regularían el tono vascular intrínseco a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Brayden y Nelson, 1992; Nelson y col., 1995). Cuando la presión intravascular aumenta, el músculo liso de las arteriolas se despolariza y se contrae como resultado de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de calcio dependientes del potencial (Nelson y col., 1990). La entrada de calcio activa a su vez canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , hiperpolarizando la membrana y relajando el músculo liso arteriolar; los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  funcionarían como sensores endógenos del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, formando parte de un ciclo de retroalimentación negativa con una función vasodilatadora de las arterias (Brayden y Nelson, 1992).

Los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  también están involucrados en la fisiología de los receptores olfatorios (Morales y col., 1995). Cuando las neuronas del epitelio olfativo de la rana son expuestas a odorantes pútridos, las neuronas desarrollan un potencial de receptor hiperpolarizante que inhibe la descarga de potenciales de acción. Esta respuesta se debe a una corriente de  $\text{K}^+$  que depende del  $\text{Ca}^{2+}$  externo y es inhibida por una concentración nanomolar de caribdotoxina, un bloqueador peptídico de los canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (Miller y col., 1985).

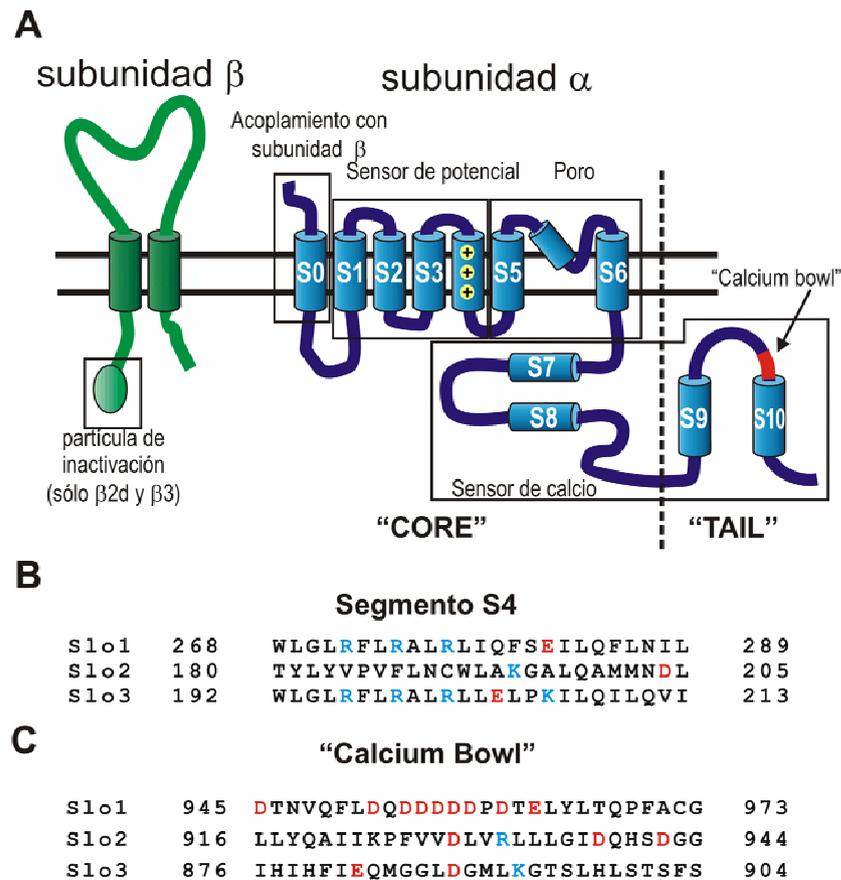
El canal MaxiK es sensible al potencial de membrana y al calcio intracelular, y

aumenta su actividad o probabilidad de apertura cuando la concentración de calcio intracelular se incrementa o cuando el potencial de membrana se hace más positivo. Al ser un canal de potasio tiende a hiperpolarizar la membrana; por esto el canal MaxiK constituye un mecanismo de retroalimentación negativa para aquellos eventos excitatorios que conducen a aumentos de calcio intracelular o despolarización de la membrana celular y de esta manera previene a las células de una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  durante condiciones patofisiológicas (Lawson, 2000).

Estructuralmente el canal MaxiK esta formado por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$  (Fig. 1). Las subunidades  $\alpha$  forman el túnel acuoso o poro de conducción, por donde los iones atraviesan la membrana. La subunidad  $\beta$  es una proteína accesoria y que tiene una función reguladora. El gen que codifica la subunidad  $\alpha$  fue clonado de la mosca *Drosophila melanogaster*. Se denominó como *Slo* debido a que se clonó usando el mutante *slowpoke*, los animales que poseen este gen, vuelan muy mal en comparación a las moscas silvestres y éstos después de ser expuestos a una luz brillante o a ser expuestas a un pulso de calor exhiben un fenotipo denominado 'pies-pegajosos' (Atkinson y col., 1991). A medida que se fueron clonando mas canales de la misma familia, fue necesario numerar cada nuevo canal correlativamente de acuerdo a su aparición, el primer canal clonado se llamo *Slo1*, el segundo *Slo2* y así sucesivamente. De la secuencia del gen que codifica para esta proteína (*Slo1*) se demuestra que pertenece a la familia de los canales de potasio dependientes de potencial. Sin embargo, poseen ciertas características que hacen de estos genes *Slo* una familia particular de canales de potasio. Una de las características principales es la existencia de un segmento de transmembrana adicional, mientras que los canales de potasio dependientes de potencial tipo *Shaker* poseen 6 segmentos de transmembrana, el canal MaxiK tiene 7 (Meera y col., 1997). Este segmento adicional se denomina *S0* y se

encuentra hacia el extremo amino terminal (N-terminal), los segmentos S1 a S6 son homólogos a los 6 segmentos de transmembrana de los canales Kv. Los segmentos S1 a S4 forman lo que se denomina el sensor de potencial, y el segmento S4 tiene un papel importante en esta estructura al poseer 3 aminoácidos con carga positiva (Diaz y col. 1998). (Fig. 1A-B). Cuando el potencial de membrana cambia, las cargas presentes en este segmento se mueven siguiendo el campo eléctrico aplicado y su movimiento está acoplado a la apertura del canal. Además, el movimiento de las cargas del sensor de potencial origina las denominadas “corrientes de compuerta” (*gating currents*) que es una de las características de los canales dependientes de potencial (Armstrong y Bezanilla, 1973; Stefani y col., 1997; Bezanilla, 2000; Hille, 2001).

Al igual que en el resto de los canales de potasio, los segmentos S5-S6 forman el poro o vía de conducción (Fig. 1A). Entre ambos segmentos, se encuentra el dominio denominado filtro de selectividad, una secuencia conservada en todos los canales de potasio y que es responsable de la selección de iones potasio por sobre los iones sodio. En particular, la secuencia de aminoácidos TVG(Y/F)GD (T: treonina, V: valina, G: glicina, Y: tirosina, F: fenilalanina, D: ácido aspártico) se encuentra en todos los canales de potasio conocidos y es el motivo central del filtro de selectividad. La cristalización y resolución de la estructura por difracción de rayos-X del canal de potasio bacteriano KscA, entregó importantes datos acerca de la relación estructura-función tanto del filtro de selectividad como del poro o vía de conducción de los canales de potasio (Doyle y col., 1998; Roux y Mackinnon, 1999; Zhou y col., 2001).



**Figura 1. (A)** Topología y dominios funcionales propuestos para el canal MaxiK. Se incluye también la topología propuesta para las subunidades  $\beta$ . Cada canal está formado por un tetrámero de subunidades  $\alpha$ , con 0 a 4 subunidades  $\beta$ . **(B)** Alineamiento de secuencias de los segmentos S4. **(C)** Alineamiento de secuencias del inicio de S10, donde se encuentra el “Calcium Bowl” en Slo1. Modificado de Orio y col., 2002.

Un dominio que se encuentra entre el segmento de transmembrana S6 y el segmento hidrófobo S7 tiene cierta similitud de secuencia con un dominio denominado RCK (*regulatory of conductance for K<sup>+</sup>*), presente en muchos canales de potasio y cuya estructura se conoce para el canal de potasio de *Escherichia coli* y un canal de *Methanobacterium thermoautotrophicum* conocido como MthK (Jiang y col., 2001; Jiang y col., 2002). En el canal MthK, la unión de calcio a este dominio induce cambio de conformaciones que resulta en la apertura de la compuerta del canal.

Otra de las características del canal MaxiK, y a la cual debe su nombre, es una gran conductancia de canal único. En condiciones de potasio simétrico 150 mM, cada canal MaxiK tiene una conductancia de 250-300 pS, la mayor entre todos los canales de potasio conocidos (Hille, 2001).

### **2.3 Sensor de potencial.**

En la década de los cincuenta Hodgkin y Huxley (1952) fueron los primeros en proponer la existencia de partículas cargadas que se reorganizan frente a los cambios de potencial en el campo eléctrico transmembranal, permitiendo la conducción de iones. Los mecanismos que determinan la apertura pudieron ser comprendidos solo veinte años más tarde mediante el registro de las corrientes de compuerta (Armstrong y Bezanilla, 1973; Keynes y Rojas, 1974). Estas corrientes representan el movimiento de los aminoácidos cargados a través del campo eléctrico transmembranal que conducen a la apertura del canal.

Existe un segmento de transmembrana fuertemente conservado dentro de la familia de los canales de K<sub>v</sub>, el segmento S4. Su secuencia polipeptídica presenta varios aminoácidos cargados, en su mayoría lisinas y argininas, cuyo número dependiendo del tipo de canal de potasio varía desde 3 hasta 7, y están separados entre sí por 2

aminoácidos hidrófobos. La naturaleza cargada del segmento S4 lo convirtió desde el comienzo en el mejor candidato para funcionar como sensor de potencial. Esta hipótesis fue primero comprobada en los canales de  $\text{Na}^+$  (Stühmer y col., 1989), y más tarde para los canales de  $\text{K}^+$  (Papazian y col., 1991).

Diaz y col. (1998) demostraron la participación del segmento S4 como parte del sensor de potencial en los canales de  $\text{K}_{\text{Ca}}$ . De ese estudio se encontró que solo las neutralizaciones en las argininas (R) 210 y 213, reducen en forma significativa la dependencia de potencial del canal hSlo (Diaz y col., 1998) (Fig. 2).

Casi todos los modelos para el sensor de voltaje muestran al S4 como una  $\alpha$ -hélice con sus residuos Arg completamente o la mayor parte de ellos secuestrados de la membrana lipídica para proteger a las cargas de la baja constante dieléctrica (Elinder y col., 2001; Bezanilla, 2002; Horn, 2002; Gandhi e Isacoff, 2002; Laine y col., 2004). Para conseguir esto, en muchos modelos se ha propuesto que el segmento S4 debe estar inserto entre las subunidades adyacentes del canal de  $\text{K}^+$  tetramérico, de manera tal que las  $\alpha$ -hélices de los segmentos S5 y S6 formen una pared a un lado del segmento S4 y las  $\alpha$ -hélices de los segmentos S1-S3 forman una pared al otro lado. De esta manera delimitan un perímetro de contacto con los lípidos, para crear una estructura parecida a un tubo o canalículo para que el segmento S4 pueda moverse y de esta manera activar al canal (Li-Smerin y col., 2000; Bezanilla, 2002; Horn, 2002; Gandhi e Isacoff, 2002; Laine y col., 2004).

Este tipo de ordenamiento permitiría al segmento S4 mover sus aminoácidos cargados a través de la membrana sin exponerlos al entorno lipídico.

## Alineamiento Shaker y hSlo

<b>S2</b>	Shaker	PFFLI <b>E</b> TLCIIWFT <b>F</b> ELTVRFLACPNKL	305
	hSlo	FTLQIDMAFNVFLL <b>Y</b> FGLRFIAANDKL	175
<b>S3</b>	Shaker	NFCR <b>D</b> VMNVID <b>D</b> IIAIIIPYFITLAT	329
	hSlo	WFWL <b>E</b> VNSV <b>D</b> FFTVPVFSVYL	199
<b>S4</b>	Shaker	LAILR <b>V</b> IR <b>L</b> VR <b>V</b> ER <b>I</b> FKLSRHSKGLQILG	386
	hSlo	NRSWLGLR <b>R</b> FL <b>R</b> AL <b>R</b> LIQFSEILOFLNILK	228

**Figura 2.** Alineamiento de las regiones S2, S3 y S4 de los canales hSlo y Shaker. Los segmentos se definieron de acuerdo al análisis de hidrofobicidad y a la abundancia de aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos conservados cargados negativa y positivamente se destacan con letras rojas y azules, respectivamente. Los números ubicados a la derecha de cada fila corresponden a la posición del último residuo en sus respectivas proteínas. (Figura modificada de Wallner y col., 1996).

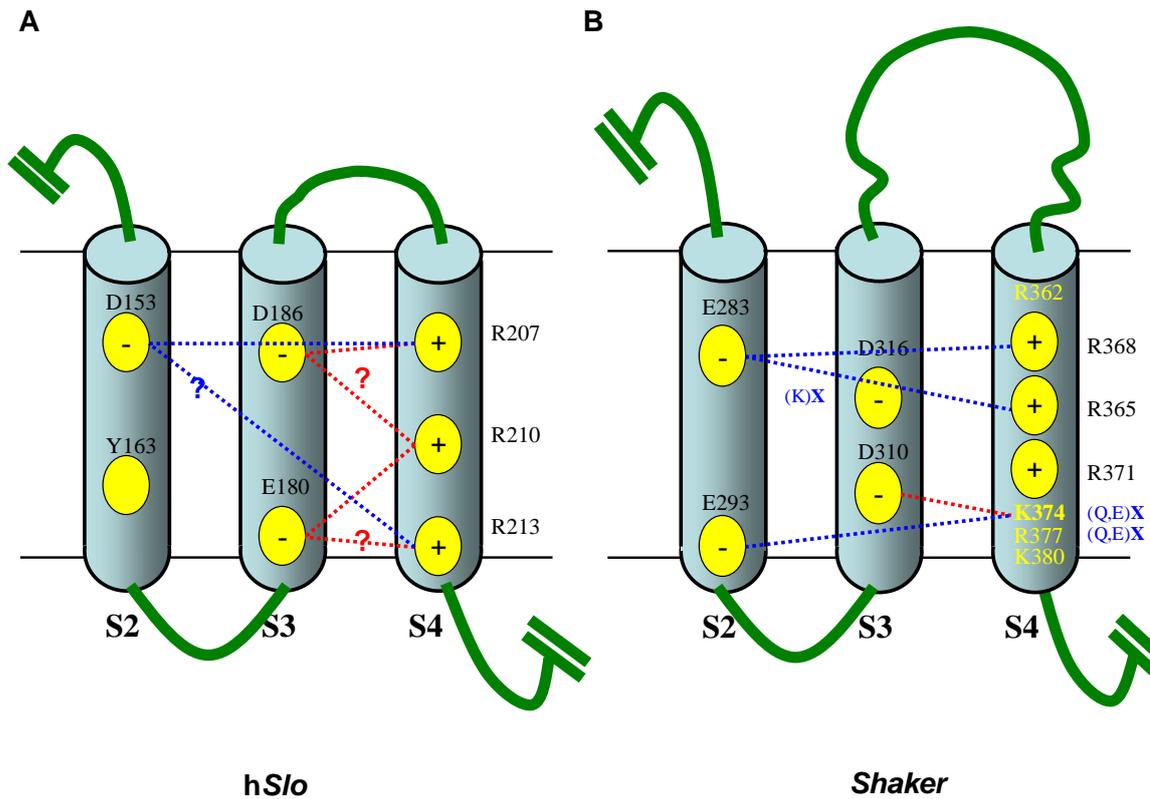
## **2.4 Red de interacciones electrostáticas.**

Otros estudios (Papazian y col., 1995; Seoh y col., 1996; Tiwari-Woodruff y col., 1997; Tiwari-Woodruff y col., 2000; Papazian y col., 2002; Silverman y col., 2003) dilucidaron y explicaron la existencia de una red de interacciones electrostáticas entre residuos del segmento S4 y residuos adyacentes, presentes en los segmentos S2 y S3 de *Shaker* (Fig. 3B). Los experimentos consistían en neutralizar individualmente todos los residuos cargados presentes en los segmentos S2, S3 y S4 de *Shaker*, si alguna de estas mutaciones suprimía la expresión funcional del canal, se debía a que dicho residuo debería estar formando un “puente salino” con otro residuo, que podría estar tanto en el segmento S2, en el segmento S3 o en ambos segmentos transmembrana. Para conocer cuales eran esos residuos, se realizaron mutaciones puntuales sobre los mutantes del canal de *Shaker* que producto de la mutación inicial, no se expresaron. De esta manera si la mutación de un nuevo residuo recuperaba la expresión funcional del canal *Shaker*, se concluye que ambos residuos estarían interactuando electrostáticamente. Estas interacciones estabilizarían la estructura de la proteína, así como también la harían funcional ya que neutralizarían algunos de los residuos cargados que son importantes para la apertura (*gating*) del canal.

En los últimos años se ha avanzado mucho en la determinación de la estructura de los canales de  $K^+$ . Ha contribuido a ello, la obtención de la estructura cristalina de un canal  $K^+$  bacteriano dependiente de potencial (Jiang y col., 2003) y recientemente de un canal K eucarionte dependiente de potencial (Long y col., 2005 a; Long y col., 2005 b), la que ha sido crucial para reordenar las ideas y conceptos que se tenían hasta ahora. Sin embargo, la estructura cristalina del canal de  $K^+$  bacteriano han sido bastante polémica; no obstante, tras la obtención de la estructura cristalina del sensor de voltaje

aislado del resto de la proteína (Jiang y col., 2003) y la observación de ambos cristales, se puede apreciar que se conservan las interacciones que forman la “red electrostática” que estabiliza al canal.

Con todos estos datos experimentales y cristalográficos con que se dispone, no debería ser un problema la carencia de una estructura cristalina del canal MaxiK, para proponer un modelo estructural de las interacciones electrostáticas. En *Shaker*, se realizaron estudios de este tipo mucho antes de la existencia de la estructura cristalina de algún canal de iones y los resultados obtenidos concuerdan con los arrojados por la estructura cristalina (Papazian y col., 1995; Seoh y col., 1996; Tiwari-Woodruff y col., 1997; Tiwari-Woodruff y col., 2000; Papazian y col., 2002; Silverman y col., 2003).



**Figura 3. (A)** Interacciones electrostáticas putativas de los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4 de hSlo. **(B)** Interacciones descritas para *Shaker*. Los residuos cargados y análogos según alineamiento de Fig. 2, se representan como círculos amarillos; las cargas de los residuos se representan como signos + y -, para positivo y negativo, respectivamente; los residuos cargados restantes en *Shaker* se representan con letras y números amarillos; las líneas punteadas representan las interacciones entre los segmentos (azul, S2-S4; rojo, S3-S4); los signos de interrogación indican las interacciones que se proponen para hSlo. En *Shaker* los residuos que al ser mutados no producen canales funcionales se indican, mostrando en azul la letra del residuo por el cual se mutó, seguido de una X.

### 3 OBJETIVOS.

#### 3.1 *Hipótesis de trabajo y objetivo general.*

La hipótesis de trabajo propuesta es que **los residuos cargados de los segmentos S2 y S3 del canal de potasio hS/o se encuentran formando puentes salinos con los residuos del segmento S4, estabilizando de esta manera la estructura del canal y su sensor de potencial de membrana.**

Para comprobar la hipótesis de trabajo se propuso como objetivo general, **determinar cuales son los residuos presentes en los segmentos S2 y S3 del canal de potasio hS/o que forman puentes salinos con los residuos cargados en el segmento S4.**

La realización de los objetivos específicos contribuirá a un mejor entendimiento de la relación estructura función del canal hS/o y su sensor de potencial de membrana.

### **3.2 Objetivos específicos.**

Para alcanzar estos propósitos, se proponen los siguientes objetivos específicos.

- a) Construcción de mutantes del canal hS/o, los cuales presentan mutaciones puntuales que neutralizan cargas localizadas en los segmentos transmembrana S2, S3 y S4.**

Como se discutió anteriormente, hay datos experimentales que apoyan la existencia de una “red electrostática” en *Shaker*. Esto se determinó neutralizando cada uno de los residuos cargados, presentes en los segmentos que se cree conforman el sensor de potencial de este canal, los segmentos S2, S3 y S4. Se hace necesario neutralizar dichas cargas presentes en el canal de estudio, hS/o, para que de esta manera se pueda establecer la “red electrostática” que estaría estabilizando la estructura de este canal.

- b) Caracterización de los mutantes por medio de técnicas electrofisiológicas, *voltage clamp*.**

Los canales con mutaciones en el sensor de potencial, deberían tener un comportamiento distinto al del canal hS/o silvestre, ya que se estaría introduciendo un residuo cargado en un medio hidrófobo (bicapa). Y esto favorece una de las conformaciones del canal, abierto o cerrado. Esto se traduce en la necesidad de potenciales de membrana menores o mayores que los empleados en el canal silvestre.

Esto se observará midiendo como cambian parámetros como el voltaje al cual existe un 50 % de probabilidad de encontrar canales abiertos ( $V_{1/2}$ ), y la sensibilidad a  $Ca^{2+}$  de los mutantes con respecto al canal hS/o silvestre.

**c) Caracterización de los mutantes por medio de técnicas inmunofluorescencia.**

En *Shaker* la neutralización de 1 de los 2 residuos presentes en el segmento S2 inhibe la expresión del canal, lo mismo ocurre si se neutralizan 2 residuos por separado de los 7 que *Shaker* posee en el segmento S4. En cambio en hS/o, la neutralización individual de cada uno de los residuos cargados presentes en los segmentos S2, S3 y S4, no produce canales funcionales.

Las técnicas electrofisiológicas proporcionan datos de funcionalidad, para saber si el canal no se expresa (la maduración de la proteína es interrumpida y se queda en algún sitio intracelular), o se expresa y no es funcional (el canal llega a la membrana celular, pero no puede conducir iones). Se realizarán experimentos de inmunofluorescencia, en los cuales se observará la localización de los canales, silvestre y mutantes, expresados en células HEK 293. De esta manera, se podrá saber si las mutaciones afectan solo el funcionamiento (*gating*) o la maduración del canal (plegamiento y/o señalización).

**d) Rescate génico de cada mutación, y su posterior comprobación por medio de técnicas electrofisiológicas y de inmunofluorescencia.**

Una vez que se conozcan las mutaciones que afectan el funcionamiento y/o expresión del canal hS/o, se utilizarán estos canales mutantes como templado para realizar mutaciones puntuales de los residuos que se cree, por analogía con el canal *Shaker*, deberían estar interactuando en los distintos segmentos de transmembrana. De esta manera se debería recuperar la expresión del canal mutante que se utilizó como templado (rescate génico).

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **4.1 *Biología molecular.***

#### **4.1.1 Cepas bacterianas.**

La cepa bacteriana (*E. coli*) utilizada fue *DH5 $\alpha$* , que se usó para amplificar las secuencias de la subunidad  $\alpha$  del canal *hSlo* clonada en el vector pGEMzf9- (Promega Corp., Madison, WI USA).

#### **4.1.2 Cultivo de bacterias.**

Un inóculo con la cepa transformada con el plasmidio de interés se creció en 250 ml de medio líquido con agitación constante a razón de 225 ciclos/minuto en un agitador orbital a una temperatura de 37 °C en medio Luria-Bertani (LB). Para los cultivos en medio sólido, se usó el medio líquido suplementado con agar al 1,5% (Sambrook y col., 1989). Todos los medios fueron autoclavados a 125 °C y 15 psi.

#### **4.1.3 Transformación de bacterias.**

Las bacterias competentes fueron obtenidas siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Díaz, 1998); estas bacterias son incubadas en 0,75  $\mu$ L de DMSO o en  $\beta$ -mercaptoetanol (22 mM final), durante 10 minutos en hielo. Se añadió entonces 1 ng de DNA plasmidial y se incubó en hielo durante 30 minutos antes de someter a las bacterias a un choque térmico de 42 °C durante 90 segundos. Luego de transferirlas al hielo por 2 minutos, las bacterias se crecieron durante 45 minutos en 5 ml de medio líquido sin antibiótico, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico codificada por el plasmidio. El cultivo se transfirió a la placa con medio sólido suplementadas con antibiótico y se incubaron a 37 °C, durante 12 a 16 horas. La selección de las bacterias transformadas se realizó de acuerdo a la resistencia al

antibiótico impartida por el plásmido

#### **4.1.4 Obtención y purificación del DNA plasmidial.**

El DNA fue obtenido desde el cultivo de bacterias crecido durante toda la noche a 37 °C, con agitación constante. Para obtener pequeñas cantidades de DNA plasmidial (menos de 5 µg), éste se purificó con las columnas MINI según indicaciones del fabricante (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA USA). Para obtener grandes cantidades de DNA (alrededor de 50 µg) se utilizaron columnas MIDI (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA USA) según indicaciones del fabricante. El DNA se resuspendió en un volumen adecuado de TE (Tris 10 mM-EDTA 1mM, pH 8), o en agua libre de RNAsas.

#### **4.1.5 Geles de agarosa.**

La integridad del ácido nucleico se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa (0,7 % a 0,9 %) según su patrón de migración, con relación a estándares de peso molecular y concentración conocidas. Los geles se sumergieron en buffer TAE y la electroforesis se realizó aplicando una corriente de 10 mA. El DNA se tiñó con bromuro de etidio 0,66 µg/µL (a partir de una solución 10 mg/mL). La concentración de los ácidos nucleicos se determinó de una alícuota de DNA en TE o agua, midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Genesis™ 2 (Spectronic Instrument, Rochester, USA). Luego se tomaron fotografías de los geles con una cámara digital Nikon (Nikon, USA), con un filtro UV.

#### **4.1.6 Purificación de los ácidos nucleicos en general.**

La purificación del DNA, que posteriormente será sometido a tratamientos enzimáticos, ya sea digestión con enzimas de restricción o transcripción *in vitro*, se efectuó mediante una extracción en fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1)

seguida de dos extracciones en cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y precipitación en presencia de acetato de potasio (0,3 M) y 2,5 volúmenes de etanol. Luego de sedimentar los ácidos nucleicos en una minicentrífuga, el precipitado se lavó dos veces con etanol 70%. La integridad del ácido nucleico se verificó según su patrón de migración en geles de agarosa (0,7% a 0,9%), teñidos con bromuro de etidio 0,66 µg/µL (a partir de una solución de 10 mg/mL). La estimación del peso molecular se realizó por comparación con marcadores de peso molecular y concentración conocidos. En estos geles también se puede obtener una estimación cuantitativa de la muestra en cuestión. El DNA y el RNA se resuspendieron en 1 ml de tampón amortiguador TE o agua libre de RNAsas, respectivamente, para obtener las concentraciones finales deseadas. La concentración fue comprobada por absorbancia a 260 nm.

#### 4.1.7 Clones.

Todos los experimentos se realizaron con la subunidad  $\alpha$  del canal de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$ , hSlo. Este canal fue clonado del miometrio humano y la secuencia nucleotídica y la estructura primaria deducida, se encuentran disponibles en GENBANK bajo el número de acceso U11058 (Wallner y col., 1995). El DNA fue donado por la Dra. Ligia Toro (UCLA) en los vectores pGEMzf9 o ZM4 (utilizado para transcripción *in vitro*) y pcDNA3-*myc* (utilizado para la transfección de células HEK 293) (Fig. 4). Este último vector posee una versión del canal hSlo que tiene en su extremo N-terminal una secuencia que sirve de epítipo denominada *c-myc*. El epítipo *c-myc* es una secuencia de 10 aminoácidos (EQKLISEEDL) comprendida entre los residuos 410 y 419 de la proteína *c-myc* humana (Evan y col., 1985). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas nucleares que se encuentran en varios tipos de tumores humanos. Este epítipo es reconocido por el anticuerpo monoclonal de ratón *Anti-c-myc* (clon

9E10), el cual fue usado originalmente para estudiar el rol de la proteína *c-myc*.

#### 4.1.8 Mutagénesis.

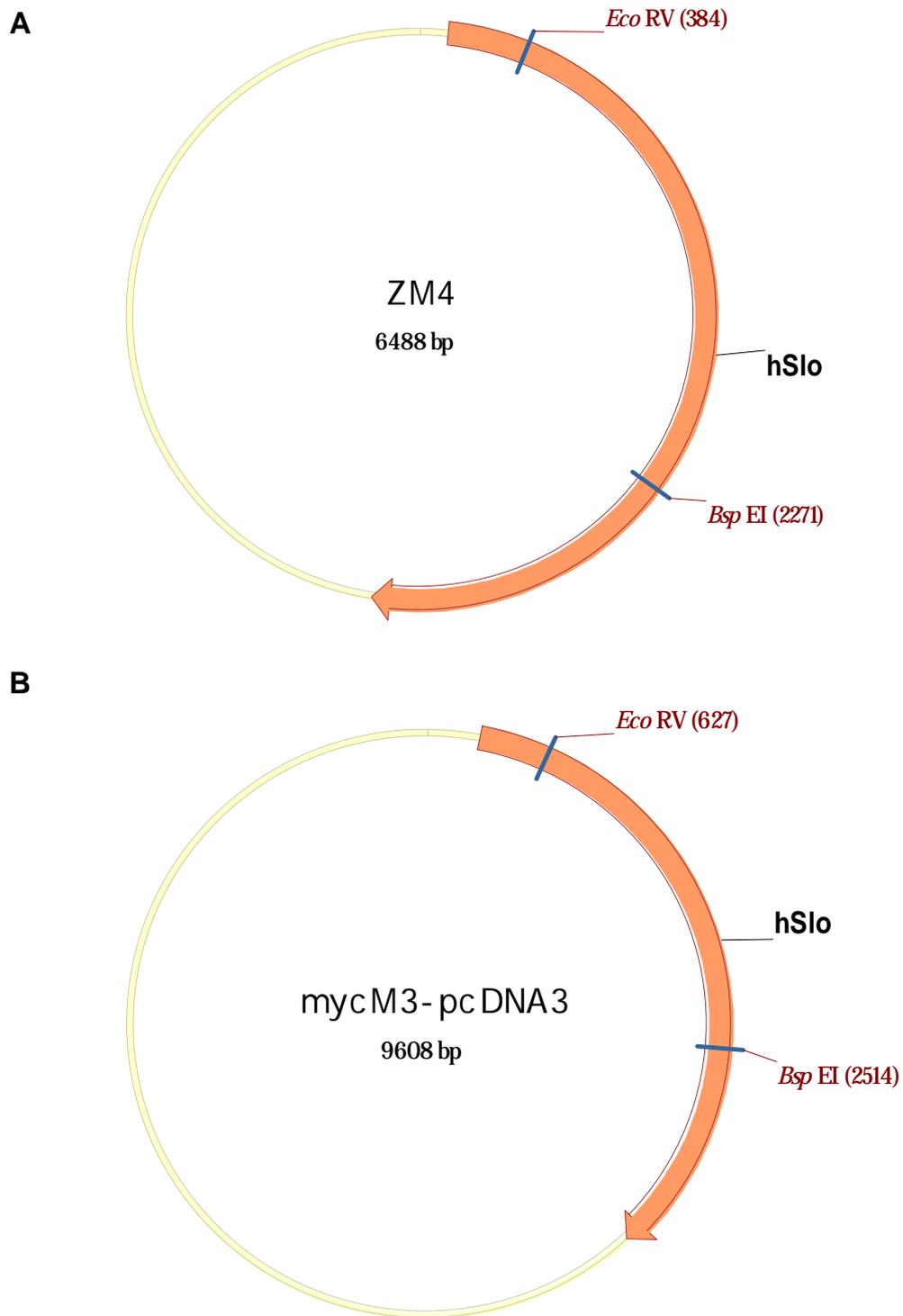
La mutagénesis puntual del cDNA *hSlo* se realizó con el procedimiento de mutagénesis mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Horton y col., 1990). El método utilizado se denomina extensión de partidores (*primers extension*). Un requerimiento previo es la presencia de dos sitios únicos de restricción en los extremos de la zona a ser mutada. Al comienzo de la reacción las dos hebras de DNA son amplificadas separadamente usando dos partidores para cada una de las hebras. En la reacción 1 (**PCR-A**) se usa un partidador mutagénico (**1M**) y un partidador externo universal **1**, es decir, distal a la mutación y a uno de los sitios de restricción mencionados. Los partidores mutagénicos contienen los codones de la mutación que se quiere introducir y fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (Coralville City, IA, USA). En la reacción 2 (**PCR-B**) se usa un partidador mutagénico **2M**, que es parcialmente complementario al partidador **1M**, y un partidador externo universal, **2**. Los fragmentos generados en la reacciones **A** y **B**, contienen la mutación en ambas hebras, y se sobreponen parcialmente en los extremos que poseen la mutación. Estos fragmentos se purifican y se extienden en una tercera reacción de PCR en presencia de los partidores externos **1** y **2**. El fragmento generado está limitado por los extremos 5' de los partidores **1** y **2**, y posee la mutación en ambas hebras (Fig. 4). El producto final es digerido con *EcoRV* y *BspEI* para obtener un inserto que posteriormente será subclonado en el cDNA *hSlo* silvestre y en el cDNA *hSlo-myc* silvestres, previamente tratados con las mismas enzimas de restricción (Fig. 5A).

Para subclonar el producto de las dos reacciones de PCR que contiene la mutación puntual en el codón seleccionado, se procedió a realizar la digestión de los fragmentos

con las enzimas de restricción EcoRV y BspEI. Adicionalmente los vectores ZM4 y pcDNA3-*myc* fueron digeridos con las mismas enzimas, obteniéndose un DNA lineal con extremos cohesivos. Estas enzimas tienen un sitio único de corte en el vector ZM4. Luego de la doble digestión se recuperaron los fragmentos de interés (1887 pb en el caso del inserto y un fragmento de 4601 pb para el vector ZM4 y 1887 pb para el inserto y 7721 pb, respectivamente, para el vector pcDNA3-*myc*. (Fig. 4). En los geles preparativos de agarosa 1%, mediante electroelución. Con el fin de evitar la recircularización del vector ZM4, el fragmento previamente digerido fue desfosforilado en su extremo 5' con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de bovino (Promega Corp., Madison, WI USA). Para separar el DNA de la enzima se efectuó una extracción en una solución fenol-cloroformo seguida de una en cloroformo-isoamílico, para finalmente precipitarla acetato de sodio y resuspenderlo en el tampón TE. Posteriormente el inserto producto del PCR y el vector desfosforilado se ligaron con 2 unidades de la enzima DNA ligasa T4 (Promega Corp., Madison, WI USA) para generar el vector con la mutación introducida.

#### **4.1.9 Selección de colonias que contienen la mutación deseada.**

Una vez obtenido el vector con la mutación requerida dentro de su secuencia nucleotídica, se procedió a la transformación de bacterias DH5 $\alpha$  con 50 ng de DNA mutagénico y con el vector ZM4 desfosforilado previamente incubado con 2 unidades de la DNA ligasa T4; este fue utilizado como control en la selección de colonias. El crecimiento de las bacterias se verificó en placas de agar-ampicilina, que fueron incubadas por 24 horas a 37 °C. Desde cada una de las placas se tomaron 4 colonias para su posterior secuenciación.



**Figura 4.** Mapa de restricción de los vectores ZM4 (**A**) y pcDNA3-*myc* (**B**) con el inserto (hSlo). El DNA circular de los plasmidios se representa con línea amarilla. En color naranja se destaca la secuencia del canal.

#### **4.1.10 Transcripción *in Vitro*.**

La transcripción se realizó usando como templado un DNA plasmidial previamente linearizado, en un sitio único (NotI o HindIII). La purificación del DNA linearizado y toda su manipulación posterior se hizo en condición libre de RNAsas. La linearización se verificó en un gel de agarosa al 0,7%.

La reacción de transcripción se efectuó empleando el sistema mMESSAGING MACHINES (Ambion Inc., Austin, TX USA). La síntesis se dirigió desde el promotor T7 y se hizo en presencia de G(5')ppp(5')G, un análogo del nucleótido de modificación en 5' (7-metil guanosina, "cap"). Opcionalmente, el DNA templado fue removido con DNasa I, libre de RNAsa. En caso contrario, la reacción de transcripción se detuvo añadiendo medio volumen de una solución de precipitado de RNA (LiCl. 7,5 M, EDTA 75 mM). La mezcla se enfrió a -20 °C por una hora, y se sedimentó a máxima velocidad por 20 minutos en una minicentrífuga. El sedimento de RNA se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua libre de RNAsa. La integridad del transcrito se verificó en un gel de agarosa al 0,7% y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm.

### **4.2 Ranas, oocitos y microinyección.**

#### **4.2.1 Ranas.**

Grupos de 7 a 10 ejemplares hembras de la especie *Xenopus laevis* procedentes de USA (NASCO, Modesto, CA, USA), se mantuvieron en bateas plásticas con 15 a 20 litros de agua potable sin cloro, a una temperatura máxima de 20 °C y en oscuridad continua.

#### **4.2.2 Oocitos.**

Los ejemplares de *Xenopus laevis* se anestesiaron por inmersión en una mezcla al

0,2% de agua y anestésico, tricaina metasulfonato (Veterquímica Ltda. Santiago, Chile), durante 10 minutos. Mediante una incisión abdominal se disecaron uno o dos lóbulos ováricos y se transfirieron a solución OR-2, compuesta de: NaCl 82,5 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,6. La incisión fue suturada y el ejemplar devuelto a la mezcla de agua y anestésico para su recuperación gradual. Con el fin de desfolicular y aislar los oocitos, los lóbulos se cortaron en trozos pequeños de alrededor de 0,5 cm. de largo y se incubaron en medio OR-2 con 1,5 mg/ml de colagenasa (GIBCO BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD USA) equivalente a 270 U/ml, por un periodo de 60 minutos a temperatura ambiente y con agitación orbital de 180 ciclos por minuto. Posteriormente, los oocitos se lavaron por al menos 5 veces con OR-2 sin colagenasa. El procedimiento se repite una vez mas de forma idéntica a como se describió antes. En una tercera repetición del procedimiento descrito, la velocidad y el tiempo de incubación con la colagenasa se disminuyen y acortan en 100 ciclos y 30 minutos respectivamente. Después del último lavado con OR-2 sin colagenasa se repitió el lavado por otras 5 veces más, haciéndose a la vez una primera selección de oocitos en los estados V y VI. Los oocitos se transfirieron entonces a solución ND-96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,6) suplementada con gentamicina (50 mg/ml) y se mantuvieron a 18 °C.

#### **4.2.3 Microinyección.**

6 a 24 horas después del tratamiento con colagenasa, se seleccionaron oocitos de los estados V y VI que no tuvieran la membrana de las células foliculares. Se microinyectó 50 nl de una solución de mRNA en agua (0,05 µg/µl a 0,5 µg/µl, equivalentes a 2,5 ng y 25 ng, respectivamente) de la subunidad α del canal hSlo silvestre, o alguno de los mutantes del canal. La concentración del mRNA se escogió

según el nivel de expresión de cada transcrito.

#### **4.2.4 Procedimiento de microinyección.**

La microinyección se realizó en un equipo consistente de una lupa binocular (Nikon) una fuente de luz con fibra óptica ("FO-150Z", Chiu Technical Corp.; World Precision Instrument (**WPI**), Sarasota, FL USA), un microinyector ("A203XVY", WPI, Sarasota, FL USA) y un micromanipulador ("M3301R", WPI, Sarasota, FL USA). Las micropipetas de inyección se hicieron estirando capilares de vidrio ("4878", WPI, Sarasota, FL USA) en un estirador horizontal (Sutter Instrument Co., Novato, CA 94948 USA). La punta de la micropipeta se quebró con una tijera bajo el microscopio para obtener puntas de un diámetro de  $\approx 20 \mu\text{m}$ . Una extensión aproximada de 1 cm. medida desde el borde posterior de la micropipeta se llenó con aceite mineral liviano (M-3516, Sigma Chemical Co., St Louis, MO USA). La micropipeta se insertó en el vástago del microinyector y el aceite mineral se hizo avanzar hasta la punta. Se succionó entonces un volumen de 1  $\mu\text{l}$  de mRNA, depositado previamente en un trozo de Parafilm<sup>TM</sup> ubicado sobre una placa de Petri. Los oocitos se depositaron en una placa plástica que contenía ND-96, y se inyectaron inmediatamente. A la placa se le adhirió una rejilla plástica que permite mantener a los oocitos en una posición fija durante la microinyección.

Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo entre 2 y 5 días después de la microinyección. Durante este tiempo los oocitos se mantuvieron en ND-96 suplementado con gentamicina, a 18 °C.

### **4.3 Células.**

#### **4.3.1 Células.**

Se emplearon las células HEK 293 (*Human embryonic kidney*). Estas células se

cultivaron en un medio de cultivo que es una mezcla de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) y F-12 (*Ham's Nutrient Mixture*) (GIBCO BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD USA) en una proporción de 1:1, enriquecido con 10% de suero fetal bovino. Con el propósito de mantener una línea celular disponible las células se “subcultivan” cada vez que la confluencia (densidad celular) es de  $\approx 90\%$ , generalmente se utilizan botellas de cultivo y/o placas de Petri de 60 mm o 100 mm de diámetro.

#### **4.3.2 Transfección.**

Las células fueron transfectadas con los cDNAs tanto del canal silvestre, como de los mutantes, que tenían la secuencia *c-myc* en el N-terminal. Esto se hizo 24 horas después de haber sido subcultivadas en cubreobjetos (*coverslips*) de 12 mm de diámetro. Para la transfección se utilizó “*Lipofectamine 2000*” (INVITROGEN<sup>TM</sup> life Technologies, Carlsbad, CA USA), un tipo de lípidos catiónicos que poseen una alta eficiencia de transfección.

#### **4.3.3 Preparación de las células para electrofisiología y para inmunofluorescencia.**

Las células antes de ser transfectadas deben ser subcultivadas en cubreobjetos para facilitar su posterior manejo. El procedimiento consiste en colocar de 4 a 5 cubreobjetos por placa Petri de 35 mm, se le agrega 100  $\mu\text{L}$  de poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO USA), un adhesivo utilizado en técnicas inmunohistoquímicas para adherir tejidos a laminas de vidrio. Sin embargo este adhesivo es tóxico para las células, por lo tanto se debe lavar al menos por 4 veces con PBS 1x para eliminar todo exceso de poli-L-lisina. Después agregar 2 ml de medio DMEM-F12, incubar por unos minutos a 37 °C y agregar unas 2 o 3 gotas de células en suspensión por tripsinización.

Se espera 24 horas y se transfecta como se describió arriba.

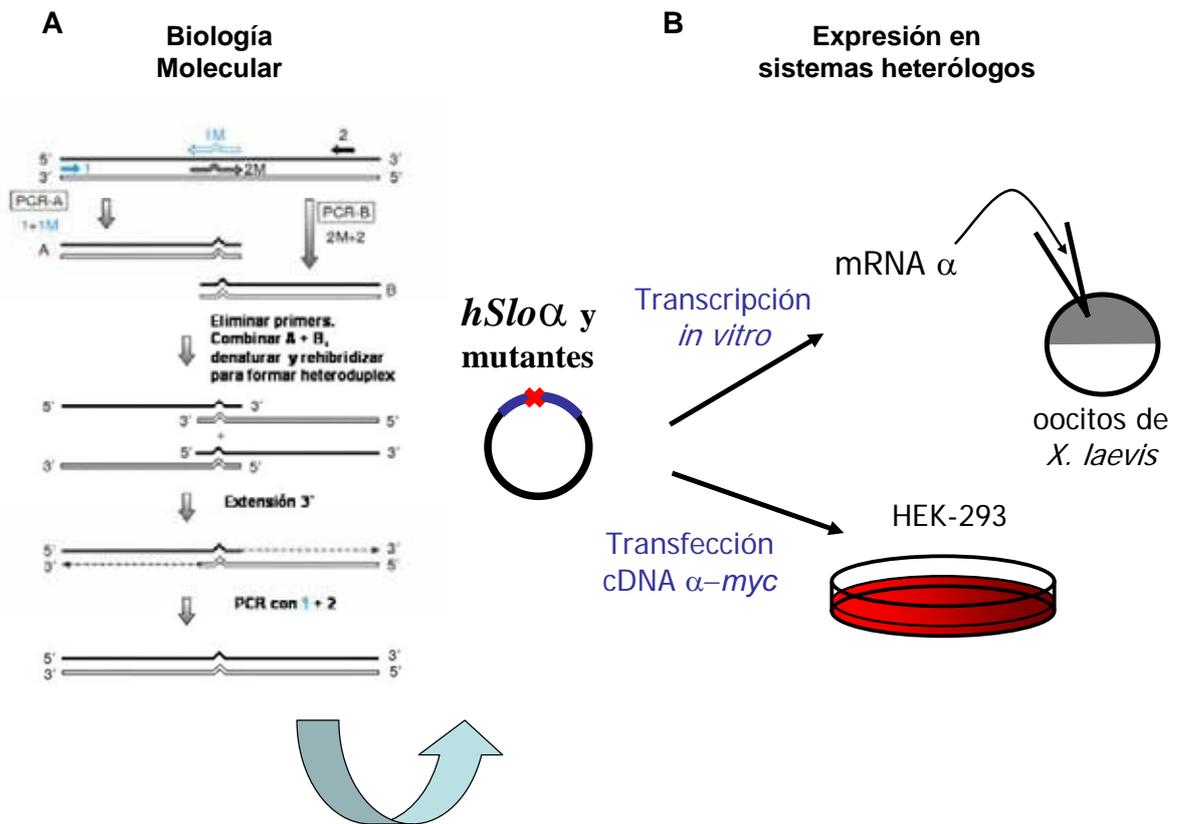
Una vez que las células han sido transfectadas se espera 1 a 3 días que se exprese el canal, y se caracteriza por medio de técnicas electrofisiológicas. Para inmunofluorescencia se espera 1 a 2 días de expresión, y se procede con el ensayo.

#### **4.4 Registros electrofisiológicos.**

Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando la técnica de “*patch clamp*” (Hamill y col., 1981). La pipeta de registro se mantuvo adherida al oocito (“*cell-attached*”) o se escindió de ella con la cara intracelular de la membrana hacia el baño (“*inside-out*”). Se registraron corrientes macroscópicas en macroparches de membrana (Hilgemann, 1989) de oocitos de *X. laevis*, inyectados 1 a 4 días antes con mRNA de hSlo silvestre o las mutantes de S2, S3 y S4.

#### **4.5 Pipetas de registro.**

Las pipetas se hicieron aplicando calor localizado a la zona central de un capilar de vidrio de borosilicato Pirex (9530-1, Corning, Corning, NY USA) y tensión en los extremos del mismo. Las pipetas se estiraron en varios pasos, en un estirador horizontal de pipetas (Sutter Instrument Co., Novato, CA 94948 USA). Las pipetas fueron pulidas a fuego en una microforja (MF-830, NARISHIGE, Japan) hasta obtener pipetas cuya punta tenía un diámetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . La resistencia de las pipetas osciló entre 1 a 2  $\text{M}\Omega$ , con las soluciones utilizadas. Previamente a hacer el sello, la punta de la pipeta se cubrió con aceite mineral liviano (M-3516, Sigma Chemical CO. St Louis, MO USA) con el fin de incrementar la estabilidad del sello.



**Figura 5.** Diagrama representativo de los procedimientos utilizados para la fabricación de los mutantes por medio de biología molecular. **(A)** Técnica denominada *primers extensión*. **(B)** Sistemas heterólogos de expresión utilizados, oocitos de *Xenopus laevis* y células HEK 293 (*HEK*, *Human Embryonic Kidney*).

#### **4.6 Soluciones de registro.**

Para los registros electrofisiológicos, solo se utilizó una solución que estaba compuesta de KOH 110 mM (ocitos), HEPES 10 mM, KCl 2mM y HEDTA 5 mM (calcio 2,5  $\mu$ M), ajustada a pH 7,4 con ácido metanosulfónico (MES). Esta concentración de calcio (2,5  $\mu$ M) es suficiente para activar el canal. Como solución de pipeta se usó la misma solución, por lo tanto existe la misma cantidad de calcio en ambos lados de la membrana, esto se denomina *calcio simétrico*.

La concentración de calcio se ajustó agregando  $\text{CaCl}_2$  y calculando la concentración de calcio libre con el programa WinMaxChelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>). Posteriormente fue comprobada con un electrodo de calcio (WPI, Sarasota, FL USA).

#### **4.7 Registro de las corrientes macroscópicas.**

El sistema de registro consta de los siguientes elementos; una cámara de registro fabricada en el laboratorio, un porta cabezal o "*headstage*" (que contiene el amplificador convertidor de corriente), un amplificador de "*patch clamp*" EPC7 (List Medical, Darmstadt, Germany), un osciloscopio de dos canales (6502, Hung Chang, Seoul, Korea), un filtro Bessel, pasa bajos (900, Frequency Devices, Haverhill, MA USA), y un computador (Pentium 4, 3.0 GHz, con tecnología *HT Prescott*).

Los registros fueron adquiridos mediante una tarjeta NI-PCI-6014 (National Instruments) y un software propio desarrollado en el ambiente LabView (National Instruments).

La cámara de registro se montó sobre una mesa antivibratoria fabricada en el laboratorio y bajo una lupa binocular (PZM, WPI, Sarasota, FL USA). La visualización del oocito en la cámara fue facilitada por una fuente de luz óptica (FiberLite 180, Dolan

Tener Industries Inc. Lawrence, MA USA).

La posición y el desplazamiento de la pipeta de registro se controló con una micromanipulador compuesto de 3 plataformas con tornillo micrométrico (433, Newport Corporation, Fundation Valley, CA USA) con desplazamiento en los ejes X e Y en el plano horizontal y con desplazamiento en el eje Z desviado 45 °C en relación al plano vertical. El desplazamiento en los ejes X y Z se pudo controlar manualmente o con un motor (860A, Newport Corporation, Fountain Valley, CA USA) con controlador gradual de velocidad (*"Motion Controller"*, 860-C2, Newport Corporation, Fountain Valley, CA USA).

#### **4.8 Procedimiento de registro de las corrientes macroscópicas.**

La membrana vitelina del oocito se removió manualmente en la cámara de registro. La pipeta se introdujo a la cámara y la solución del baño se cambió para evitar la contaminación con  $\text{Ca}^{2+}$ . Antes de hacer el sello se canceló la diferencia de potencial entre el electrodo de registro y el electrodo de referencia. Ambos electrodos se fabricaron con alambre de plata recubiertos con cloruro de plata (Ag/AgCl). El recubrimiento se hizo sumergiendo el alambre de plata en solución de hipoclorito de sodio. Los sellos se hicieron acercando la pipeta de registro a la superficie del oocito midiendo simultáneamente la corriente que fluye por la pipeta inducida por un pulso de 10 mV y 2 ms. Después de hacer contacto con la membrana celular, se aplica una ligera presión negativa al interior de la pipeta lo que hace que parte de la superficie de la ésta se invagine en la pipeta. Esto es seguido por la unión de la membrana y la superficie del vidrio formando un sello de alta resistencia eléctrica ( $\geq 1\text{G}\Omega$ ). Este proceso permite un aislamiento perfecto entre la región de la membrana circunscrita por la pipeta y el resto de la membrana, haciendo posible un cambio de potencial de

membrana en dicha región.

Si la pipeta no se mueve adicionalmente, el sello es “adherido a la célula” (“*cell-attached*”). Para escindir el sello dejando la cara interna de la membrana expuesta al baño (“*inside-out*”) la pipeta se desplazó rápidamente, alejándose del oocito.

La configuración *cell-attached* permite trabajar en una condición de baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que en el interior del oocito la  $[\text{Ca}^{2+}]$  es  $\approx 200$  nM. En cambio, la configuración *inside-out*, permite trabajar a las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que se deseen.

#### **4.9 Adquisición y análisis de los datos electrofisiológicos.**

Las corrientes de hSlo se indujeron estimulando el parche de membrana con pulsos rectangulares de voltaje, de magnitud creciente y de duración adecuada para alcanzar el estado estacionario de las corrientes. La señal de corriente se filtró a una frecuencia 5 veces menor que la frecuencia de muestreo del convertidor análogo digital (ADC) y se adquirió con un software propio desarrollado en el ambiente LabView (National Instruments).

Los registros se analizaron con los programas Analysis (desarrollado por Víctor Grabarchuk en el laboratorio del Dr. Francisco Bezanilla, UCLA) y pClamp 9 (Axon Instruments). El análisis básico de los datos, que incluyó la corrección de la línea base de los registros de corriente y la construcción de las curvas de corriente en estado estacionario en función del potencial de membrana (curvas **I/V**). Con los datos de I/V se generaron archivos ASCII de dos columnas que se procesaron posteriormente con la planilla de cálculo Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation). Los ajustes y los gráficos de estos ajustes fueron realizados utilizando Prism 4 (GraphPad Software, Inc. USA)

#### **4.10 Inmunofluorescencia y reconstrucción tridimensional (3D).**

##### **4.10.1 Protocolo para inmunofluorescencia.**

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia, las células fueron previamente subcultivadas sobre cubreobjetos en una placa Petri y transfectadas con cDNA del canal hSlo silvestre y los mutantes de los segmentos de transmembrana S2, S3 y S4, se expresaron de 1 a 2 días y se procedió a realizar el protocolo que a continuación se describe (Fig. 6): Las células cultivadas sobre cubreobjetos deben tener la confluencia requerida y deben estar adheridas al cubreobjeto con Poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO USA). Los cubreobjetos se someten a una serie de lavados con PBS, para su posterior fijación con HISTOCHOICE™ (SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, CA USA) por 10 minutos. Pasado ese tiempo se vuelven a lavar con PBS y se incuban por otros 10 minutos en una solución de bloqueo (0,5% BSA, 10% FCS en PBS 1x). Las muestras se incuban por 1 hora en 100-125 µL del primer anticuerpo Anti *c-myc* (7 co. St. Louis, MO USA) disuelto en una “solución de inmunofluorescencia” (0,5% BSA en PBS 1x). En este paso se pueden permeabilizar las células incubándolas en una “solución de permeabilización” (0,5% BSA, 0,5% NP40 o Triton X-100). Posteriormente se lavan 3 veces por 10 minutos cada vez en la “solución de inmunofluorescencia” y se incuban por 1 hora en 100-125 µL del anticuerpo secundario, Alexa fluor 488 y Alexa fluor 568 (Molecular Probes, Eugene, OR USA) disuelto en “solución de inmunofluorescencia”. Se lava 3 veces por 10 minutos, después se enjuaga en PBS 1x, se montan sobre un portaobjetos utilizando un medio de montaje para fluorescencia VectorShield® (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA USA) y se sellan con barniz de uñas.

Las muestras montadas sobre portaobjetos se guardan a 4 °C en completa

oscuridad.

#### **4.10.2 Observación de las muestras con microscopía confocal.**

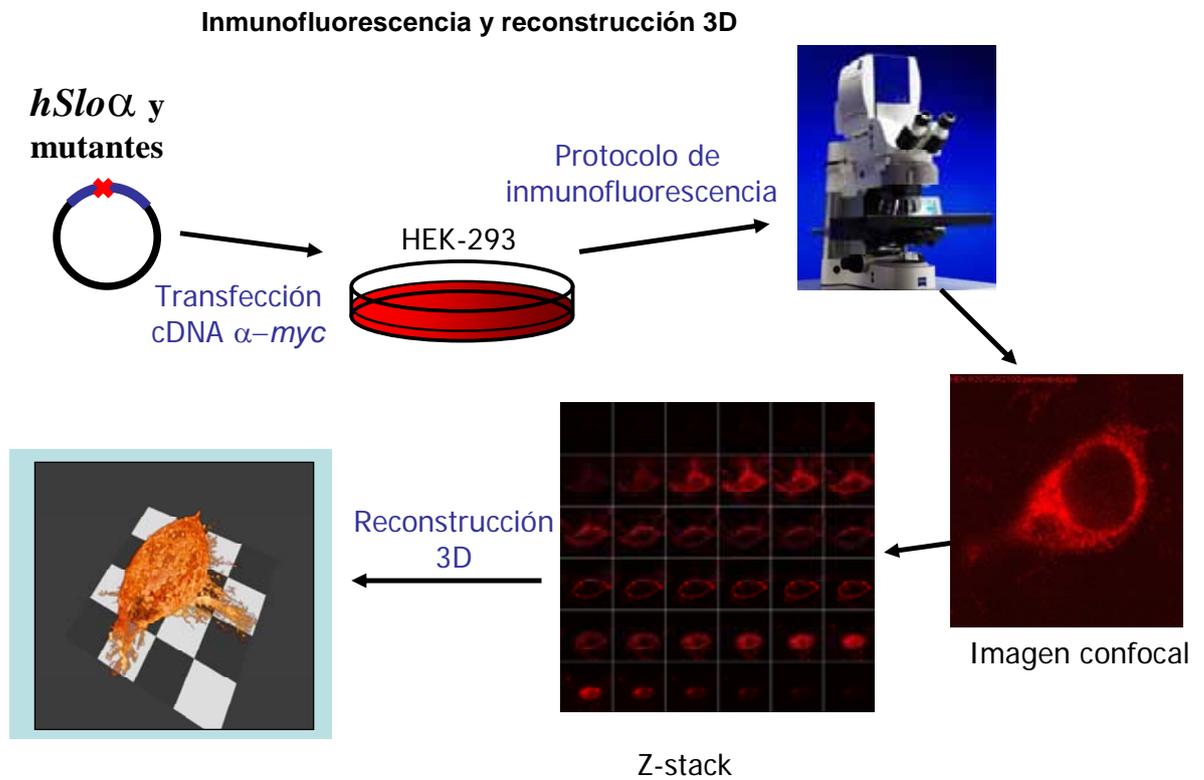
El equipo de microscopía confocal consiste en un microscopio confocal (Carl Zeiss, LSM confocal microscope, *Germany*) y un computador. El microscopio posee 2 láseres de Argon (488, 514 nm) y uno de HeNe (543 nm) que excitan a longitudes de onda distintas, 488 nm, 543 nm y 568 nm. El microscopio cuenta con una lámpara fluorescente que permite observar en tiempo real los fluoróforos empleados mediante observación directa a través del ocular, las longitudes de onda empleadas fueron 488 nm y 568 nm (emisión en verde y rojo, respectivamente), se empleó el objetivo 63x de inmersión en aceite. Las imágenes fueron adquiridas con el software propio del microscopio Zeiss LSM Image Browser Version 3.2.0.70.

Las imágenes adquiridas para hacer su posterior reconstrucción 3D, eran tipo “Z-stack” (Fig. 7), las cuales consisten en una serie de fotos de una misma célula, tomadas cada 100 o 200 nm desde la base hasta el tope de la célula. En cambio las imágenes para colocación fueron adquiridas como una foto única, con la máxima resolución posible.

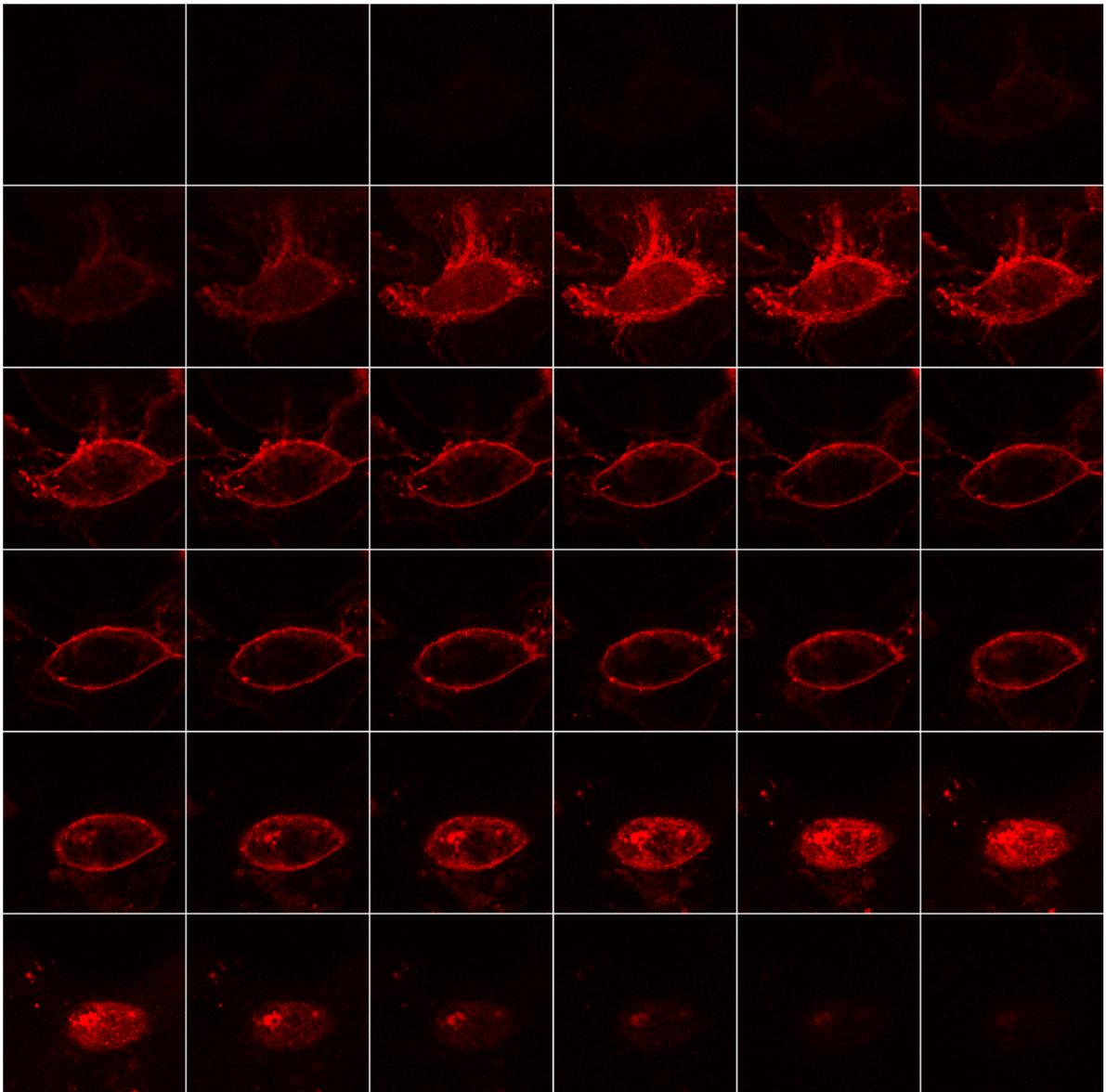
#### **4.10.3 Procesamiento de imágenes y reconstrucción 3D.**

Todas las imágenes fueron procesadas por medio de deconvoluciones, utilizando el software Huygens Professional suite para Linux (Scientific Volume Imaging). Para las reconstrucciones en 3D, se utilizó un software desarrollado por el Dr. Steffen Härtel, miembro del Centro de Estudios Científicos (CECS). Él empleó la plataforma IDL (v5.4 de Research Systems, Inc.). Este software utiliza series de fotos tomadas con el microscopio confocal a distintos niveles de la célula (*Z-Stack*). El software del Dr. Härtel entrega como resultado de la reconstrucción un modelo físico de la célula (Fig. 9) y una

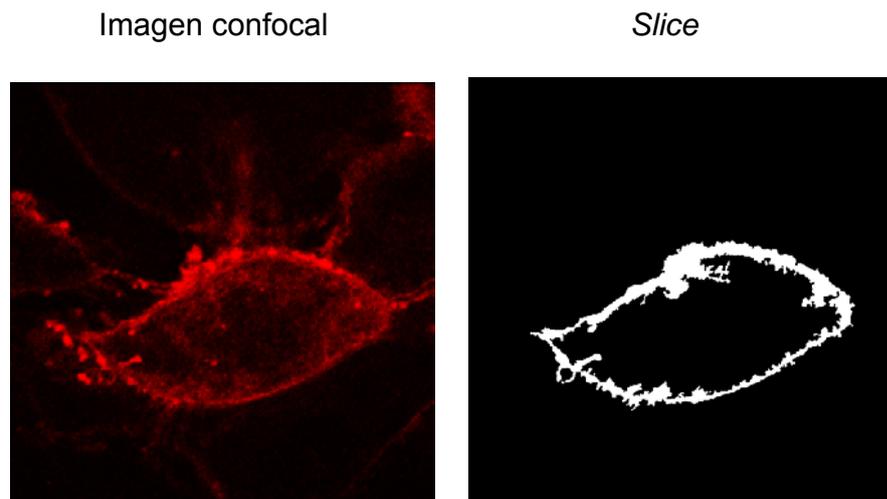
serie de cortes (*slices*) que corresponden a fotos donde se selecciona la región de interés (Fig. 7), que se empleará para construir el modelo 3D (Fig. 8) y de esta forma determinar el lugar donde se quedan los canales que no se expresen. Para obtener una película en la cual la célula aparece girando libremente se toma esta serie de “*slices*” y se procesan con el software MediaEd (Antechinus Media Editor 1.1).



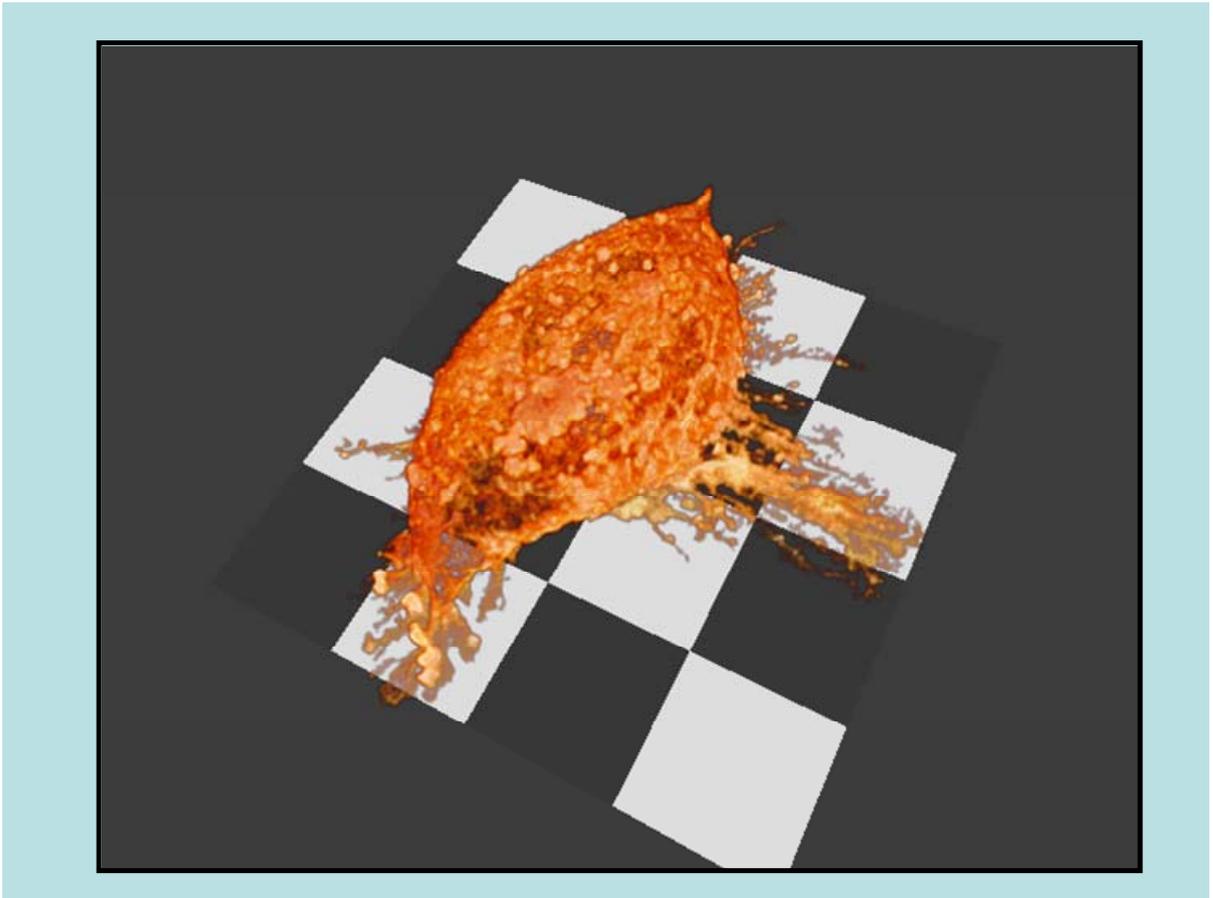
**Figura 6.** Ilustración esquemática de los pasos a seguir para la obtención de imágenes 3D. Los DNAs mutantes son transfectados en células HEK 293, estas son cultivadas 24-48 horas, para que expresen la proteína, pasado este tiempo, se realiza la fijación de éstas y su posterior incubación con los anticuerpos respectivos, para por último ser observadas en el microscopio confocal. Las imágenes obtenidas son procesadas para obtener el modelo 3D de la célula.



**Figura 7.** Secuencia de imágenes (*slices*) de una célula HEK 293 desde la base (línea superior) hasta la cima de ésta (línea inferior), obtenidas por microscopía confocal, **Z-stack**. Todas las imágenes corresponden a una misma célula HEK 293, transfectada con el canal hSlo silvestre con el epítotope *myc* (hSlo-*myc*), 24 horas post-transfección. Se emplearon los anticuerpos Anti-*myc* y Alexa Fluor 568, como anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente. La distancia entre cada imagen es de 200 nm en el eje Z, perpendicular a la célula.



**Figura 8.** Diferencias existentes entre una imagen obtenida por microscopía confocal y un *slice*. Ilustración que muestra las diferencias existentes entre una imagen obtenida por microscopía confocal y su producto después de someterla a procesamiento computacional con el software de reconstrucción, un *slice*. Un *slice*, es una máscara o copia digital de la imagen confocal, donde solo se consideran algunas regiones de la imagen confocal (ROI, *Region of interest*), las cuales uno determina. La imagen confocal corresponde a una célula HEK 293, transfectada con el canal hSlo-myc silvestre, 24 horas post-transfección. Se emplearon los anticuerpos Anti-myc y Alexa Fluor 568, como anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente.



**Figura 9.** Modelo 3D, obtenido después de una serie de pasos de digitalización de las imágenes provenientes de la microscopía confocal, la imagen corresponde a una célula HEK 293, transfectada con el canal *hSlo-myc* silvestre, 24 horas post-transfección. Se emplearon los anticuerpos Anti-myc y Alexa Fluor 568, como anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente.

## 5 RESULTADOS.

### 5.1 *Expresión de los canales hSlo silvestre y mutantes en oocitos de Xenopus laevis.*

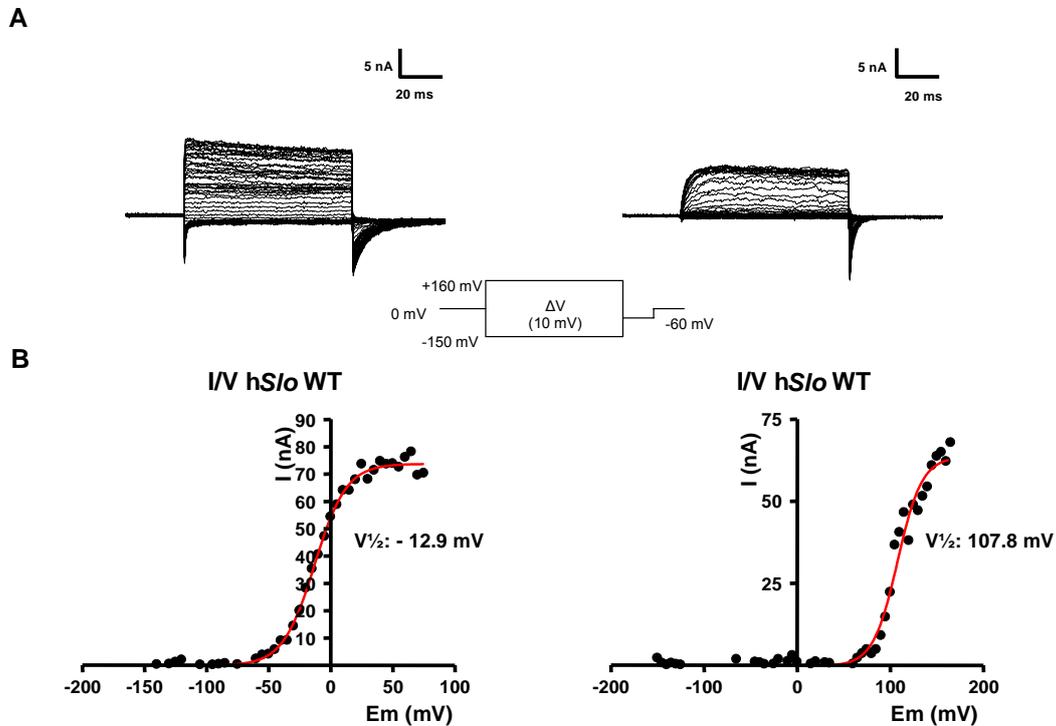
#### 5.1.1 **Propiedades de la activación de los canales hSlo expresados en oocitos de *Xenopus laevis*.**

La dependencia del voltaje y de la activación por  $\text{Ca}^{2+}$  se caracterizó estudiando las corrientes microscópicas en macroparches de membrana. Las corrientes se activaron con pulsos rectangulares de potencial en el intervalo de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  entre nanomolar y micromolar.

Un ejemplo típico de las corrientes observadas en estas condiciones se muestra en la figura 10. Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  es del orden de nanomolar las corrientes solo pueden ser activadas por pulsos despolarizantes  $\geq 100$  mV (Fig. 10); esta característica se traduce en que el pie de la curva de corriente en estado estacionario (I) en función del potencial (curva I-V) se ubica a potenciales  $\geq 100$  mV. Como se observa en la literatura (Meera y col., 1996) esta conducta se repite en el intervalo de  $[\text{Ca}^{2+}]$  comprendido entre 8 pM y  $\approx 100$  nM (ver figura 11). Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa a 2,5  $\mu\text{M}$ , el pie de la curva I-V se desplaza hacia la izquierda en el eje del voltaje y la magnitud de la corriente máxima obtenida aumenta (Fig. 10), este desplazamiento también se observa en la literatura (Meera y col., 1996) (Fig.11).

La activación de las corrientes hSlo se caracterizó a partir de las curvas de conductancia en función del potencial (curva G-V). Estas se construyeron utilizando las curvas I-V y la ecuación 1.

$$G = I / (V - E_K) \quad (1)$$



**Figura 10.** Registros electrofisiológicos del canal hSlo silvestre. Los registros fueron realizados en oocitos de *Xenopus laevis*, 48 hrs. post-inyección. **(A)** Registro realizado en la configuración *inside-out* ( $2,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , izquierda) y *cell attached* ( $\approx 200 \text{ nM Ca}^{2+}$ , derecha). Las corrientes fueron obtenidas aplicando el protocolo de estimulación mostrado en el inserto, comenzando desde un potencial de sostenimiento de  $0 \text{ mV}$ . **(B)** Relación corriente voltaje (I-V) para los registros obtenidos bajo las condiciones indicadas en **A**. el ajuste de estos datos se realizó utilizando la ecuación de Boltzmann y proporciona los valores de  $V_{1/2}$  indicados en la figura.

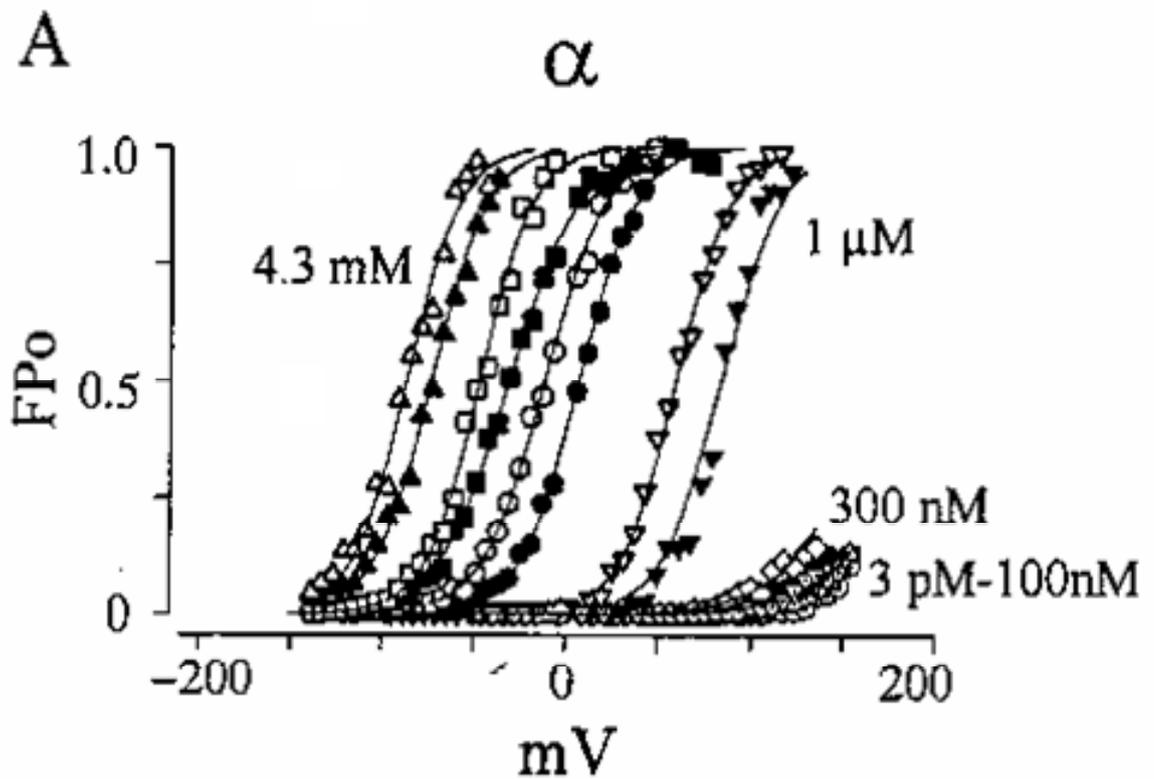
Donde  $I$  es la corriente de  $K^+$  medida y  $E_K$  es el potencial de equilibrio del  $K^+$ . Los datos de la G-V se describieron ajustando una distribución de Boltzmann y normalizándola por la conductancia máxima obtenida en el parche (Ec. 2):

$$P_0 = G / G_{max} = [1 + \exp (-z_{eq} \cdot F \cdot (V_{1/2} - V) / (R \cdot T))]^{-1} \quad (2)$$

Donde  $P_0$  es la probabilidad de apertura,  $G_{max}$  es la conductancia máxima del parche de membrana del cual se está registrando,  $z_{eq}$  es el número equivalente de cargas de compuerta,  $V_{1/2}$  es el voltaje en el cual se alcanza el 50 % de la  $G_{max}$ ,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la constante de los gases y  $T$  es la temperatura absoluta.

Un ejemplo de este análisis se puede observar en la figura 11. Las curvas se normalizaron según la conductancia máxima medida en el parche, que en ese experimento se consiguió con una  $[Ca^{2+}] = 4,3$  mM. La dependencia del potencial de hS/o se estimó a partir del ajuste de una distribución de Boltzmann (ecuación 2) a las curvas de conductancia normalizada (curvas  $P_0$ -V). De este ajuste se obtiene un número aparente de cargas de compuerta ( $z_{eq}$ ) que corresponde al número de cargas de compuerta cuyo movimiento en la totalidad del campo eléctrico transmembranal está asociado al proceso de activación de hS/o.

Para hS/o silvestre (WT) se obtuvo un valor de 1,9. Estudios previos habían estimado el valor para  $z_{eq}$  de  $1,43 \pm 0,36$  (promedio  $\pm$  D.S.;  $n = 31$ ; Diaz, 1998). Cuando el número de cargas por canal se midió a partir de la corriente máxima de compuerta (Q) y el número de canales (N) estimado con análisis de ruido (Q/N) se obtuvo un valor de 4 a 5 cargas por canal (Stefani y col., 1997). Estos valores se contrastan con la aguda dependencia del potencial del canal de  $K^+$  dependiente del potencial, *Shaker*, donde se determinó que hay 13 cargas cuyo movimiento está acoplado al proceso de activación (Aggarwal y Mackinnon, 1996; Seoh y col., 1996).



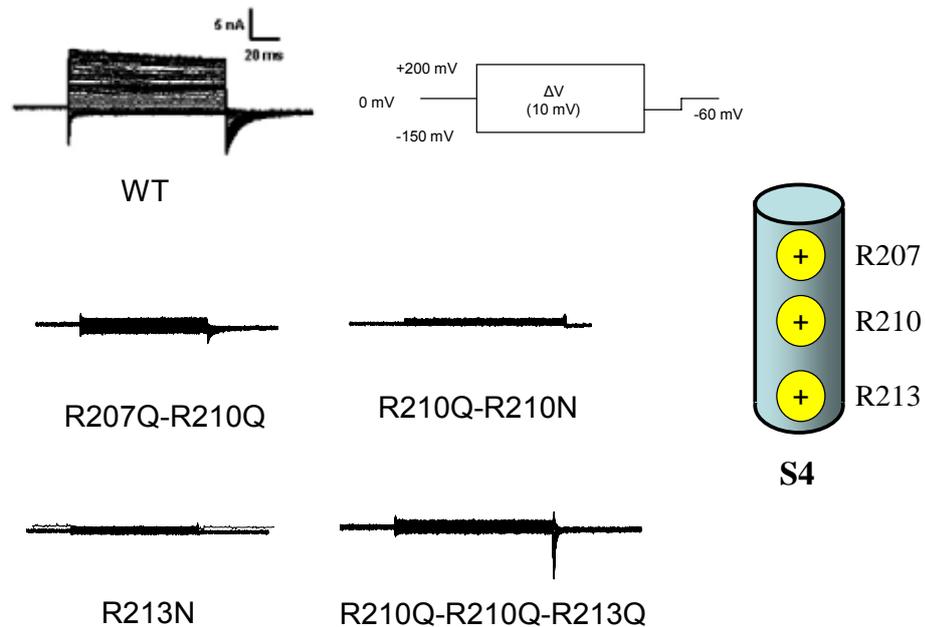
**Figura 11.** Activación de hSlo por calcio y potencial. Curvas de Po-V a distintas concentraciones de calcio intracelular. A concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  menores de 300 nM la probabilidad de apertura depende solamente del potencial de membrana (Meera y col., 1996). Las curvas representan los potenciales a los cuales comienzan a activarse los canales a distintas concentraciones de calcio.

### **5.1.2 Mutaciones dobles y triples del segmento S4: expresión funcional y características electrofisiológicas de los mutantes.**

En *hSlo* las mutaciones puntuales en el segmento S4 no suprimen la expresión funcional del canal y producen solo alteraciones menores en su activación (Diaz, 1998). En cambio en *Shaker*, las neutralizaciones individuales de la lisina 374 y de la arginina 377 producen canales no funcionales (Papazian y col., 1991; Perozo y col., 1994; Papazian y col., 1995).

Con el objetivo de probar si la neutralización de más de uno de los residuos conservados cargados positivamente tenía un efecto en la expresión funcional del canal, se realizaron mutaciones dobles en el segmento S4 de *hSlo*, R207Q-R210Q, R210N-R213Q y mutaciones triples, R207Q-R210Q-R213Q. Notablemente todas las mutaciones suprimieron la capacidad de los canales de conducir corrientes iónicas. Este resultado fue observado en registros electrofisiológicos realizados en oocitos de *Xenopus* (Fig. 12).

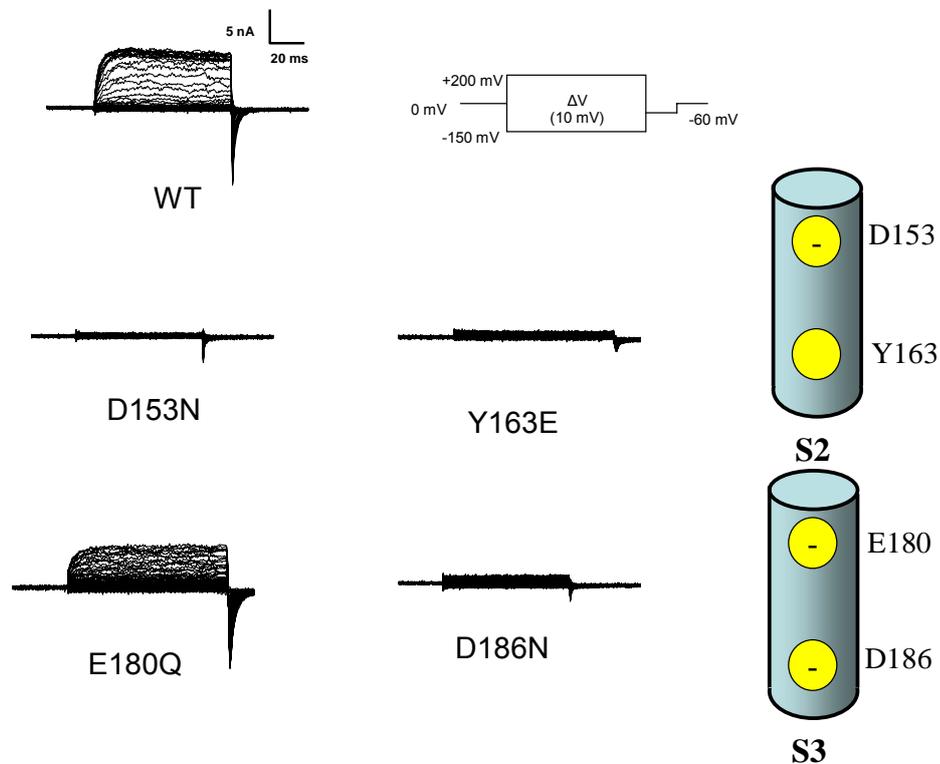
La incapacidad de estos mutantes de expresar corrientes iónicas se explicó, en un comienzo, de dos maneras: *i.* Los canales mutados se insertan normalmente en la membrana citoplasmática del oocito, pero la mutación hecha en el segmento S4 impide la activación del canal en respuesta a un estímulo de potencial; *ii.* Los canales que tienen mutaciones no llegan a insertarse en la membrana por problemas de maduración (Diaz, 1998). Este trabajo pretende distinguir entre estas dos alternativas.



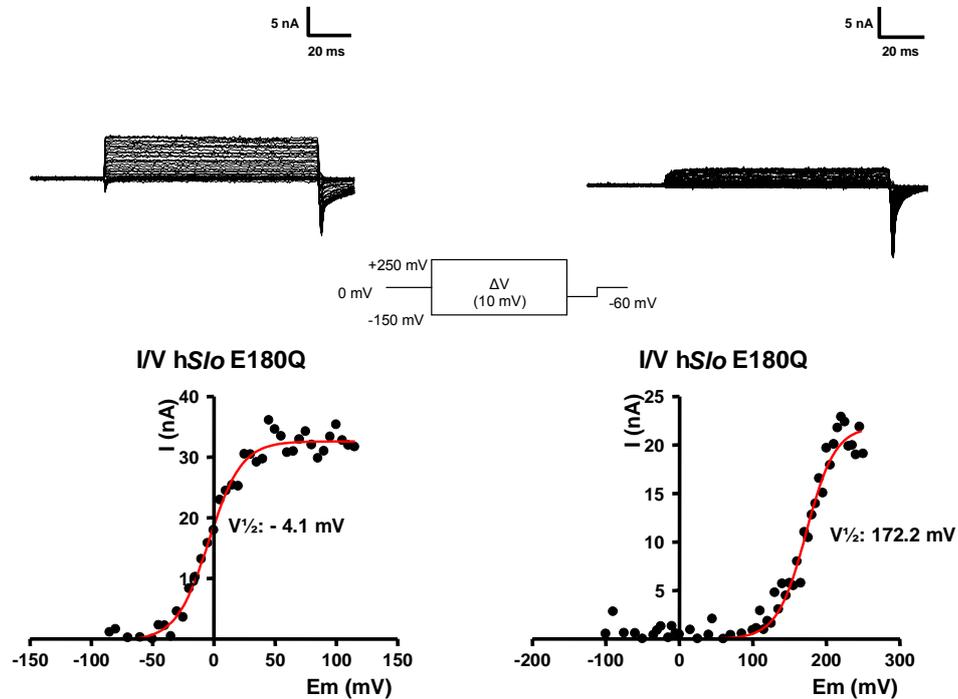
**Figura 12.** Registros electrofisiológicos del canal hSlo silvestre y los mutantes del segmento S4 (R207Q-R210Q; R210N-R213Q; R207Q-R210Q-R213Q) en oocitos de *Xenopus laevis*, 24-48 hrs. post-inyección. Los registros fueron obtenidos en la configuración *inside-out* ( $2,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) y *cell-attached* ( $\approx 200 \text{ nM Ca}^{2+}$ ), los mutantes del S4 no producen canales funcionales. Los registros fueron obtenidas aplicando el protocolo de estimulación mostrado en el inserto, comenzando desde un potencial de sostenimiento de 0 mV. Todos los registros mostrados en la figura corresponden a registros obtenidos en la configuración *inside-out*  $2,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ .

### 5.1.3 Mutaciones puntuales de los segmentos S2 y S3: expresión funcional y características electrofisiológicas de los mutantes.

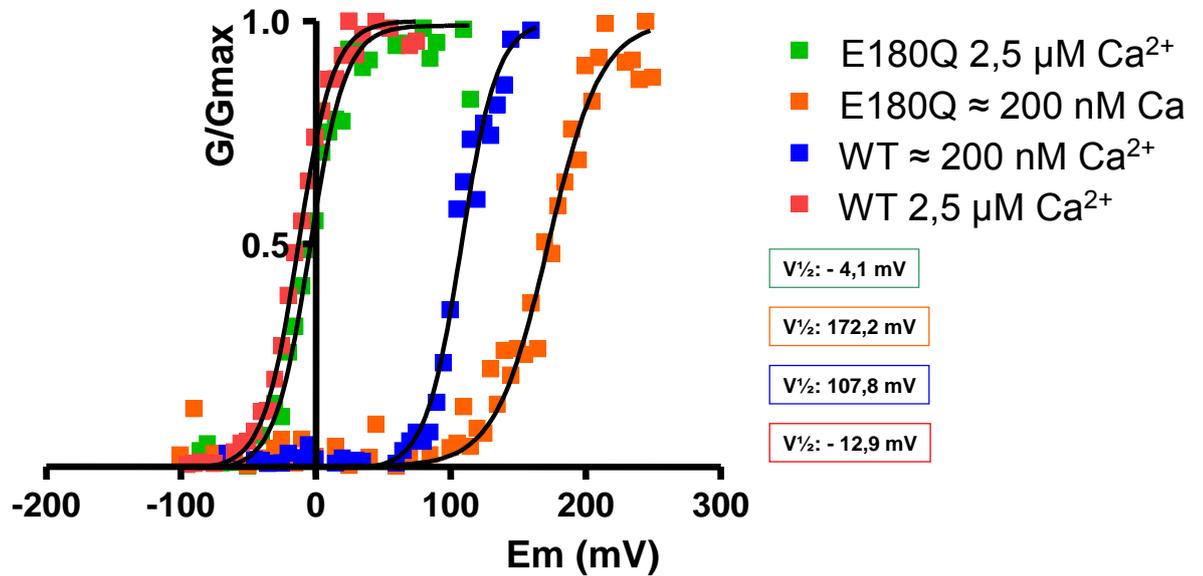
En *Shaker*, se habían determinado una serie de interacciones electrostáticas entre residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4 (Papazian y col., 1995; Seoh y col., 1996; Tiwari-Woodruff y col., 1997; Tiwari-Woodruff y col., 2000; Papazian y col., 2002; Silverman y col., 2003). De estos resultados se puede obtener una homología estructural entre los residuos del canal hSlo y el canal *Shaker*, que podrían ser parte de una red electrostática similar a la existente en *Shaker*. Para eso se hicieron mutantes puntuales de manera tal que correspondieran al mismo residuo conservado en *Shaker*. En el segmento S2 se neutralizó la carga del residuo D153 y se revertió la carga del residuo Y163 (homólogos a los residuos E283 y E293 en *Shaker*, respectivamente, ver figura 2). En el segmento S3 se neutralizaron los residuos E180 y D186 (homólogos a D310 y D316 en *Shaker*, respectivamente, ver figura 2). De los mutantes del segmento S2, ninguno produjo canales funcionales. En cambio de los residuos mutados del segmento S3, la mutante E180Q, produjo canales funcionales, cuando fue expresada en oocitos de *Xenopus* (Fig. 13); esta mutante en condiciones de alto calcio (2,5  $\mu$ M), posee características electrofisiológicas similares al canal silvestre de hSlo, en cambio en condiciones de bajo calcio ( $\approx$  200 nM), el  $V_{1/2}$  está desplazado hacia la derecha en 70 mV (Fig. 14, 15). Sin embargo, en *Shaker* la neutralización de estos residuos produce canales funcionales, pero en menor cantidad debido a una disminución de la cantidad de proteína madura (Tiwari-Woodruff y col., 1997). En cambio en hSlo el reemplazo de un residuo en S2 o S3 suprime la expresión total del canal, lo que estaría indicando la existencia de interacciones electrostáticas con otros residuos cargados presentes en la proteína.



**Figura 13.** Registros electrofisiológicos del canal hSlo silvestre y de los mutantes de los segmentos S2 (D153N; Y163E) y S3 (E180Q; D186N) en oocitos de *Xenopus laevis*, 24-48 hrs. post-inyección. Los registros fueron obtenidos en la configuración *inside-out* ( $2,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ) y *cell-attached* ( $\approx 200 \text{ nM Ca}^{2+}$ ). Solo el mutante del S3, E180Q produce canales funcionales; en cambio los mutantes D153N, Y163E del S2 y D186N, del S3, no producen canales funcionales. Las corrientes fueron obtenidas aplicando el protocolo de estimulación mostrado en el inserto, comenzando desde un potencial de sostenimiento de 0 mV. A modo de ejemplo se muestran los registros del mutante E180Q y del canal hSlo silvestre, obtenidos en la configuración *cell attached*. Los registros de los otros mutantes mostrados en la figura corresponden a registros obtenidos en la configuración *inside-out*  $2,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ .



**Figura 14.** Registros electrofisiológicos del canal hS/o E180Q expresado en oocitos de *Xenopus laevis*, 24-48 hrs. post-inyección. **(A)** Registro realizado en la configuración *inside-out* ( $2,5 \mu\text{M Ca}^{2+}$ , izquierda) y *cell attached* ( $\approx 200 \text{ nM Ca}^{2+}$ , derecha). Las corrientes fueron obtenidas aplicando el protocolo de estimulación mostrado en el inserto, comenzando desde un potencial de sostenimiento de 0 mV. **(B)** Relación corriente voltaje (I-V) para los registros obtenidos bajo las condiciones indicadas en **A**. El ajuste de estos datos se realizó utilizando la ecuación de Boltzmann y proporciona los valores de  $V_{1/2}$  indicados en la figura.

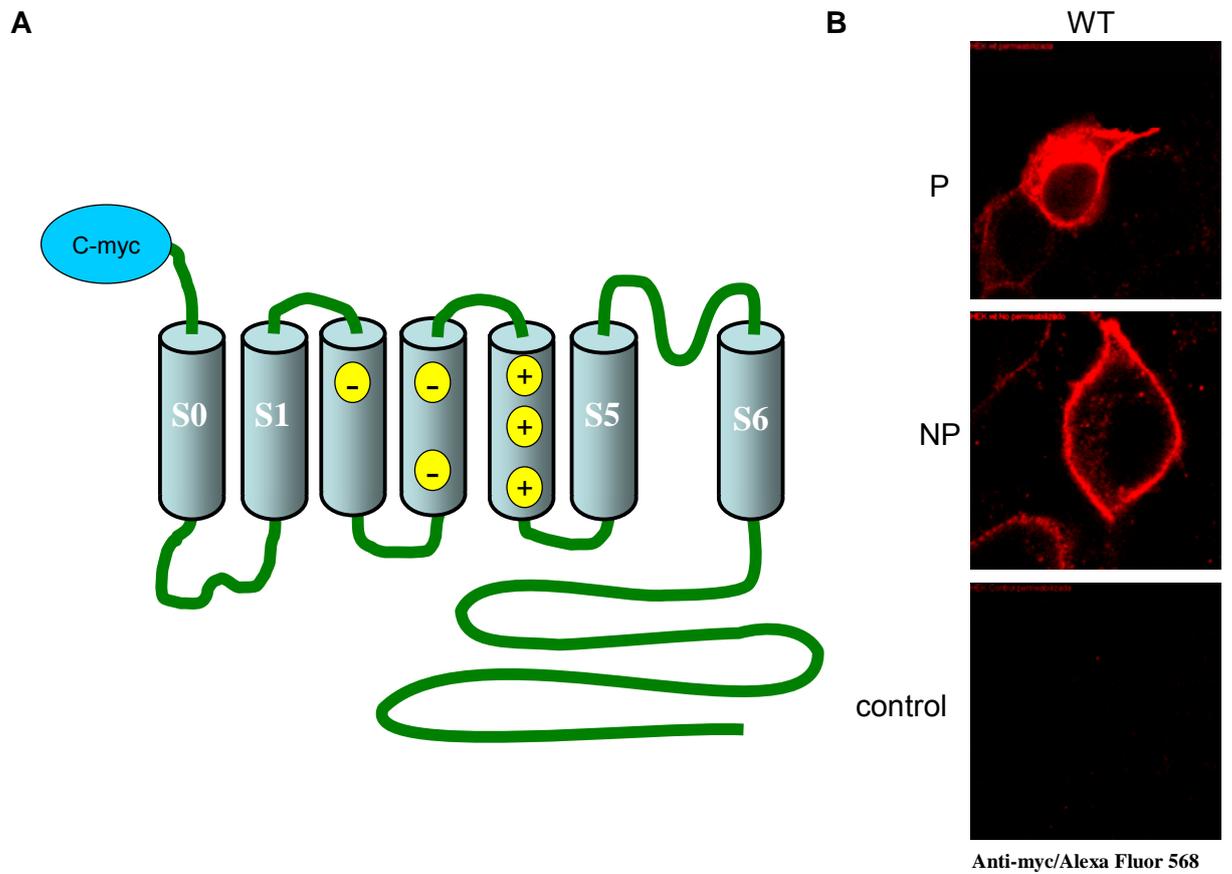


**Figura 15.** Gráfica de las conductancias de los canales hSlO, silvestre y la mutante E180Q, normalizadas por la conductancia máxima de cada una de las curvas G/V respectivas. Los valores de  $V_{1/2}$  muestran que la mutante E180Q tiene un comportamiento similar al canal silvestre cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  es 2,5  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando la  $[\text{Ca}^{2+}] \approx$  200 nM, ya que la curva se desplaza hacia la derecha, indicando que es necesario potenciales mayores para que se produzca la apertura del canal.

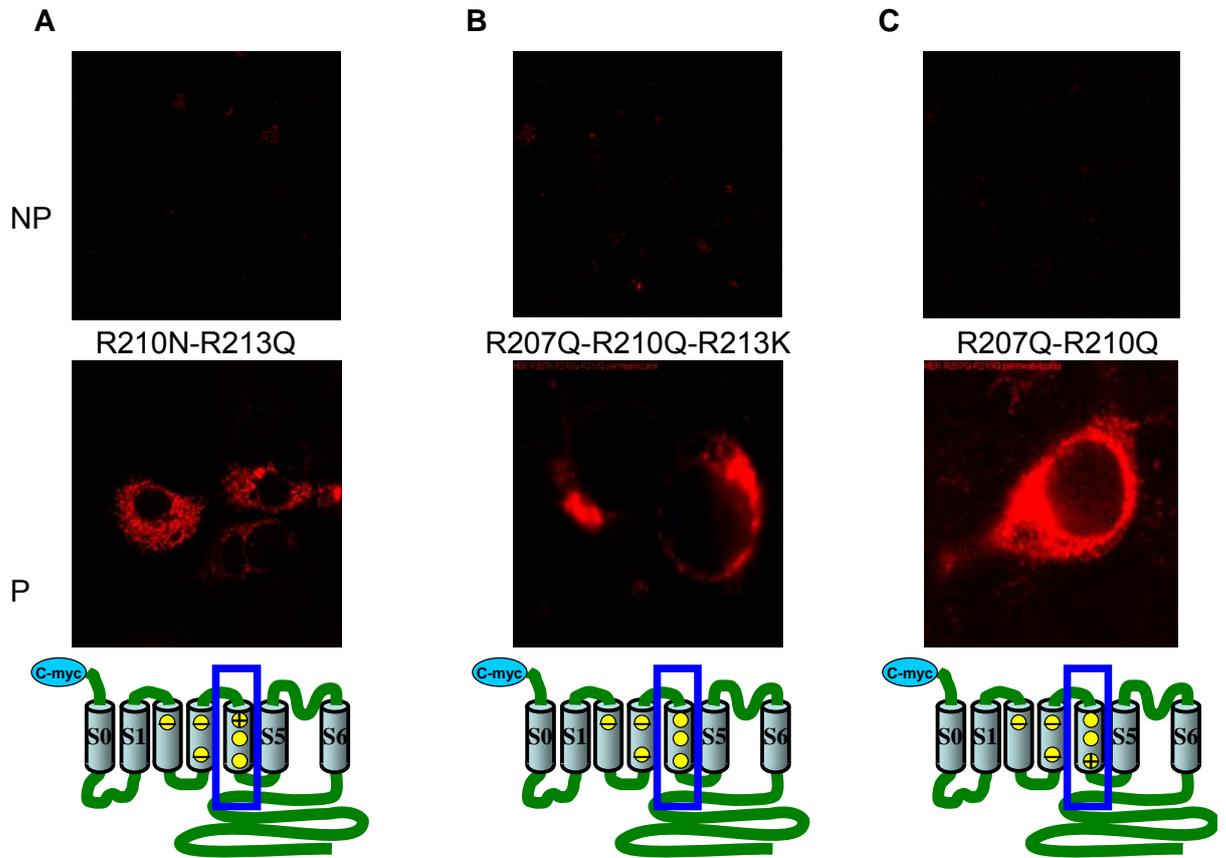
## **5.2 Inmunofluorescencia de los canales hSlo silvestre y mutantes en células HEK 293.**

En los estudios de los residuos cargados del segmento S4 (Diaz, 1998), no se ha podido determinar cual es la razón de porque su neutralización impide la expresión aparente del canal. Esto podría suceder por dos motivos: i. Los canales mutados se insertan normalmente en la membrana del oocito, pero la mutación en el segmento S4 impide la activación del canal en respuesta a un estímulo de potencial; ii. Los canales mutados no llegan a insertarse en la membrana (Diaz, 1998). Para responder esto se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en células HEK 293, se utilizó un clon del gen *Slo* que tiene adherido en su extremo amino-terminal (N-terminal) una secuencia que sirve de epítotope denominada *c-myc*. De los mutantes del canal hSlo, R213N, R207Q-R210Q, R210N-R213Q, R207Q-R210Q-R213Q, D153N, Y163E, E180Q, D186N, ninguno dio resultados positivos en los ensayos de inmunofluorescencia en células no permeabilizadas (Figs.16-19). Es decir, todas las mutaciones estudiadas inhiben la correcta maduración del canal, impidiendo su inserción en la membrana.

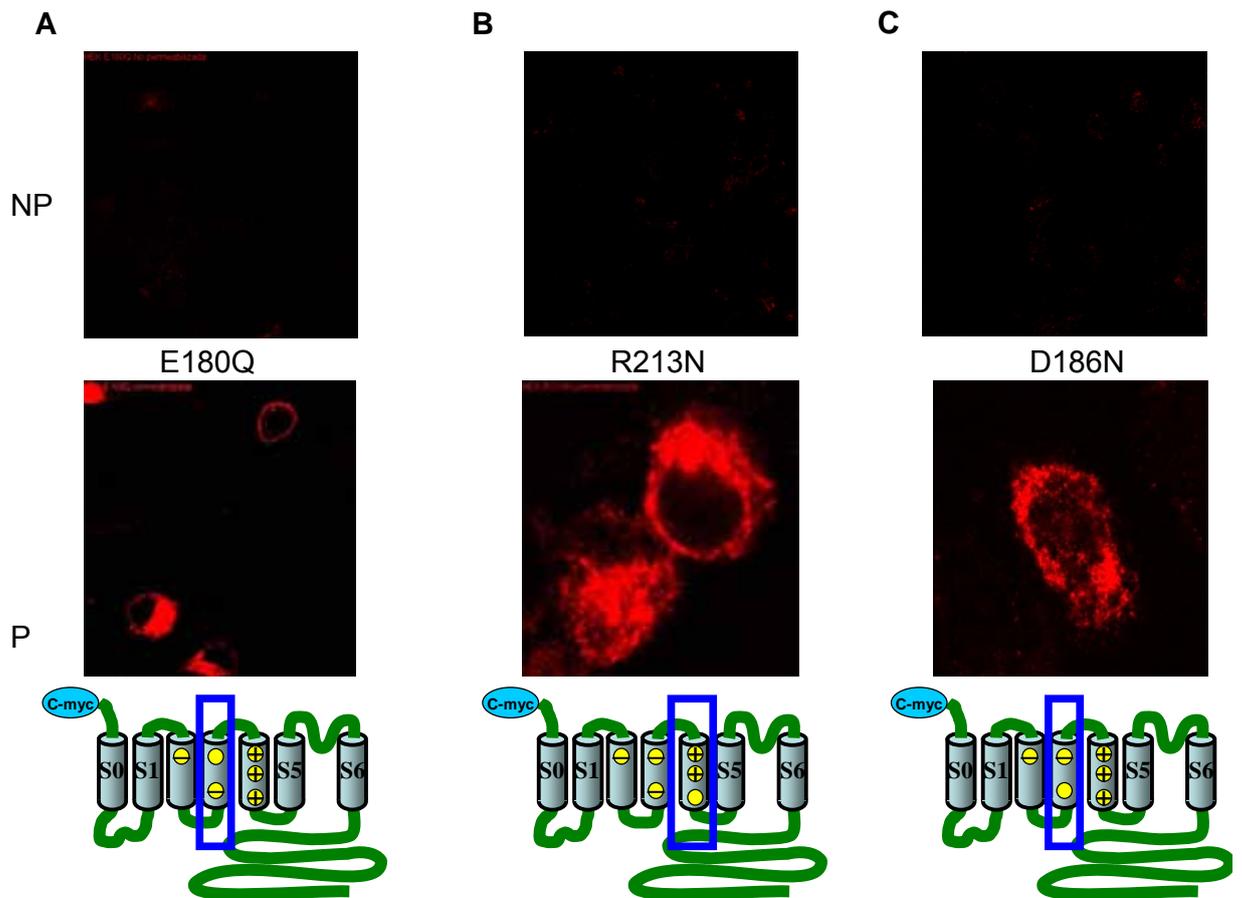
El residuo D153 fue mutado tanto por una asparragina (N), como por una cisteína (C) e isoleucina (I). Esto se realizó para observar si tiene importancia la naturaleza molecular del residuo por el cual se mutó. Esto se debe a que estudios recientes muestran la existencia de residuos que favorecen la inserción del canal en la membrana (Hessa y col., 2005). Para comprobar esto se eligió el residuo D153, porque es el único residuo básico presente en el segmento S2, y por lo tanto, que podría estar interactuando con las argininas del segmento S4. Los ensayos de inmunofluorescencia muestran que es posible recuperar la expresión de esta mutante en células HEK 293 (Fig. 20).



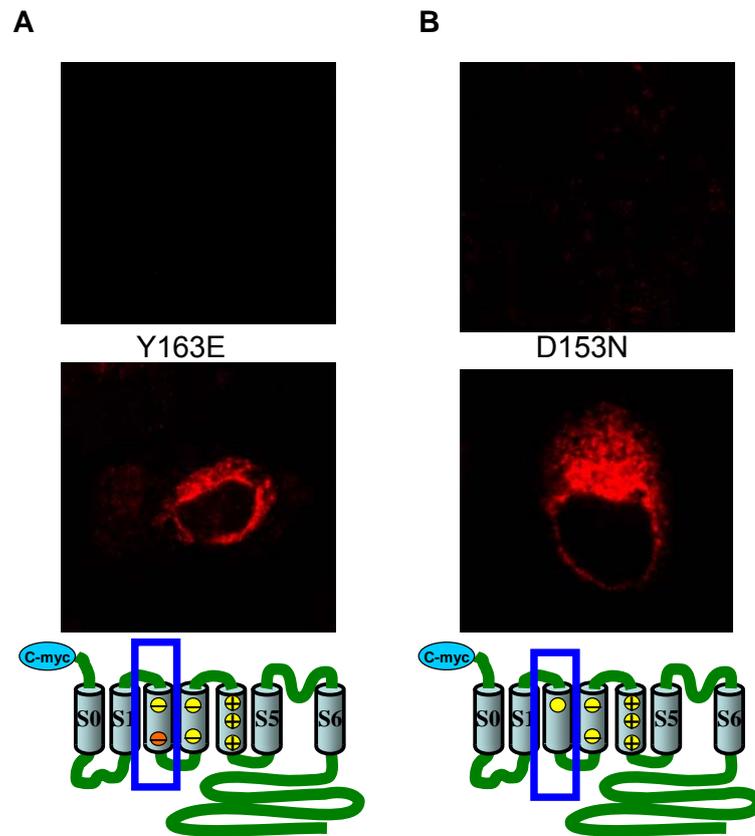
**Figura 16. (A)** Topografía de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal hSlo, se destacan los segmentos de transmembrana que conformarían el sensor de potencial. **(B)** Imágenes obtenidas con microscopía confocal de células HEK 293, transfectadas con el canal hSlo-myc silvestre, se observan células permeabilizadas, **P** (superior), no permeabilizadas, **NP** (medio) y el control, células sin transfectar (inferior).



**Figura 17.** Imágenes obtenidas con microscopía confocal. **(A)** Células HEK 293 transfectadas con el mutante R210N-R213Q-*myc*, del segmento S4. **(B)** Células HEK 293 transfectadas con el mutante R207Q-R210Q-R213Q-*myc*, del segmento S4. **(C)** Células HEK 293 transfectadas con el mutante R207Q-R210Q-*myc*, del segmento S4; **NP**, no permeabilizado, **P**, permeabilizado. En la parte inferior de cada imagen confocal se muestra una representación esquemática de la topología del canal hSlo, en la cual se representan los residuos cargados como círculos amarillos, la carga del residuo como un signo menos (-) o más (+), para negativa o positiva, respectivamente, las neutralizaciones como círculos amarillos sin signo y el epítipo *myc* como un ovalo celeste.



**Figura 18.** Imágenes obtenidas con microscopía confocal. **(A)** Células HEK 293 transfectadas con el mutante E180Q-*myc*, del segmento S3. **(B)** Células HEK 293 transfectadas con el mutante R213N-*myc*, del segmento S4. **(C)** Células HEK 293 transfectadas con el mutante D186N-*myc*, del segmento S3; **NP**, no permeabilizado, **P**, permeabilizado.



**Figura 19.** Imágenes obtenidas con microscopía confocal. **(A)** Células HEK 293 transfectadas con el mutante Y163E-*myc*, del segmento S2. **(B)** Células HEK 293 transfectadas con el mutante D153N-*myc*, del segmento S2; **NP**, no permeabilizado, **P**, permeabilizado.

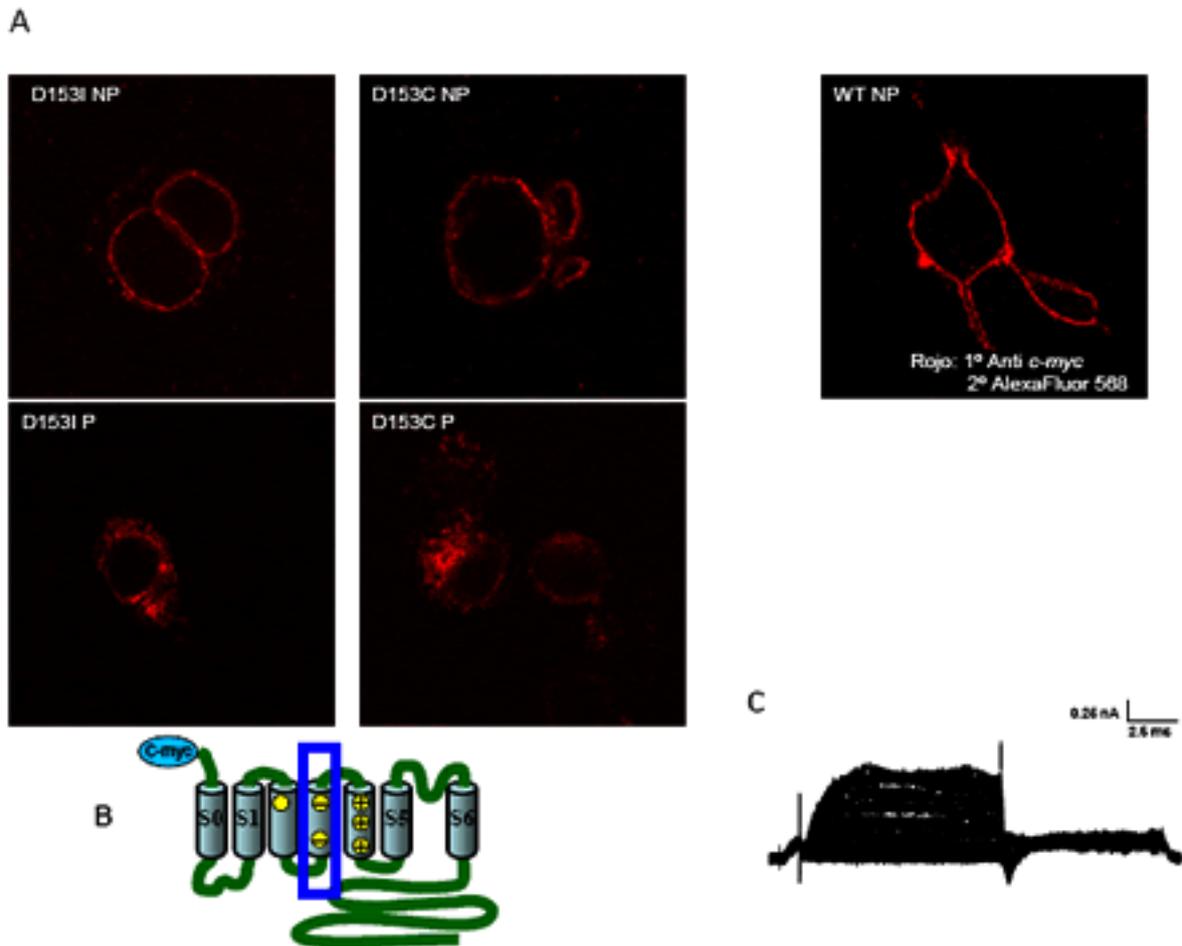
### **5.3 Rescate génico de las mutaciones E180Q y D186N, presentes en el segmento S3 del canal hSlo.**

Los resultados hasta ahora mencionados, muestran los cambios estructurales y de funcionalidad que sufre el canal hSlo, cuando sufre cambios en los residuos que se cree podrían estar formando puentes salinos inter-segmentos (Diaz, 1998) y de esta manera estar estabilizando la estructura del canal, permitiendo su maduración.

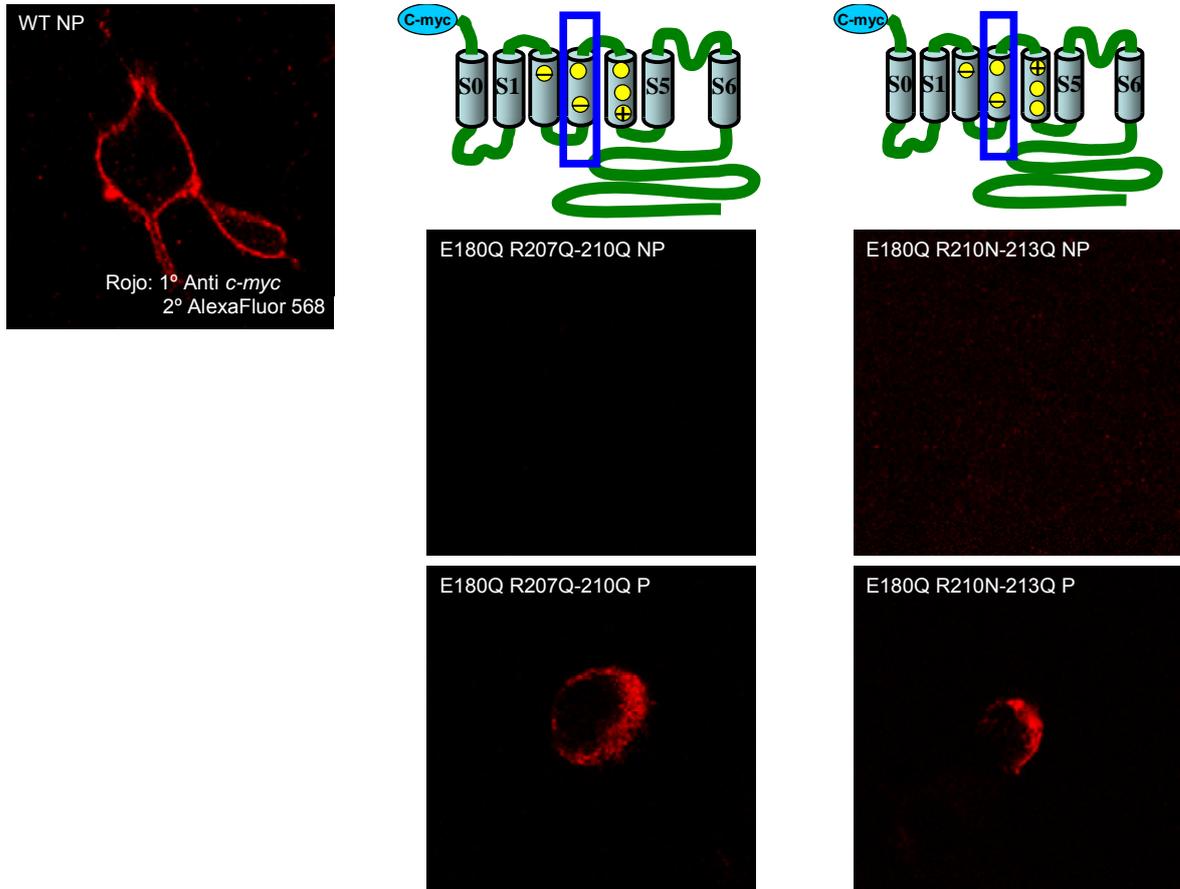
Por analogía con el canal *Shaker*, los residuos del segmento S2 implicados en los puentes salinos son E180 y D186, que corresponden a los residuos D310 y D316 en *Shaker*, respectivamente. Se probó la existencia del puente salino conformado por los residuos E180Q y los pares R207Q-R210Q y R210N-R213Q del segmento S4 y por los residuos D186N y los pares R207Q-R210Q y R210N-R213Q del segmento S4. Los resultados obtenidos por medio de experimentos de inmunofluorescencia fueron negativos, es decir, no se pudo rescatar la mutación inicial, ya que la proteína sigue sin ser funcional. Las figuras 21 y 22, muestran los resultados de los experimentos de inmunofluorescencia.

### **5.4 Reconstrucción y colocación 3D de la estructura celular, a partir de series de fotos (z-Stack).**

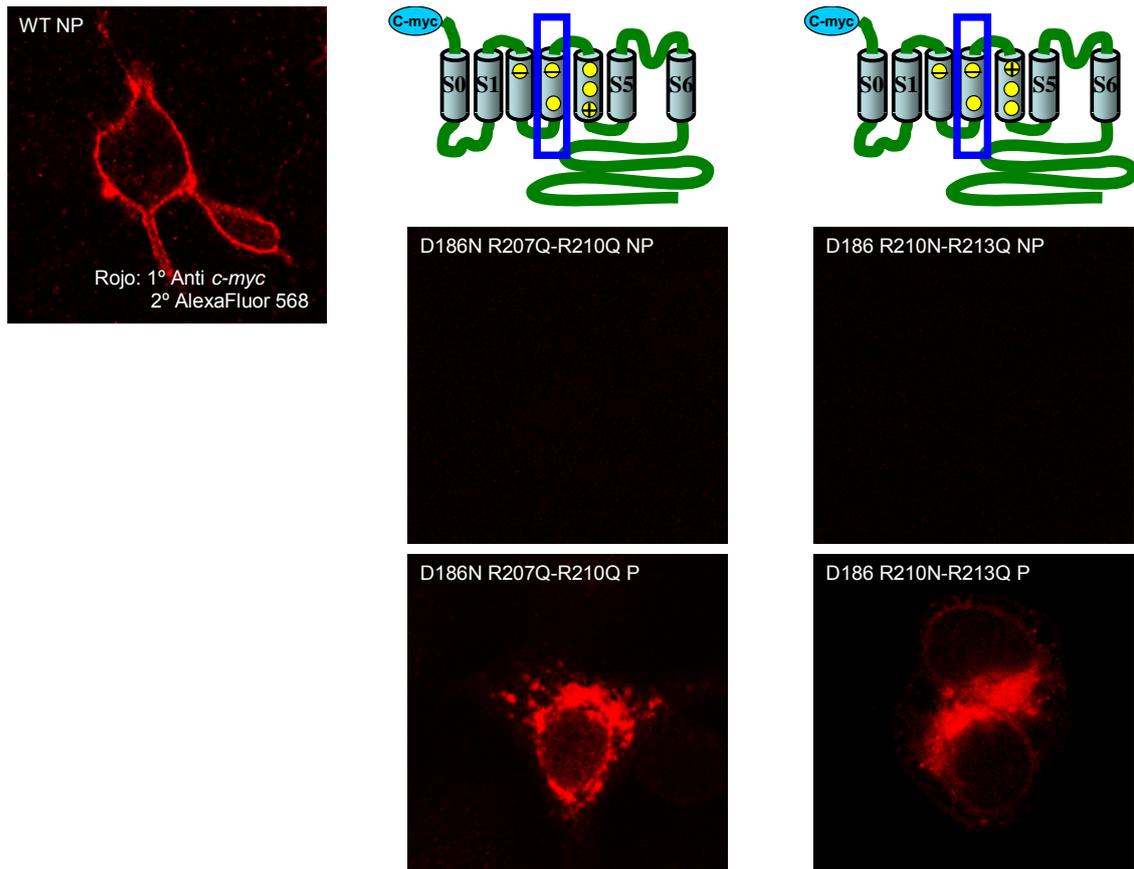
Como apoyo a los resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia, se hicieron reconstrucciones tridimensionales (3D) de las imágenes obtenidas con microscopía confocal, de esta manera se pudo reconstruir y mostrar un modelo 3D de las estructuras donde se encontraba la proteína estudiada, el canal hSlo. A continuación se describen los resultados obtenidos de las reconstrucciones utilizando el software desarrollado por el Dr. Steffen Härtel.



**Figura 20.** (A) Imágenes obtenidas con microscopía confocal. Células HEK 293 transfectadas con el canal hSlo silvestre (superior derecha) como control y con los mutantes del segmento S2, D153C (centro) y D153I (izquierda); **NP**, no permeabilizado; **P**, permeabilizado. (B) Topografía del canal mutante. Los residuos cargados se representan como círculos amarillos, la carga se representa como un signo más o menos, para indicar carga positiva o negativa, respectivamente. El residuo mutado aparece como un círculo amarillo sin carga (signo). (C) Registro electrofisiológico del canal D153I, obtenido en células HEK 293, utilizando la técnica de *patch clamp* en su configuración *cell-attached*.



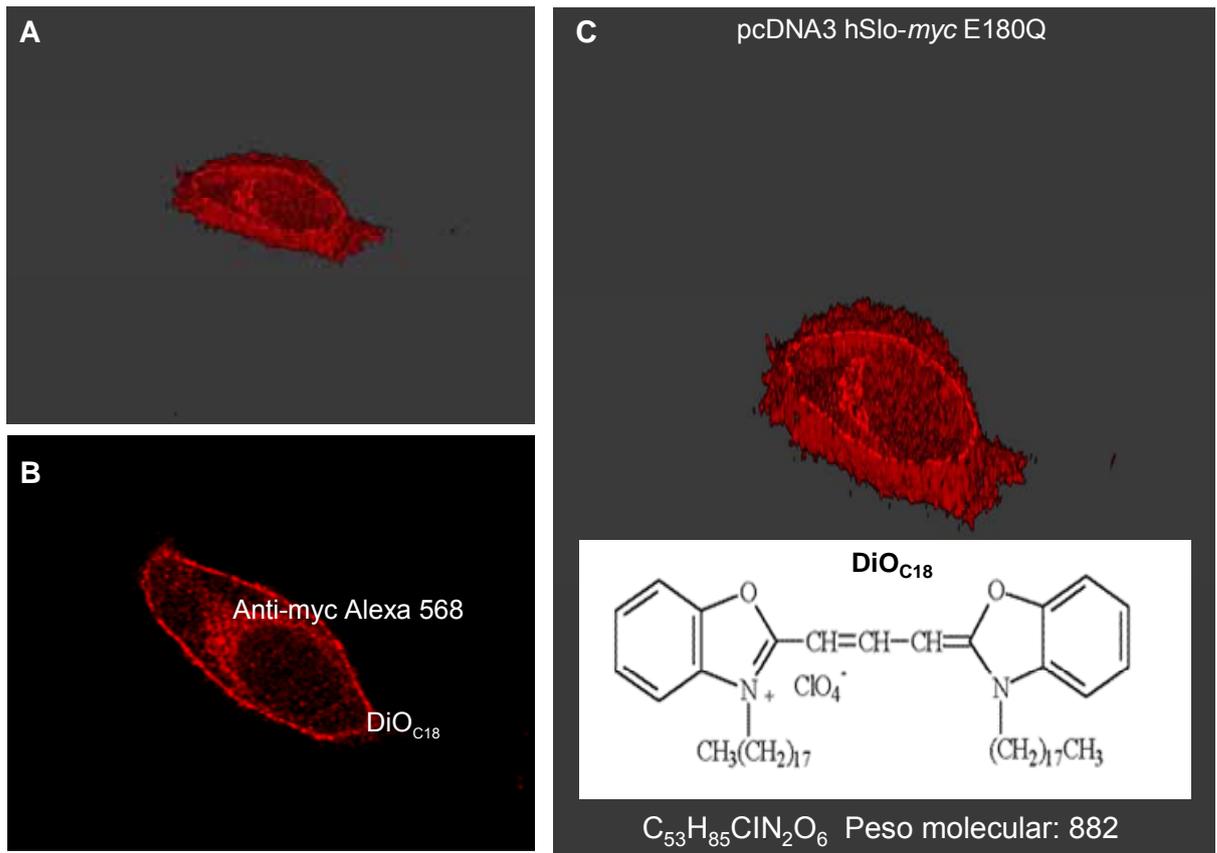
**Figura 21.** Imágenes obtenidas con microscopía confocal. Células HEK 293 transfectadas con el canal hSlo silvestre (superior izquierda) como control y con los mutantes, E180Q-R207Q-R210Q (centro) y E180Q-R210N-R213Q (derecha); **NP**, no permeabilizado; **P**, permeabilizado. En la parte superior de cada grupo de imágenes se muestra la topografía del canal mutante correspondiente. Los residuos cargados se representan como círculos amarillos, la carga se representa como un signo más o menos, para indicar carga positiva o negativa, respectivamente. Los residuos mutados aparecen como un círculo amarillo sin carga (signo).



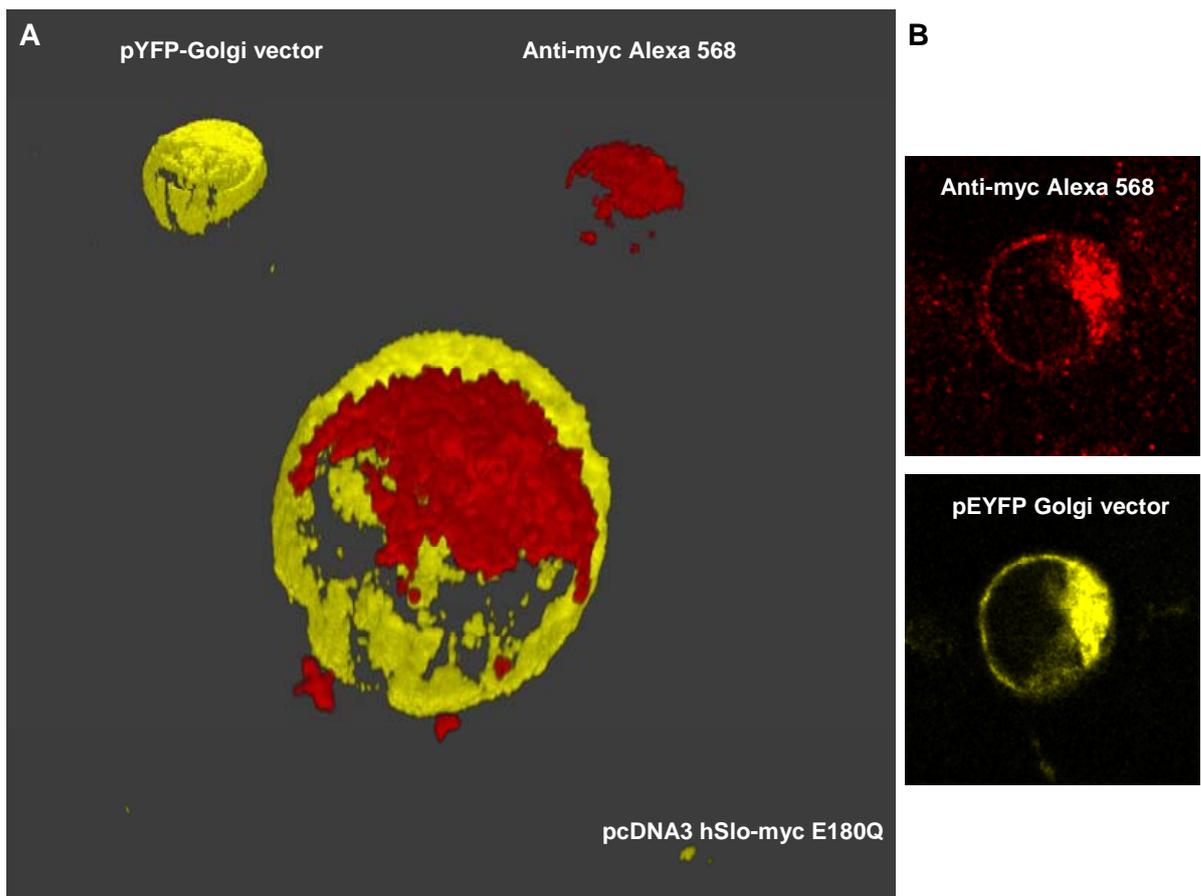
**Figura 22.** Imágenes obtenidas con microscopía confocal. Células HEK 293 transfectadas con el canal hSlo silvestre (superior izquierda) como control y con los mutantes, D180N-R207Q-R210Q (centro) y D186N-R210N-R213Q (derecha); **NP**, no permeabilizado; **P**, permeabilizado. En la parte superior de cada imagen se muestra la topografía del canal mutante correspondiente. Los residuos cargados se representan como círculos amarillos, la carga se representa como un signo más o menos, para indicar carga positiva o negativa, respectivamente. Los residuos mutados aparecen como un círculo amarillo sin carga (signo).

En la figura 23, se muestra a modo de ejemplo la imagen obtenida utilizando el microscopio confocal, junto con el resultado de la reconstrucción, de la mutación E180Q, la cual como se mencionó anteriormente es funcional cuando es expresada en oocitos.

También se realizaron ensayos de colocalización, para determinar el lugar físico en donde se quedaban las proteínas mutantes que no eran capaces de madurar, en la fig. 24 se muestra a modo de ejemplo, la misma proteína mutante E180Q, colocalizada con una proteína del aparato de Golgi que tiene adosada una YFP (*yellow fluorescent protein*, proteína fluorescente amarilla). Se muestran, la reconstrucción y las fotos obtenidas con microscopía confocal, tanto del canal, como del aparato de Golgi.



**Figura 23.** **(A)** Reconstrucción 3-D de una célula HEK 293 transfectada con el mutante E180Q-*myc*. El modelo tiene un corte virtual en el eje Z, de manera tal, que se puedan observar las estructuras al interior del modelo. **(B)** Una de las imágenes confocal de todo el *Z-stack* empleado en la reconstrucción 3-D, se indican, los anticuerpos (Anti-*myc* Alexa 568; Anti-*myc*, corresponde al anticuerpo 1°, *Sigma-Aldrich*. y Alexa 568, corresponde al anticuerpo 2°, Alexa Fluor 568, *Molecular Probes*) y marcador de membrana utilizados (DiO<sub>C18</sub>, 3,3 cycle – dioctadecyloxacarbo -cyanine perchlorate, *Biotium*). **(C)** Representación 3-D mostrada en **A**, con un poco más de aumento, para una mejor definición de las estructuras interiores, se incluye en la figura: la estructura química, fórmula química y peso molecular del marcador de membrana empleado DiO<sub>C18</sub>.



**Figura 24.** Representación 3D de 2 series de imágenes obtenidas por microscopía confocal, *Z-stack*. **(A)** Se muestran tanto, la reconstrucción del aparato de Golgi (en amarillo; esquina superior-izquierda), la reconstrucción del mutante E180Q-*myc*, dentro de la célula (en rojo; esquina superior-derecha) y la colocación de ambas (centro), en la representación se aprecia que el aparato de Golgi contiene en su interior al canal mutante E180Q-*myc*, es decir, el canal mutante E180Q-*myc* colocaliza con el aparato de Golgi. **(B)** Imágenes obtenidas con microscopía confocal, la imagen superior (rojo) corresponde al canal mutante E180Q-*myc*; la imagen inferior (amarillo) corresponde al aparato de Golgi (pEYFP-Golgi vector, *Calbiochem*). Se observa la similitud de las imágenes, lo que se debería a que se trata de la misma estructura.

## 6 DISCUSIÓN.

### **6.1 *Los canales hSlo expresados en oocitos de Xenopus laevis conservan los rasgos típicos de los canales K<sub>Ca</sub>.***

Las características de los canales hSlo expresados en este sistema, concuerdan con aquellos descritos para los canales nativos. Originalmente se describió que la activación de los canales K<sub>Ca</sub> era totalmente dependiente de la presencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio interno (Latorre y col., 1989; McManus, 1991). Esta visión ha sido profundamente modificada por los resultados que indican que los canales K<sub>Ca</sub> se pueden activar en respuesta a estímulos de potencial en forma independiente de la [Ca<sup>2+</sup>], en el intervalo comprendido entre 10 picomolar y 100 nanomolar (Meera y col., 1997; Cui y col., 1997). La relación entre P<sub>O</sub> de los canales K<sub>Ca</sub> y la [Ca<sup>2+</sup>], se puede describir con la ecuación de Hill (McManus, 1991). La [Ca<sup>2+</sup>] necesaria para alcanzar una P<sub>O</sub> = 0,5 a 0 mV (K) es 45 μM en el caso de hSlo, con un coeficiente de Hill de 0,7 (Diaz, 1998). Los valores de estos parámetros están también dentro de los límites descritos para los canales K<sub>Ca</sub> (McManus, 1991; Wallner y col., 1995).

### **6.2 *Rasgos estructurales y activación de los canales K<sub>Ca</sub>.***

La similitud de la estructura primaria de los canales K<sub>Ca</sub> con la de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de potencial permitió incluir a los primeros en la familia S4 de los canales iónicos dependientes del potencial (Jan y Jan, 1990; Atkinson y col., 1991; Adelman y col., 1992; Wallner y col., 1996). Los canales K<sub>Ca</sub> clonados hasta ahora tienen una estructura central de siete segmentos transmembranales (S0-S6) que es conservada en relación a los canales de la familia S4. Específicamente, la región que forma el poro de los canales K<sub>Ca</sub> tiene un alto grado de identidad con la región P de los canales de K<sup>+</sup> y los segmentos S2, S3 y S4 tienen aminoácidos cargados conservados en relación a los

canales dependientes de potencial (Wallner y col., 1996). Actualmente existe una plétora de resultados que indican que estos residuos cargados forman parte del sensor de potencial de los canales iónicos dependientes del potencial. Los resultados incluyen estudios de mutagénesis y caracterización de la dependencia del potencial de las corrientes iónicas o de compuerta de los canales de  $K^+$  (Lopez y col., 1991; McCormack y col., 1991; Papazian y col., 1991; Liman y col., 1991; Logothetis y col., 1992; Schoppa y col., 1992; Logothetis y col., 1993; Perozo y col., 1994; Papazian y col., 1995; Planeéis-Cases y col., 1995; Aggarwal y Mackinnon, 1996; Seoh y col., 1996; Tiwari-Woodruff y col., 1997), de los canales de  $Na^+$  (Stuhmer y col., 1989; Kontis y col., 1997; Kontis y Goldin, 1997) y de los canales de  $Ca^{2+}$  (García y col., 1996). Adicionalmente, estudios de accesibilidad al sensor de potencial putativo desde el medio interno o externo y la dependencia de ésta del estado de activación de los canales han proporcionado resultados que indican que efectivamente el sensor putativo se mueve en respuesta a cambios del potencial (Yang y Horn, 1995; Larsson y col., 1996; Mannuzzu y col., 1996; Yang y col., 1996; Starace y col., 1997,1998).

Los canales  $K_{Ca}$  poseen dos regiones que no se encuentran en los canales dependientes del potencial y que están involucradas en el proceso de activación: **i.** Un segmento transmembranal adicional (S0) previo al segmento S1, que dirige el extremo amino hacia el espacio extracelular (Wallner y col., 1996; Meera y col., 1997). El segmento S0 y parte de la cola amino extracelular le confieren a  $hS_0$  la capacidad de ser regulado por la subunidad  $\beta$ . Uno de los efectos de ésta subunidad  $\beta$  es reducir el voltaje necesario para alcanzar una  $P_O = 0,5$  ( $V^{1/2}$ ) para una  $[Ca^{2+}]$  dada, sin cambiar la dependencia del potencial de la activación (McManus y col., 1995; Meera y col., 1997; Wallner y col., 1996). **ii.** Una gran región carboxilo terminal, que constituye cerca de dos tercios del total de residuos del canal y que contiene 4 segmentos hidrófobos (S7 a

S10) probablemente intracelulares (Meera y col., 1997). Wei y col. (1994) demostraron que la región del extremo carboxilo que comprende los segmentos hidrófobos S9 y S10 es imprescindible para que los canales  $K_{Ca}$  se expresen funcionalmente y sugirieron además que este sería el dominio que contiene los sitios de unión de  $Ca^{2+}$ . Posteriormente se reportaron resultados que apoyaban esta hipótesis (Meera, P. y col., 1997; Schreiber y Salkoff, 1997; Moss, B. L. y col., 2001; Qian, X. y col., 2002).

### **6.3 Residuos involucrados en la detección del potencial de membrana en *hSlo*.**

Estudios previos concuerdan con el modelo en que la dependencia del potencial de la activación del canal es una consecuencia del movimiento del sensor de potencial intrínseco en el campo eléctrico (Díaz, 1998). Específicamente, los resultados demuestran que el segmento S4 del canal  $K_{Ca}$  *hSlo* es una parte importante del sensor de voltaje. El canal *hSlo* a diferencia de *Shaker* posee sólo tres residuos positivos en su segmento S4; las argininas 207, 210 y 213 (Fig.2, 3A). Se sabe que la neutralización de las argininas 210 y 213 reduce el número de cargas de compuerta, sugiriendo que estos residuos son los afectados por el potencial eléctrico (Díaz, 1998).

### **6.4 Las mutaciones que suprimen la expresión de las corrientes *hSlo* plantean interacciones posibles entre los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4.**

Desde el punto de vista estructural, los resultados obtenidos con las mutaciones del segmento S4, sugieren que la estructura del sensor de voltaje del canal  $K_{Ca}$  *hSlo* es distinta de la del sensor del canal  $K_V$  *Shaker*. En *hSlo* todas las mutaciones simples de este segmento originaron canales funcionales (Díaz y col., 1998), es decir, canales capaces de conducir corriente iónica. Las mutaciones realizadas en los segmentos S2 y

S3 incluyeron a aquellas en que los residuos ácidos conservados fueron neutralizados o revertidos en su carga como también aquellas en que los residuos ácidos, polares o hidrófobos, pero que en el canal *Shaker* son básicos, se neutralizaron o mutaron por residuos cargados positivamente. Solo una neutralización simple en el segmento S3, (ácido glutámico 180 a glutamina) fue capaz de producir canales funcionales (Fig. 13). Estos resultados difieren notablemente de los reportados para el canal *Shaker*. En este canal la neutralización o reversión de carga de los residuos K374 y R377 en el segmento S4 eliminan la expresión (Papazian y col., 1991; Papazian y col., 1995; Tiwari-Woodruff y col., 1997). Adicionalmente la reversión de la carga del residuo ácido E283 del segmento S2 reduce en un 50 % la cantidad de la forma madura de la proteína *Shaker*. La reversión de la carga de los residuos D310 y D316 del segmento S3 produce una disminución de un 60 % o 100 % de la forma madura de *Shaker*, respectivamente.

La supresión de la expresión inducida por estas mutaciones se ha explicado proponiendo que los residuos cargados interactúan electrostáticamente con residuos de carga opuesta, para formar pares iónicos o redes de cargas interactuantes que se estabilizan entre sí en el ambiente hidrófobo interno de la proteína. Al neutralizar un residuo se elimina una de las cargas del par iónico o de la red de cargas, generándose un exceso de carga no apareada. Dado que energéticamente es desfavorable mantener una carga en un medio hidrófobo, la estructura de la proteína se haría inestable, perdiendo su configuración funcional (Papazian y col., 1995) y como resultado la proteína no completaría con éxito el proceso de maduración y se quedaría rezagada en alguno de los orgánulos que participan en el proceso de maduración (Myers y col., 2004). Los experimentos de supresión intragénica o rescate génico han permitido establecer cuáles son las interacciones entre los residuos cargados de los segmentos

S2, S3 y S4 de *Shaker*. Esta metodología se usa normalmente para establecer interacciones electrostáticas entre aminoácidos con carga opuesta en una proteína (Papazian y col., 1995).

La neutralización del glutamato 180 en el segmento S3 de hSlo (E180Q) es el único residuo que no suprime la expresión (Fig. 3A, 11, 24). En *Shaker* el residuo equivalente es el aspartato 310. Al igual que en hSlo, la neutralización de este residuo (D310N) produce canales funcionales.

Cuando se compara la expresión del mutante E180Q con el canal silvestre, se observa una gran diferencia que depende de la  $[Ca^{2+}]$  interno. Cuando el canal se activa en presencia de  $Ca^{2+}$  (2,5  $\mu$ M), el canal mutante se comporta de forma muy similar al canal silvestre. Sin embargo cuando la activación se realiza en forma independiente de la  $[Ca^{2+}]$ , aproximadamente 200 nM, el canal mutante incrementa la energía necesaria para activarse, es decir, desestabiliza el estado abierto con respecto al estado cerrado (Fig. 15).

Por otro lado, la neutralización de la arginina 213 por una asparagina (R213N), suprime la expresión del canal hSlo. Esto es curioso ya que las mutaciones puntuales de las argininas 207, 210 y 213, producen canales funcionales.

Cuando se realiza una mutación doble en que las argininas 207 y 210 del segmento S4 se neutralizan simultáneamente (R207Q-R210Q) suprime la expresión, lo mismo ocurre cuando las argininas 210 y 213 del segmento S4 se neutralizan simultáneamente (R210N-R213Q) y cuando las tres argininas presentes en el segmento S4 son neutralizadas simultáneamente (R207Q-R210Q-R213Q). Estos resultados son consecuentes con una interacción entre un residuo negativo presente en el segmento S2 o S3 con los residuos cargados positivamente R207 y R210 ó R210 y R213 del segmento S4 (Fig. 3A).

### **6.5 Rescate génico de los mutantes dobles del segmento S4 con residuos del segmento S3.**

En *Shaker* la pérdida de expresión inducida por la mutación de neutralización o inversión de carga de la lisina 374 de *Shaker* (glutamina 216 en hSlo), puede ser contrarrestada por mutaciones supresoras del aspartato 316 en el segmento S3 o del glutamato 293 del segmento S2.

Para comprobar la putativa interacción de los residuos E180 y D186, del segmento S3 con pares de residuos del segmento S4, se realizaron mutaciones puntuales en cada uno de los residuos del segmento S3 en los canales que tenían neutralizadas las dos argininas superiores (R207-R210) o las dos inferiores (R210-R213). De esta manera, si estos residuos formaban puentes salinos, la expresión del triple mutante, debería ser recuperada, pero, como se muestra en la figura 21 y 22, no fue así. Los experimentos de inmunofluorescencia realizados en células HEK 293, muestran que no hay expresión de la mutante E180Q-R207Q-R210Q y E180Q-R210N-R213Q, ni de la mutante D186N-R207Q-R210Q y D186N-R210N-R213Q.

Todos estos resultados indican diferencias entre los segmentos S2, S3 y S4 de hSlo y *Shaker* y sugieren que la estructura del sensor de potencial en estos canales es diferente.

### **6.6 Rescate génico del mutante D153N, presente en el segmento S2.**

Como se mencionó anteriormente, existen residuos que favorecen la inserción de las proteínas en la membrana (Hessa y col., 2005). Los estudios concluyeron que existen residuos que favorecen la integración en la membrana de segmentos transmembrana que poseen residuos cargados. Donde se destacan por su alto grado de favorecimiento los residuos: isoleucina, leucina, fenilalanina, valina, cisteína y

metionina. La utilización de esta nueva herramienta arrojó como resultado la recuperación de la mutante D153N, del segmento S2.

Estos resultados estarían indicando que no solo es necesaria una red de interacciones electrostáticas para estabilizar al sensor de potencial, sino que además existirían otro tipo de interacciones. Recientemente se sugirió por medio de dinámica molecular que es posible una interacción electrostática entre las cadenas laterales de las argininas presentes en el segmento S4 con los fosfolípidos, cuando éste es introducido en una bicapa lipídica (Feites, J. A. y col., 2005). Esto podría explicar porque es posible recuperar la expresión del canal hSlo, cuando se neutraliza un ácido aspártico por una isoleucina o una cisteína, ambos hidrófobos.

### **6.7 Reconstrucción y colocación 3D de la estructura celular.**

Las herramientas computacionales empleadas hicieron posible la obtención de un modelo 3D de la célula (gracias al empleo de marcadores de membrana) y del aparato de Golgi (gracias al empleo de marcadores de aparato de Golgi). Lo que permitió observar la célula dentro de un marco tridimensional (3D).

El software empleado nos permite rotar el modelo 3D en la dirección que se desee, de esta manera se puede, por ejemplo, observar la célula desde una posición inferior a ésta y de esta manera, ver como es por dentro o como se ve desde abajo. También se pueden realizar cortes simulados en el modelo 3D, de manera tal que es posible apreciar la estructura celular de una forma muy detallada.

Estos resultados apoyan los obtenidos mediante microscopía confocal, ya que los modelos 3D, son construidos tomando las imágenes obtenidas con microscopía confocal, pero, los enseñan como un modelo 3D, de manera tal que se puede asegurar

con precisión la posición exacta de las proteínas, para el canal *hSlo* silvestre y sus mutantes en la membrana celular, o la ausencia de éstas de la membrana celular.

Los análisis convencionales para determinar el grado de colocación, se basan en porcentaje de color superpuesto, es decir, es una medida estadística, no física. Por medio de modelos 3D, fue posible observar mediante modelos computacionales el grado de colocación de una manera más palpable. La figura 24, muestra una colocación en 3D, en la que se aprecia claramente que la proteína, canal *hSlo*, es contenida por el aparato de Golgi, es decir, el canal está en el aparato de Golgi.

Esta herramienta esta aún en un proceso de optimización, por lo tanto, no es de extrañar si en un futuro próximo se descubren nuevas aplicaciones.

## 7 CONCLUSIONES.

7.1 Las mutaciones de los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4 que no se expresan funcionalmente quedan retenidos en el aparato de Golgi. Y no llegan a la membrana celular.

7.2 Los canales hSlo fueron expresados exitosamente en oocitos de *Xenopus laevis*. En este sistema de expresión las corrientes macroscópicas poseen características que concuerdan plenamente con los rasgos de los canales  $K_{Ca}$  observados en los tejidos mismos.

7.3 El sensor de potencial de hSlo está formado en parte por los segmentos S2, S3 y S4. Aún no se podido establecer cual es el tipo de interacción que existe entre los residuos cargados de los segmentos S2, S3 y S4, que estabiliza el canal. No se descarta la carencia de interacciones electrostáticas intra-segmentos.

7.4 Estabilidad del sensor de potencial de hSlo, no depende exclusivamente de las interacciones electrostáticas existentes entre residuos, sino que además dependería de otras interacciones existentes, aún no definidas.

## 8 BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, P. R., Constanti, A., Brown, D. A. y Clark, R. B., 1982. Intracellular Ca<sup>2+</sup> activates a fast voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature (Lond)*. 296: 746-749.
- Adelman, J. P., Shen, K. Z., Kavanaugh, M. P., Warren, R.A., Wu, Y-N., Lagrutta, A., Bond, C. T. y North, R. A., 1992. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*. 9: 209-216.
- Aggarwal, S. K. y Mackinnon, R., 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *Neuron*. 16: 1169-1177.
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J. y Gaber, R. F., 1992. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 3736-3740.
- Armstrong, C. M. y Bezanilla, F. 1973. Current related to movement of gating particles of sodium channels. *Nature (Lond)*. 242: 459-461.
- Atkinson, N. S., Robertson, G. A. y Ganetzky, B., 1991. A component of calcium-activated potassium channel encoded by the *Drosophila slow* locus. *Science*. 253: 551-555.
- Bezanilla, F., 2002. Voltage sensor movements. *J. Gen. Physiol.* 4: 465-473.
- Blatz, A. L. y Magleby, K. L., 1987. Calcium-activated potassium channel. *Trends in Neurosci.* 10: 463-467.
- Brayden, J. E. y Nelson, M. T., 1992. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channel. *Science*. 256: 532-535.

- Cui, J., Cox, D. H. y Aldrich, R. W., **1997**. Intrinsic voltage dependence and Ca<sup>2+</sup> regulation of mSlo large conductance Ca-activated K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* **109**: 647-673.
- Díaz, F., **1998**. *Papel del segmento transmembranal S4 en la dependencia del potencial del canal de K<sup>+</sup> activado por calcio, hSlo*. Tesis doctoral. Universidad de Chile. Santiago. Chile.
- Diaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L. y Latorre, R., **1998**. Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *J. Biol. Chem.* **49**: 32430-32436.
- Doyle, G. A., Betz, N. A., Leeds, P. F., Fleisig, A. J., Prokipcak, R. D. y Ross, J. **1998**. The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **22**: 5036-5044.
- Elinder, F., Mannikko, R. y Larsson, H. P. **2001**. S4 charges move close to residues in the pore domain during activation in a K channel. *J. Gen. Physiol.* **1**: 1-10
- Elkins, T., Ganetzky, B. y Wu, C-F., **1986**. A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 8415-8419.
- Finn, J. T., Grundwald, M. E. y Yau, K-W., **1996**. Cyclic nucleotide-gated ion channels: An extend family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 395-426.
- Gandhi, C. S. e Isacoff, E. Y. **2002**. Molecular models of voltage sensing. *J. Gen. Physiol.* **4**: 455-463.
- Garcia, J., Nakai, J., Imoto, K. y Beam, K. G., **1996**. Role of S4 segments and the leucine hepat motif in the activation of an L-type calcium channel. *Biophys.* **72**: 2515-2523.

- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann B. y Sigworth, F. J. **1981**. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **2**: 85-100
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S. H. y Von Heijne, G., **2005**. Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature.* **433**: 377-381.
- Hilgemann, D. W., **1989**. Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflugers Arch.* **2**: 247-249.
- Hille, B., **2001**. *Ionic channel of excitable membranes*. Edited by B. Hille. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachussets. Second Edition.
- Hodking, A. L. y Huxley, A. F., **1952**. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. of Physiol.* **117**: 500-544.
- Horn, R., **2002**. Coupled movements in voltage-gated ion channels. *J. Gen. Physiol.* **4**: 449-453.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. y Pease, L. R., **1990**. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* **77**: 61-68.
- Jan, L. Y. y Jan, Y. N., **1990**. A superfamily of ion channel. *Nature.* **345**: 672.
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T. y MacKinnon, R., **2001**. Structure of the RCK domain from the E. coli K<sup>+</sup> channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron.* **3**: 593-601.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T. y MacKinnon, R., **2002**. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature.* **417**: 512-522.

- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T. y MacKinnon, R., **2003**. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*. **423**: 33-41
- Kaupp, U. B., **1991**. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *Trends Neurosci*. **14**: 150-157.
- Keynes, R. D. y Rojas, E., **1974**. Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J. Physiol*. **239**: 394-434.
- Kontis, K. J., Rounaghi, A. y Goldin, A. L., **1997**. Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J. Gen. Physiol*. **110**: 391-401.
- Kontis, K. J. y Goldin, A. L., **1997**. Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positives charges. *J. Gen. Physiol*. **110**: 403-413.
- Laine, M., Lin, M. C., Bannister, J. P., Silverman, W. R., Mock, A. F., Roux, B. y Papazian, D. M., **2003**. Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels. *Neuron*. **39**: 467-481.
- Laine, M., Papazian, D. M. y Roux, B., **2004**. Critical assessment of a proposed model of Shaker. *FEBS Lett*. **564**: 257-263.
- Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S. e Isacoff, E. Y. **1996**. Transmembrane movement of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel S4. *Neuron*. **16**: 387-397.
- Latorre, R. **1994**. Molecular workings of large conductance (maxi) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. "Handbook of membrana channels: molecular and cellular physiology". Capítulo 5. C. Peracchia, ed. Acad. Press. NY. 79-102.
- Latorre, R. Oberhauser, A., Labarca, P. y Alvarez, O., **1989**. Varieties of channels. *Annu. Rev. Physiol*. **51**: 385-399.

- Lawson, K., **2000**. Is there a role for potassium channel openers in neuronal ion channel disorders?. *Expert Opin. Investig. Drugs*. **10**: 2269-2280.
- Liman, E. R., Hess, P., Weaver, F. y Koren, G., **1991**. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature*. **353**: 752-756.
- Li-Smerin, Y., Hackos, D. H. y Swartz, K. J., **2000**. Alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J. Gen. Physiol.* **115**: 29-32.
- Logothetis, D. E., Movahedi, S., Satler, C., Lindpaintner, K. y Nadal-Ginard, B., **1992**. Incremental reductions of positive charge within the S4 region of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel result in corresponding decrease in gating charge. *Neuron*. **3**: 531-540.
- Long, S. B., Campbell, E. B. y Mackinnon, R., 2005 a. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science*. **309**: 897-903.
- Long, S. B., Campbell, E. B. y Mackinnon, R., 2005 b. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*. **309**: 903-908.
- Lopez, G. A., Jan, Y. N. y Jan, L. Y., **1991**. Hydrophobic substitution mutations in the S4 sequence alter voltage-dependent gating in *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *Neuron*. **7**: 327-336.
- McCormack, K., Tanouye, M. A., Iverson, L. E., Lin, J-W., Ramaswani, M., McCormack, T., Campanelli, J. T., Mathew, M. K. y Rudy, B., **1991**. A role for hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 2931-2935.
- McManus, O. B., **1991**. Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**: 537-560.

- Meech, R. W., **1978**. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**: 1-18.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M. y Toro, L., **1997**. Large conductance voltage and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N-terminus and an intracellular (S9-S10) C-terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 14066-14071.
- Millar, C., Moczydlowski, E., Latorre, R. y Phillips, M., **1985**. Charibdotoxin, a protein inhibitor of single Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from mammalian skeletal muscle. *Nature.* **313**: 316-319.
- Morales, B., Labarca, P. y Bacigalupo, J., **1995**. A ciliary K<sup>+</sup> conductance sensitive to charibdotoxin underlies inhibitory responses in toad olfactory receptor neurons. *FEBS Lett.* **359**: 41-44.
- Moss, B. L. y Magleby, K. L., **2001**. Gating and conductance properties of BK channels are modulated by the S9-S10 tail domain of the alpha subunit. A study of mSlo1 and mSlo3 wild-type and chimeric channels. *J Gen Physiol.* **118**: 711-34.
- Myers, M. P., Khanna, R., Lee, E. J. y Papazian, D. M., **2004**. Voltage sensor mutations differentially target misfolded K<sup>+</sup> channel subunits to proteasomal and non-proteasomal disposal pathways. *FEBS Lett.* **568**: 110-116.
- Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F. y Standen, N. B., **1990**. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* **259**: (1 Pt1), C3-C18.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J. y Lederer, W. J., **1995**. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science.* **270**: 633-636.

- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G. y Latorre, R. **2002**. New Disguises for an Old Channel: MaxiK Channel  $\beta$ -Subunits. *News in Physiological Sciences* **17**: 156-161.
- Pallota, B. S., Magleby, K. L. y Barret, J. N., **1981**. Single channel recording of  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^{+}$  currents in rat muscle cell culture. *Nature*. **293**: 471-474.
- Papazian, D. M., Timple, L. C., Jan, Y. N. y Jan, L. Y., **1991**. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channels by mutations in the S4 sequence. *Nature*. **349**: 305-310.
- Papazian, D. M., Shao, X. M., Soh, S. A., Mock, A. F., Huang, Y. y Wainstock, D. H., **1995**. Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in *Shaker*  $\text{K}^{+}$  channels. *Neuron*. **14**: 1293-1301.
- Papazian, D. M., Silverman, W. R., Lin, M. C., Tiwari-Woodruff, S. K. y Tang, C. Y., **2002**. Structural organization of the voltage sensor in voltage-dependent potassium channels. *Novartis Found. Symp.* **245**: 178-190.
- Perozo, E., Santacruz-Tolosa, L., Stefani, E., Bezanilla, F. y Papazian, D. M., **1994**. S4 mutations alter gating currents of *Shaker*  $\text{K}^{+}$  channels. *Biophys. J.* **66**: 1022-1027.
- Planells-Casels, R., Ferrer-Montiel, V., Patten, C. D. y Montal, M., **1995**. Mutation of conserved negatively charged residues in the S2 and S3 transmembrane segments of a mammalian  $\text{K}^{+}$  channel selectively modulates channel gating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 9422-9426.
- Qian, X., Nimigean, C. M., Niu, X., Moss, B. L. y Magleby, K. L., **2002**. Slo1 tail domains, but not the  $\text{Ca}^{2+}$  bowl, are required for the beta 1 subunit to increase the apparent  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of BK channels. *J. Gen. Physiol.* **120**: 829-843
- Roux, B. y MacKinnon, R., **1999**. The cavity and pore helices in the KcsA  $\text{K}^{+}$  channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science*. **285**: 100-102.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., **1989**. Molecular cloning, A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Press. Chap 13.
- Schreiber, M. y Salkoff, L., **1997**. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys. J.* **73**: 1355-1363.
- Seoh, S. A, Sigg, D., Papazian, D. M. y Bezanilla, F., **1996**. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *Neuron*. **16**: 1159-1167.
- Silverman, W. R., Roux, B. y Papazian, D. M., **2003**. Structural basis of two-stage voltage-dependent activation in K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**: 2935-2940.
- Starace, D. Stefani, E. y Bezanilla, F., 1997. Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *Neuron*. **19**: 1319-1327.
- Starace, D., Stefani, E. y Bezanilla, F., **1998**. Histidine scanning mutagenesis indicates full translocation of two charges of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel voltage sensor. *Biophys. J.* **74**: A265 (Resumen).
- Stefani, E., Ottolia, M., Noceti, F., Olcese, R., Wallner, M., Latorre, R. y Toro, L., **1997**. Voltage-controlled gating in a large conductance Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel (hSlo). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 5427-5431.
- Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H. y Numa, S., **1989**. Structural parts involved in activation and inactivation of sodium channel. *Nature*. **339**: 597-603.
- Tiwari-Woodrufft, S. K., Schulteis, C. T., Mock, A. F. y Papazian, D. M., **1997**. Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of *Shaker* K<sup>+</sup> channel subunits. *Biophys. J.* **72**: 1489-1500.

- Tiwari-Woodruff, S. K., Lin, M. A., Schulteis, C. T. y Papazian, D. M., **2000**. Voltage-dependent structural interactions in the Shaker K(+) channel. *J. Gen. Physiol.* **115**: 123-138.
- Toro, L. y Scornik, F., **1991**. Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K channels from coronary smooth muscle. "Ion channels of vascular smooth muscle cells and endothelial cells". Eds.: Sperelakis and Kuriyama; pags. 11-114.
- Toro, L., Wallner, M., Meera, P. y Tanaka, Y., **1998**. MaxiK<sub>Ca</sub>, a unique member of voltage-gated K<sup>+</sup> channel superfamily. *News Physiol. Sci.* **13**: 112-117.
- Wallner, M., Meera, P., Ottolia, M., Kaczorowski, G., Latorre, R., Garcia, M. L., Stefani, E. y Toro, L., **1995**. Cloning, expression and modulation by a  $\beta$ -subunit of a human maxi K<sub>Ca</sub> channel cloned from human myometrium. *Receptors and Channels.* **3**: 185-199.
- Wallner, M., Meera, P. y Toro, L., **1996**. Determinant for  $\beta$ -subunit regulation in maxi K<sub>Ca</sub> channels: and additional transmembrane region at the N-terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 14922-14927.
- Wei, A., Solaro, C. R., Lingle, C. J. y Salkoff, L., **1994**. Calcium sensitivity of BK-type K<sub>Ca</sub> channels determined by a separable domain. *Neuron.* **13**: 671-681.
- Yang, N., George, A. L. J. y Horn, R., **1996**. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channel. *Neuron.* **16**: 113-122.
- Yang, N. y Horn, R., **1995**. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron.* **15**: 213-218.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. y MacKinnon, R., **2001**. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature.* **414**: 43-48.