

03086  
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR  
DEPARTAMENTO DE BIOFISICA  
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE CANALES DE  
POTASIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN CUYA  
COMPOSICION PARTICIPAN SUBUNIDADES  
CODIFICADAS POR GENES DE LA SUBFAMILIA  
SHIII EN NEURONAS CENTRALES DE MAMIFERO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

EL M. en C.F. JOSE RICARDO HERNANDEZ PINEDA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO HERNANDEZ CRUZ.

273619

MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi Mama,  
¿necesito decir mas?

A Adriana  
Simplemente por todo, digo, nomás por todo.

A mi hermano Gabriel y a su maravillosa familia.

A mi prima Rosario  
Por tenerla aqui, bien cerca.

Quiero agradecerle al Dr. Arturo Hernández Cruz por todo lo que me enseñó, por su paciencia, ayuda y apoyo durante mi estancia en su laboratorio. A los Doctores Laura Escobar, Elvira Galarraga, Mauricio Diaz, Froylan Gomez, y Jorge Sanchez por el tiempo que dedicaron para revisar este trabajo y sus valiosos comentarios.

Al Dr. Bernardo Rudy y a su equipo en el Centro Médico de la Universidad de Nueva York por todas las facilidades y atenciones brindadas.

Tendríamos que reconocer que lo que somos, lo que deseamos para nosotros y para los demás, lo que pensamos y lo que soñamos, es resultado de nuestra interacción con gente a la que queremos (o no queremos), a la que admiramos (o no) y quienes nos ponen el ejemplo de lo que queremos (o no queremos) llegar a ser en el futuro. Esta es una de las pocas oportunidades que se tienen para hacer público nuestro agradecimiento a todos ellos por todo lo que nos enseñan. Así pues:

Muchísimas gracias a toda la comunidad del IFC. A quienes me pusieron un ejemplo a seguir y a quienes hicieron lo contrario (todo sirve).

A Alejandro Zentella uno de esos ejemplos a seguir. Por su amistad y por todas las cosas que me enseñó.

A Gerardo, Ana, Juan y a todo el Departamento de Computo del IFC. Además de ser buenos y entrañables amigos sin su ayuda nada más no funcionaría nada nunca.

A todos mis amigos, nuevos y viejos (no los nombro a cada uno por miedo a omitir a alguno) porque hacen el camino más fácil y ligero.

A Marie Claire, Hanna y Tatiana por su enorme amistad, confianza, paciencia, cariño, etc etc etc. Me tocó la fortuna conocerlas.

A toda la familia Estrada, su correspondiente en Bernal y a la combinación Estrada-Bernal. Por ser como son.

Naturalmente a mi Universidad: la Universidad Nacional Autónoma de México. Siempre será más grande que sus problemas, con su comunidad o a pesar de ella. Lo que me dió es mucho más de lo que le podré pagar jamás.

A los hermanos Lumiere. Por ese inventito suyo.

Al que tenga la paciencia de leer este trabajo: gracias

Esta tesis fué realizada gracias a los donativos 2366PN del CONACYT para Arturo Hernández Cruz, NS-30989 y NS-35215 del National Institute for Neurological Disorder and Stroke, IBN 9209523 del National Science Foundation ambos para Bernardo Rudy y a las becas otorgadas por el CONACYT y por Fundación UNAM para cumplir con los estudios del Doctorado y para la realización de una estancia en la Universidad de Nueva York respectivamente, para el autor de esta tesis.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección y en el laboratorio del Dr. Arturo Hernández Cruz en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en colaboración con el Dr. Bernardo Rudy y su equipo en el Centro Médico de la Universidad de Nueva York.

# CONTENIDO

Introducción.	1
Canales Iónicos Dependientes de Voltaje.	4
Canales de Sodio y Calcio.	6
Canales de Potasio.	8
Antecedentes Específicos.	11
Familia <i>Shaker</i> .	11
Subfamilia Kv3.	23
Características Electrofisiológicas.	27
Distribución Tisular y Celular.	30
Un Papel Funcional para los Canales Kv3.	38
Globo Pálido.	41
Anatomía.	45
Electrofisiología.	50
Objetivos.	55
Objetivos Particulares.	56
Materiales y Métodos.	57
Resultados.	68
Discusión.	104
Conclusiones.	119
Bibliografía.	121
Anexo1	142

# INTRODUCCION

La membrana plasmática es el principal organelo de interacción entre la célula y el medio externo. Su papel primordial es el mantener las diferencias entre ambos ambientes controlando la entrada y salida de materiales al tiempo que participa en la regulación metabólica y en las interacciones de célula a célula (Darnell et al, 1990). Posee un papel fundamental en la transducción, generación y transmisión de la información en el sistema nervioso, músculos y otros tejidos excitables (Hille, 1992; Aidley y Stanfield, 1996; Johnston y Miao-Sin, 1995).

En el sistema nervioso, las células neuronales se distinguen por su capacidad de responder a diferentes estímulos ambientales mediante la generación de cambios característicos y transitorios en el potencial de membrana llamados potenciales de acción (PA). Con el fin de explicar en términos fisico-químicos los eventos macroscópicos que subyacen a la generación y propagación de los PA, A. L. Hodgkin y A. F. Huxley desarrollaron durante los años 50 la descripción fenomenológica de las propiedades eléctricas de la membrana celular llegando a proponer que bajo dicho fenómeno existen cambios dependientes de voltaje en las permeabilidades específicas para los iones de sodio y potasio.

Los principios básicos de generación de los potenciales de acción han sido agrupados bajo la hipótesis iónica de la teoría eléctrica de la membrana y pueden resumirse de la siguiente manera: a) se desarrollan a través de unidades discretas de membrana, b) dependen de las diferencias de concentración iónica a cada lado de la membrana y, c) se producen debido a que ésta es selectivamente permeable hacia algunos iones. Como corolario podríamos agregar que la corriente eléctrica que fluye a través de la membrana es producto del movimiento iónico.

Las mencionadas "unidades discretas de membrana" corresponden a un grupo de proteínas integrales llamadas genéricamente canales iónicos. Estos regulan los cambios de la permeabilidad iónica absoluta y por lo tanto, la conductancia de los distintos iones que fluyen a través de la membrana plasmática (Aidley y Stanfield, 1996; Hille, 1992).

La existencia de dichas proteínas, si bien sugerida por los experimentos de Hodgkin y Huxley, fue propuesta por primera vez en 1972 por Bernard Katz y Ricardo Miledi, quienes suponían su existencia cuando trataron de medir con alta resolución la corriente iónica evocada por la acetilcolina en la placa neuromuscular (Katz y Miledi, 1972).

En 1976, Irvin Neher y Bert Sakmann observaron por primera vez corrientes iónicas fluyendo a través de lo que ellos llamaron "canales iónicos" (Neher y Sakmann, 1976 <sup>a,b</sup>).

La naturaleza proteica de estos canales quedó demostrada tras los estudios de expresión funcional de las subunidades que conforman al receptor de acetilcolina (ACh) obtenido mediante técnicas de DNA recombinante a partir de la placa neuromuscular de la raya *Torpedo californica* en ovocitos de *Xenopus* (Mishina et al, 1984).

Los canales iónicos son los elementos fundamentales de la señalización en el sistema nervioso. Ellos generan y regulan de manera específica las corrientes eléctricas en las neuronas, controlando así la secreción de hormonas y neurotransmisores. Se encargan de la traducción de estímulos químicos y mecánicos en respuestas eléctricas que puedan enlazar los eventos extracelulares con los intracelulares. Están íntimamente ligados con las respuestas fisiológicas a corto y a largo plazo que subyacen a la plasticidad neuronal.

Es posible agrupar la enorme diversidad de canales iónicos descritos hasta la fecha, en diferentes clases de acuerdo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas (Watson y Abbot, 1992). Básicamente, los canales iónicos se han clasificado en:

- 1) Canales Extracelulares Activados por Ligando: Esta superfamilia incluye proteínas constituidas de 5 subunidades polipeptídicas cada una de

ellas con 4 regiones transmembranales. Sus ligandos prototípicos son neurotransmisores clásicos.

- 2) **Canales Intracelulares Activados por Ligando:** Son similares estructuralmente a sus homólogos extracelulares. Entre sus ligandos prototípicos encontramos al AMPc, al GMPc, al  $Ca^{++}$  y a las proteínas G.
- 3) **Canales Activados por Voltaje:** Esta superfamilia agrupa entre otros a los canales de sodio, potasio y calcio. La estructura terciaria de estos canales es tetramérica. Cada uno de los 4 subdominios está constituido una subunidad que a su vez está formada por seis regiones transmembranales. Característicamente contiene una subunidad rica en residuos aminoácidos positivos la cual es capaz de "sensar" el voltaje a través de la membrana plasmática. Poseen poros permeables altamente selectivos.
- 4) **Canales Catiónicos:** Estos están constituidos por 5 subunidades y son regulados por nucleótidos intracelulares como el GMP. Son poco selectivos y están implicados fisiológicamente en la transducción de señales entre diversas células receptoras como los conos y bastones de la retina.

# CANALES IONICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE

En la mayoría de las células excitables, el potencial de acción es producto de la despolarización del potencial de reposo membranar (comúnmente mas negativo que  $-80$  mV) a niveles más positivos que el umbral. Dicha despolarización puede ser generada por corrientes sinápticas, por corrientes despolarizantes provenientes de regiones que han sido previamente despolarizadas durante la propagación del potencial de acción, por marcapasos celulares o por corrientes inyectadas mediante un electrodo.

Básicamente, el potencial de acción en el axón consta de dos fases:

A) Una pequeña despolarización iniciada por cualquiera de los mecanismos antes mencionados produce la apertura de algunos canales selectivos a los iones sodio, permitiendo así su difusión al interior celular en favor de su gradiente de concentración. Esto causa que al acercar el potencial de membrana al potencial de equilibrio para este ion ( $+50$  mV), se abran mas canales selectivos al ion sodio, produciendo una gran corriente iónica dependiente de sodio que genera la fase inicial rápida del potencial de acción.

En algunas células, la depolarización durante el ascenso del PA puede estar complementada (y en ocasiones hasta substituída) por canales selectivos a iones calcio. Por ejemplo, en el músculo cardíaco de mamíferos y en algunas células musculares lisas de invertebrados, el PA es llevado a cabo principalmente por canales de calcio de manera similar a como ocurre con los canales de sodio (Tsien et al, 1988; Snutch y Reiner, 1992). El calcio que ingresa al interior celular durante esta fase también actúa como segundo mensajero primario e inicia el acoplamiento excitación-contracción en la fibras musculares, el acoplamiento excitación-secreción y otros múltiples procesos metabólicos.

B) El potencial de acción se termina y se revierte por la activación tardía de canales de potasio sensibles al voltaje. Estos canales se abren lentamente

durante el curso temporal de la activación de los canales de sodio, permitiendo el flujo de potasio siguiendo su gradiente difusional hacia el exterior celular, induciendo así la repolarización de la membrana celular al acercar su potencial al de equilibrio electroquímico para el potasio (~ -80 mV). Por esta razón, se considera que todas las corrientes de potasio son inhibitorias. En otras palabras, los canales de potasio al abrirse producen una corriente saliente (hiperpolarizante) que tiende a neutralizar a las corrientes entrantes (despolarizantes) de sodio y de calcio principalmente (figura 1).

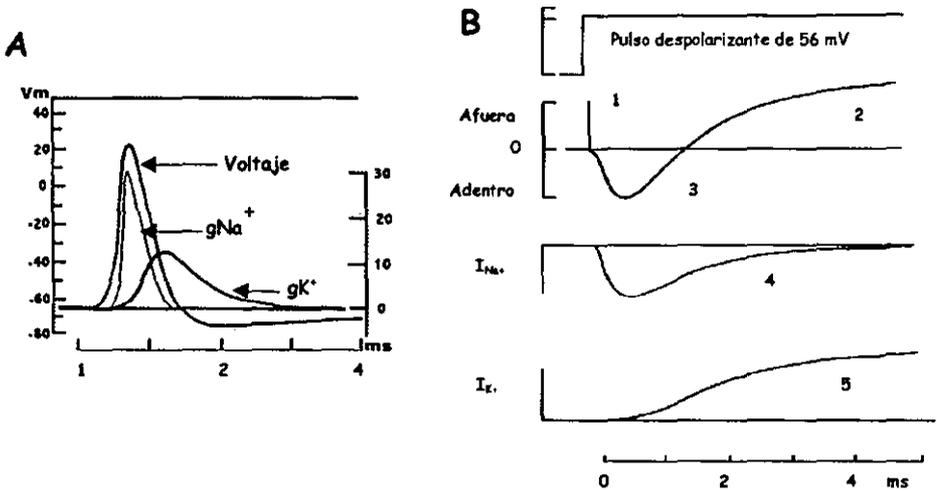


Figura 1. Potencial de acción. **A:** Curso temporal de los principales componentes iónicos durante un potencial de acción. Se muestran superpuestas las corrientes de sodio y potasio con relación al potencial de acción en propagación (V). Se indica en el eje izquierdo el potencial en milivoltios de la membrana, en el eje derecho la amplitud total de cada uno de los componentes también en milivoltios y en la parte inferior la duración total en milisegundos.  $g_{Na^+}$ , conductancia de sodio.  $g_{K^+}$ , conductancia de potasio. **B:** Cursos temporales de cada uno de los componentes mostrados en A. En el gráfico superior se encuentra el pulso despolarizante de 56 mV aplicado a la membrana celular. Inmediatamente abajo se muestra la corriente producida por el pulso anterior; se puede ver que consta de tres componentes: 1. Transitorio capacitivo (artefacto de estimulación), 2. Corriente rectificadora sostenida y 3. Corriente transitoria entrante. La corriente transitoria representa a la conductancia de sodio (4), mientras que la de tipo rectificante es debida a una conductancia de potasio (5). En parte inferior se muestra el curso temporal en milisegundos.

Tomada de Nicholls et al, 1992.

Los estudios moleculares iniciados en años recientes con el aislamiento de la proteína constitutiva del canal de sodio del órgano eléctrico de la anguila

(*Electrophorus*, Noda et al, 1984), han mostrado que los canales iónicos de sodio, calcio y potasio que responden a cambios en el potencial de membrana, constituyen una superfamilia cuyos miembros están relacionados entre sí debido a la presencia de características estructurales en común.

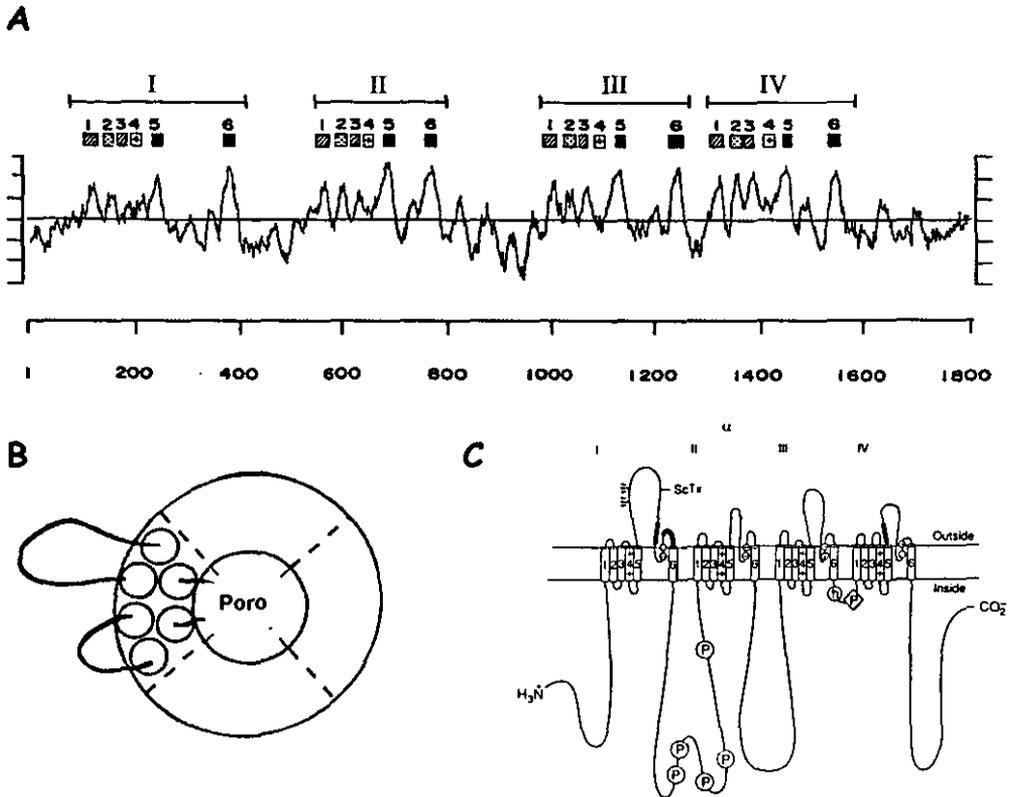
## **Canales de Sodio y Calcio.**

Molecularmente estos canales, de los cuales se han identificado diferentes isoformas en numerosos tejidos y organismos (Noda et al, 1984; Kayano et al, 1988; Ramaswami y Tanouye, 1989; Rogart et al, 1989; Trimmer et al, 1989; Snutch y Reiner, 1991; Gautron et al, 1992; Snutch et al, 1992), están constituidos por complejos proteicos de aproximadamente 260 kDa organizados en cuatro dominios homólogos (D1-D4) unidos entre sí mediante conectores. Cada uno de estos dominios está formado a su vez, por seis segmentos transmembranales denominados convencionalmente S1 a S6 (Noda et al, 1984; Thomsen y Catterall, 1989). Diversas evidencias proponen que la proteína funcional está organizada en una estructura tetramérica con un poro de conducción central (para revisión ver Tang et al, 1994; figura 2).

Funcionalmente, aunque las proteínas que conforman los canales de sodio (subunidades  $\alpha$ ) bastan para generar corrientes iónicas en condiciones fisiológicas, se ha encontrado que pueden estar acompañadas de una o dos subunidades más pequeñas ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ; Isom et al, 1992) provenientes de su propia familia de RNA's mensajeros (Auld et al, 1988), capaces de afectar las propiedades cinéticas de las subunidades  $\alpha$  cuando son co-transfectadas en sistemas heterólogos de expresión (Mandel, 1993). En contraste, los canales de calcio son complejos heteromultiméricos: la subunidad  $\alpha$  se encuentra unida a diversas subunidades auxiliares ( $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) que regulan sus propiedades cinéticas (Johnston y Miao-Sin, 1995).

La multiplicidad de genes existentes para los canales de sodio y calcio es sorprendente si se considera que las propiedades biofísicas de estos canales son bastante similares entre sí (Barchi, 1987). Sin embargo, la distinta distribución

tisular que exhiben sugiere que pueden estar siendo usados diferencialmente en los tejidos donde se les encuentra (Kayano et al, 1988).



**Figura 2.** Panel **A**: Perfil de hidrofobicidad del canal de sodio dependiente de voltaje de la anguila eléctrica. El eje vertical indica el Índice de hidropatía. Los picos positivos representan segmentos con una alta proporción de residuos hidrofóbicos que estructuralmente se interpretan como  $\alpha$ -hélices capaces de cruzar la membrana en su totalidad (S1-S6). Los dominios homólogos o subunidades están indicados por números romanos, los segmentos transmembranales números arábigos. En el eje inferior se indica el número aproximado de aminoácidos en toda la secuencia. **B**: se muestra un canal ensamblado tal y como puede ser visto desde la parte exterior de la membrana plasmática. Cada dominio está indicado por una línea punteada. Puede observarse que cada subunidad está constituida por seis dominios transmembranales. **C**: Esquema donde se ve la topología propuesta para la secuencia mostrada anteriormente conservando la notación mencionada. Las asas, denominadas H5, responsables del poro de permeación, se encuentran fuera de la membrana lipídica entre los segmentos transmembranales S5-S6. Los círculos pequeños en dichas regiones indican los sitios de unión a tetrodotoxina en tanto que los rectángulos negros están indicando los sitios de unión a otras toxinas y con una banda oscura encontramos el sitio de unión a la saxitoxina. Los símbolos  $\psi$  indican los sitios involucrados en glucosilaciones de tipo N. Los sitios de fosforilación por AMPc se indican con una P, en tanto que aquellos fosforilados por PKC en diamantes. Tomado de Noda et al, 1984 y Catterall, 1992.

## **Canales de Potasio.**

De todos los canales iónicos dependientes de voltaje descritos hasta la fecha, los de potasio son los más abundantes y pueden ser encontrados en prácticamente cualquier célula eucariótica (Latorre y Miller, 1983; Rudy, 1988<sup>c</sup>; Hille, 1992; Johnston y Miao-Sin, 1995). En contraste con las corrientes de sodio y calcio, las de potasio varían ampliamente en su cinética, dependencia del voltaje, farmacología y comportamiento unitario.

Los canales de potasio regulan el potencial de reposo de la membrana, tanto en las células eléctricamente excitables como en las no excitables (p.ej. los linfocitos, Hille, 1992; Chandy et al, 1990<sup>a</sup>). En las neuronas, determinan la forma, la duración, la dependencia temporal y modulan la frecuencia de disparo. Poseen un papel vital en la codificación y decodificación de señales así como en la integración neuronal de tal forma que la existencia de un amplio repertorio de patrones de disparo puede estar reflejando la necesidad de una enorme diversidad de canales de potasio (Shuster et al, 1986; Rudy, 1988<sup>c</sup>; Hille, 1992, Johnston y Miao-Sin, 1995).

Farmacológicamente, son blanco de diversas drogas, toxinas, neurotransmisores y segundos mensajeros. Algunas sustancias que incrementan o decrecientan la actividad de los canales de potasio han sido caracterizadas fisiológicamente como antiisquémicos, antiaritmicos, antihipertensivos y antianginosos (Lynch et al, 1992; Katz, 1993; Grover, 1994; Oesen, 1994; Li et al, 1995; Quast et al 1995). Significativamente numerosos venenos de serpientes, abejas, escorpiones, anémonas, arañas y caracoles marinos contienen péptidos que bloquean la función de estos canales (Stanfeld et al, 1987; Castle y Strong, 1986; para revisión ver Dreyer, 1990).

Las mutaciones en los genes que codifican para esta familia de canales iónicos han sido asociadas con diversas enfermedades como la ataxia episódica (Adelman et al, 1995), la arritmia cardíaca (Curran et al, 1995; Sanguinetti et al, 1995), la miotonía (Rudel y Lehmann-Horn, 1985) la fibrosis quística (Welsh y Fick, 1987) el lupus eritematoso (Grissmer et al, 1988) y el control de la liberación

de insulina por los niveles de azúcar (Petersen y Findlay, 1987). Asimismo han sido involucrados en diversas funciones durante la fertilización (Hagiwara y Yoshii, 1979) y en el fenotipo *Weaver* del ratón (Patil et al, 1995).

En la actualidad se han identificado más de 80 diferentes genes que codifican para los canales de potasio en distintos organismos. Básicamente, tal cantidad de genes pueden ser clasificados de acuerdo a dos criterios: el primero de ellos, estructural, considera el número de segmentos transmembranales (TM) que componen a cada subunidad  $\alpha$ . De acuerdo con esto, se agrupan en tres diferentes superfamilias:

- 1) Superfamilia 2 (2TM)
- 2) Superfamilia 4 (4TM)
- 3) Superfamilia 6 (6TM)

Los canales 2TM (Canales Sensibles a ATP y Rectificadores entrantes  $K_{IR}$ ), están representados por los rectificadores anómalos o entrantes presentes en prácticamente todos los organismos. Los 4TM incluyen a los canales de potasio con 2 poros identificados en *C. elegans* (Salkoff, comunicación personal). Mientras que la superfamilia de 6TM o canales homólogos a *Drosophila Shaker* se encuentra a su vez subdividida en 6 familias presentes en todos los metazoarios: *KQT*, Eter a Go-Go (*EAG*), *slo*, *CNG*, *SK* y *Shaker* (*Sh*; Jan y Jan, 1998). El segundo criterio, funcional, estaría definido por las características del canal unitario, los mecanismos de compuerta, la cinética, la dependencia del voltaje y la farmacología. De acuerdo con esto, los canales de potasio se agrupan como se indica en la tabla 1.

Por razones que se explican más adelante, el presente trabajo está enfocado a investigar en neuronas específicas del sistema nervioso central (SNC), las características funcionales de una subfamilia particular de canales de potasio dependientes de voltaje (6TM).

**Tabla 1.**

**CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS CANALES DE POTASIO.**

---

Canales de Potasio Dependientes del Voltaje.

Rectificadores Retardados o Tardíos ( $K_{DR}$ )  
Transitorios o Inactivantes ( $K_A$ )  
Rectificadores Entrantes ( $K_{IR}$ )

---

Canales de Potasio Activados por Calcio.

Canales de Alta Conductancia ( $BK_{Ca^{++}}$ )  
Canales de Conductancia Intermedia ( $I_{Ca^{++}}$ )  
Canales de Baja conductancia ( $S_{Ca^{++}}$ )

---

Canales de Potasio Activados por Sodio ( $K_{Na}$ )

---

Canales de Potasio Acoplados a Receptores.

Corrientes Tipo M ( $K_M$ )  
Activados por Acetilcolina ( $K_{ACh}$ )  
Activados por Serotonina (S5-HT)

---

Canales de Potasio Modulados Metabólicamente.

Modulados por ATP ( $K_{ATP}$ )  
Modulados por Oxígeno ( $K_{O_2}$ )  
Modulados por Acidos Grasos ( $K_{FA}$ )

---

Tomada de Soria y Ceña 1998.

## ANTECEDENTES ESPECIFICOS.

Los canales iónicos son, en algunos casos esenciales para la viabilidad y el desarrollo normal de los organismos superiores, por lo que la inducción, selección y descripción de mutantes condicionales (aquellos que no expresan un fenotipo obvio bajo condiciones normales de crecimiento -condición permisiva- pero que expresan el fenotipo mutante bajo condiciones controladas -condición no permisiva-) donde existan alteraciones estructurales de ellos, es necesario para comprender su funcionamiento y significado fisiológico. Desafortunadamente, muy pocos organismos son apropiados para tales estudios. Uno de ellos, es la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) debido principalmente al escaso número de cromosomas que presenta y a lo corto y bien descrito de su ciclo de vida. En este artrópodo han sido descritas dos estrategias de selección de mutantes condicionadas que producen hiperexcitabilidad membranal: 1) sensibilidad a anestésicos y, 2) sensibilidad a la temperatura.

Hasta el momento han sido tres las mutaciones descritas como sensibles a anestesia: a) *Shaker* (Kaplan y Trout, 1969), b) *Hipercinética* (Ikeda y Kaplan, 1970; Kaplan y Trout, 1969) y, 3) *Eter a-go-go* (EAG, Ganetzky y Wu, 1983; Wu y Ganetzky, 1983).

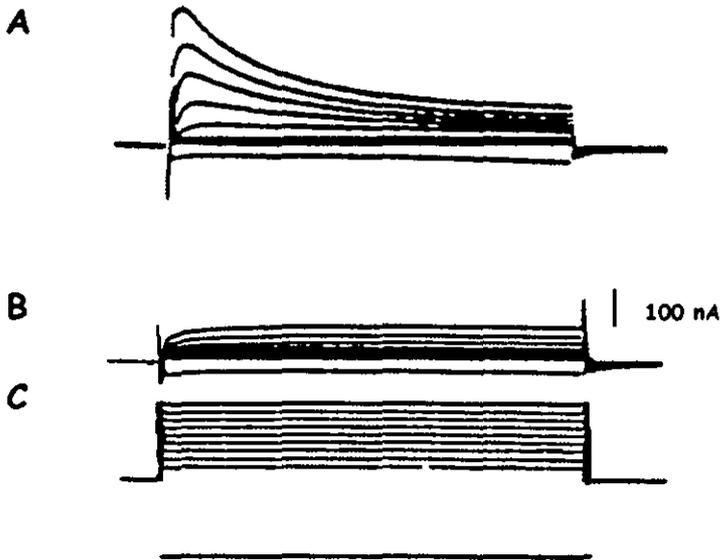
De todas ellas, *Shaker* (*Sh*) es la más estudiada.

### **Familia *Shaker*.**

En 1969, Kaplan y colaboradores describieron la mutación *Shaker* ("Agitante"). Las moscas con este fenotipo bajo anestesia con éter, mostraron anormalidades motoras caracterizadas por sacudidas intensas e irregulares en las patas, alas y abdomen. Fisiológicamente, las larvas *Shaker* (en donde la mutación es más evidente) mostraban períodos anormalmente prolongados e irregulares durante la liberación de neurotransmisor en la placa neuromuscular lo que sugería un problema durante la repolarización de la terminal sináptica (Jan et al, 1997<sup>a b</sup>). Los registros intracelulares realizados en las neuronas del ganglio cervical gigante de estos mutantes, revelaron la presencia de retardos anormalmente largos

durante la repolarización de los potenciales de acción presinápticos lo que conducía a una liberación irregularmente larga de neurotransmisores (Tanouye et al, 1981).

La aplicación en las células normales de 4-aminopiridina (4-AP), un bloqueador inespecífico de canales de potasio, reprodujo algunos de los signos observados en las moscas mutantes, mientras que su aplicación en éstas carecía de efecto (Tanouye et al, 1981). El empleo de la técnica de fijación de voltaje (Voltage-Clamp) en las células musculares de mosca adulta, reveló que la mutación *Sh* eliminaba selectivamente una conductancia de potasio dependiente de voltaje de tipo A o inactivante ( $I_A$ ), lo que retardaba la repolarización de la membrana durante la contracción muscular (Salkoff, 1983). Se sugirió entonces que el locus *Shaker* codificaba al menos para algún elemento estructural de un canal de potasio (figura 3).



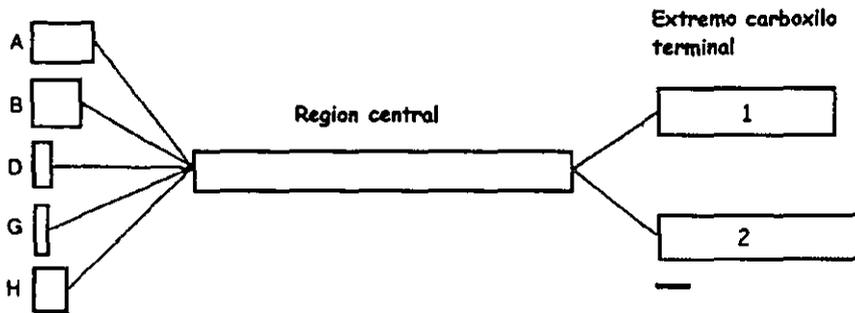
**Figura 3.** Experimentos conducidos bajo condiciones de fijación de voltaje que muestran la alteración producida por la mutación *Shaker* en las células musculares de *Drosophila melanogaster*. **A:** Corriente normal. **B:** Corriente mutante. Todos los registros fueron realizados en miócitos en el estado de 72 horas de desarrollo pupal. Los trazos mostrados en **C** corresponden al protocolo de pulsos empleado partiendo de un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV despolarizando en pasos de  $10$  mV cada vez hasta un máximo de  $+40$  mV. La barra inferior representa  $500$  milisegundos. Tomado de Salkoff y Tanouye, 1986.

El locus *Sh* fué identificado mediante la técnica de análisis de traslocación de mutaciones en la banda politénica 16F del cromosoma 1X de la *Drosophila melanogaster* (Tanouye et al, 1981).

En 1987, Tempel y colaboradores (Tempel et al, 1987) caracterizaron a partir del cDNA de la región *Shaker* de *Drosophila* a 2 clonas que solo diferían en tamaño: *ShA1* y *ShA2*. La transcripción de ambos genes sugirió que el producto era una proteína de 616 aminoácidos con un peso aproximado de 7,200 daltones, en tanto que el análisis de hidropatía reveló que la proteína poseía un centro hidrófobo y 6 dominios transmembranales flanqueados por extremos amino y carboxilo-terminales hidrofílicos y citoplásmicos.

Pronto se identificaron 4 diferentes transcritos homólogos a *Shaker*: *ShA*, *ShB*, *ShC* y *ShD*, los que inyectados en ovocitos de *Xenopus* produjeron corrientes salientes de potasio inactivantes (de tipo A) con similar dependencia del voltaje de activación pero con distinta cinética de inactivación (Schwarz et al, 1988; Timpe et al, 1988<sup>a, b</sup>). Quedo claro que los diferentes productos del gen *Shaker* eran suficientes para formar canales de potasio funcionales cuyas corrientes poseen características cinéticas similares a las descritas en los músculos pupales y larvales de *Drosophila* (Timpe et al, 1988<sup>a, b</sup>). Para entonces, los grupos de trabajo de Baumann (1987; 1988) y Papazian (1987) habían mostrado mediante mapeos cromosómicos del locus *Sh*, que existían al menos 3 diferentes mutaciones de este gen (*Sh*<sup>KS133</sup>, *Sh*<sup>102</sup> y *Sh*<sup>5</sup>) distribuidas a lo largo de 60kb de DNA que afectaban diferentes aspectos cinéticos y de dependencia al voltaje de la corriente I<sub>A</sub>. En *Drosophila*, sin embargo, la secuenciación de los nuevos homólogos ( *A*, *B*, *C* y *D*) reveló que la región central del complejo de transcripción *Sh* comprendía 8 exones comunes entre ellos agrupados a lo largo de únicamente 10kb de DNA genómico, mientras que los exones variables, que supuestamente codificaban para los extremos amino y carboxilo-terminales, estaban distribuidos en una región bastante mas amplia. En el extremo 3' de la región común se encontraron 2 exones mutuamente excluyentes, un grupo era compartido por los transcritos de las clases *A* y *C*, mientras que el otro lo era en *B*

y *D*. En el extremo 5' se describieron 3 diferentes exones: uno para *C*, otro para *D* y el último que era compartido por *A* y *B* (Iverson et al, 1988; Kamb et al, 1988<sup>a,b</sup>; Schwarz et al, 1988). En otras palabras: las proteínas esperadas poseían regiones centrales idénticas mientras que los extremos amino y carboxilo-terminales diferían de transcrito a transcrito. Esto sugería que el gen *Sh* comprendía a una larga y compleja unidad de transcripción capaz de sufrir procesamiento alternativo de exones, generando así múltiples transcritos secundarios y numerosas variantes de la proteína (Papazian et al, 1987; Kamb et al, 1987; Pongs et al, 1988; Schwartz et al, 1988, figura 4).



**Figura 4.** Sitios de procesamiento alternativo de exones en la familia de canales de potasio *Shaker*. La región central, que contiene a los segmentos S1 a S5 y H5, es común en todos los transcritos. Esta región se puede combinar con cualquiera de los cinco diferentes extremos amino-terminales y con cualquiera de los dos diferentes S6 y extremos carboxilo-terminales. La terminología empleada en este modelo da los nombres a los diferentes productos tales como como *Shaker A1* o *D2*. La barra de calibración es equivalente a 20 aminoácidos. Tomado de Pongs, 1992.

Utilizando sondas contra los diferentes extremos amino y carboxilo-terminales en los individuos con mutaciones totales de *Shaker* que continuaban mostrando corrientes salientes de potasio tipo A, fue posible el aislamiento de los primeros homólogos del gen *Sh* a partir de una biblioteca génica de *Drosophila* adulta: *Shab*, *Shaw* y *Shal* (Baumann et al, 1988; Tempel et al, 1988; Butler et al, 1989, 1990; Wei et al, 1990). Cada uno de ellos reside en diferente loci y puede encontrarse incluso duplicado: *Shab* y *Shal* se encuentran en el cromosoma 3L, *Shab* posee una copia en el locus 63A y *Shal* en el 76 B, en tanto que *Shaw* esta

en el cromosoma 2L en los loci 24B-C (Butler et al, 1989). Todos ellos se expresan de manera regulada durante el desarrollo y poseen propiedades cinéticas y farmacológicas diferentes.

Al igual que en *Sh*, el análisis molecular mostró que cada uno de estos genes homólogos, esta formado por un complejo génico constituido de un segmento central altamente conservado y varios intrónes y exones variables flanqueados por secuencias consenso indicativas de procesamiento alternativo de exones (figura 5).

MASVAAULPFAZAAAIGVPIATHPLEPPTPKDQSK *Shal* 37

TDDKLLKVVVGRREFYWRNLTKEYFDY L LUSNEEEF *Shal* 74  
 FCRRVVWVWVQLAFPTQLLETNQFPDY L LQDFARLR *Shak* 101  
 H E V V L E V Q Q I E H E T Y K A T E K K I P A Y E L S E L T E A I A *Shaw* 44  
 V E S R Y S T H V O Q V R E E V L V R T L E R L E R T R E C E L Q E C T T H E A I V E L *Shab* 318

FVDEDCKEYVWVDEDFDIFRHYIEMYYTPTQKLEWYVPHKFCITSY D *Shal* 116  
 YFDPLRHWVDFDSRPSDFDAIILYTIQSQR L R F P V W V P L D V V S *Shak* 144  
 H V D S I L H E E S P D R E E P C V P A Q V L E Y I H E T Q K L E H E T V V Q G P L V E *Shaw* 86  
 C D D Y S L A D N E H E V D E H E K E S S I L H E P L R A T Q K L E I Y E R H N G V L A V G *Shab* 360

E E L A F F Q I M P D V I C D C Y T E D F R D E K E N A E R Y N D S E L S E N E D Q L Q L T N Q R *Shal* 168  
 E V L E P Y E L C D Q A E M E R Y D S F I K E E Z R P L P M E C C R *Shak* 181  
 E E L E F W G L E S N Q V E P C C N T T T Q R G T O T E L A V L D L D T E P S E Z L A R K P F R E D Y T K T I S V *Shaw* 152  
 D D L E Y W Q V Q E L Y L E S C O Q R D K Q E Z E W H E E N G E A R S U R Q R D E E F C E R G S E Y *Shab* 415

Q E H U R A P T E N E H T S T S L L V F Y V I C P F E I A V S V R A N V V V V V *Shal* 207  
 E V L E P Y E P E S S Q A A R V V A I E E V V I L L S I V I F G L R Y Y *Shak* 219  
 H V D E P R I U S L E D E P Y B N A A K T I C V V E V F F I C S I L S F C L K T H *Shaw* 196  
 Q R Y L V E L L E K P N T S F A A E V I A V I S I L P I V L S T I A L T L N T E *Shab* 456

P C G H R P G R A N Y L P G G E R Y V I V E F C L D E A G V N I F T A E Y I E L L F A A F *Shal* 252  
 E E I K F Y E L C D Q A E M E R Y D S F I K E E Z R P L P M E C C R *Shak* 212  
 E D N R V P I R M I T V K T A M S N G V L F D T Y T H A I A P E Y E C W C H A V S T T E L I L V R F I S V *Shaw* 254  
 P Q L Q I T D M T P Q D N Q L A M V E A V C I T V T L E I L E Y S E E F *Shab* 496

D R C E V V E E V S I Y D V V A T M P Y T I C E G I T D N D D V S G A F *Shal* 289  
 E K I E F Y E L C D Q A E M E R Y D S F I K E E Z R P L P M E C C R *Shak* 212  
 H K W E P I E S V E I D Y I A T L S F Y I D L V L Q R F A S H L E R A *Shaw* 291  
 D L Y E E P E C G L E I E D L L A I L P T V V S L F E L E T N M A T D Q F Q *Shab* 529

V T L E V V E V V Y E V E F S E H S Q Q R I Y G Y T L E S C A S E Y *Shal* 324  
 E V I L L V A V Y R I F K L E R R S K G L Q Y L G R T L K A S H R E L *Shak* 366  
 E I L I P F S T I R E W L F K V T R H S S G L K I L I Q T F R A S A K E E *Shaw* 329  
 V V R L V V Q V V L E I L R V L K Y A R H S T G L Q S E G P T E R N E Y K E L *Shab* 570

G L F V S E T A A E I I P A T V H F T A E R N V G S T H F T E P A T P V Y *Shal* 363  
 G L I P P L F I G V L P S E A T V F A E A G S E V S F F K E I P O A P V U *Shak* 405  
 T L L Y F F L V L G I V T P A S I L Y Y A E R I Q P E P H N D F N H I P L C L U E *Shaw* 370  
 G L L H L F L A N G V L I F S R L A T P A E K E K D T K F V S I P C A P V E *Shab* 609

T I V T H T T L C T G D M V P E T I A C K I V G C V C S E S G V E V T A E P V P Y *Shal* 404  
 A V T M T T V G Y G D M T P V G F U G K I V G S L C V V A G V E T I A L P P V Y *Shak* 446  
 A L V T M T T V G Y G D M A P K T Y I G H F V G A L C A L A G A G V T I A L P V P V *Shaw* 411  
 A G I T H T T V G I R I H I C P T T A L Q K V I G T V C C I C G V L V V A L P I P I *Shab* 650

I V S H P S R I Y H Q H Q R A D E R K A Q S K A L A R I R I A K A S S C A A F V S I D G A A E A R W A A Q S G I E L *Shal* 464  
 I V S H P S R I Y H Q H Q R A D E R K A Q S K A L A R I R I A K A S S C A A F V S I D G A A E A R W A A Q S G I E L *Shak* 468  
 I V S H P A N Y I S H T Q A R A R L P E K E *Shaw* 433  
 I V H P A E E V T K N Q H R E K A L R R E *Shab* 672

D N Y R D E D I F E L Q H H L L R C L E K T T T U *Shal* 490

Figura 5. Comparación de 4 secuencias de cDNA de la familia de canales de potasio dependientes de voltaje en *Drosophila*. A la extrema izquierda se encuentran las posiciones relativas de los aminoácidos en cada fila y el nombre de la secuencia particular. Dos o mas residuos idénticos en la misma posición están sombreados. Las regiones que cruzan la membrana están subrayadas y nombradas de acuerdo al segmento particular al que pertenecen. Los asteriscos indican los residuos conservados en la mayoría de los canales dependientes de voltaje, incluidos los canales de sodio y calcio. El código de letra única es: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; Y, Tyr; el codón U es indicativo de alto en el marco de lectura. Tomado de Rudy, 1988.

De manera casi simultánea a la clonación del primer homólogo de *Drosophila Shaker (Sh)*, se aisló el primer gen que codificó para un canal de potasio en mamíferos a partir de una librería génica de cDNA de ratón, gracias a una sonda *ShA1* (Tempel et al, 1988). Este gene, denominado MBK1 (Mouse Brain K<sup>+</sup> Channel Gene Number 1) comparte el 65% de homología en la secuencia de aminoácidos con las proteínas de la familia *Drosophila Shaker* e incluso muestra una homología mayor (95%) en aquellas regiones que se consideran importantes para el funcionamiento del canal (p.ej. S4).

El análisis por Northern Blot mostró que en contraste con los múltiples transcritos generados por el gene *Sh*, MBK1 hibridizaba contra una sola banda de 8 Kb en el RNA del ratón. Lo que significaba que probablemente la estructura génica del canal difería entre moscas y mamíferos. Tan pronto como otros genes (MK2, MK3 y MK6; Chandy et al, 1990<sup>b</sup>; Migeon et al, 1992) fueron aislados y secuenciados, quedó claro que a pesar de la existencia de secuencias consenso para procesamiento alternativo de exones, cada uno de ellos existía como un sólo complejo exónico ininterrumpido representado una sólo vez en el genoma (Mount, 1982; Kamb et al, 1988<sup>b</sup>; Pongs et al, 1988; Schwarz et al, 1988).

Hasta el momento, han sido identificados aproximadamente 20 genes homólogos a *Shaker* en mamíferos. Basados en sus secuencias y por lo tanto en sus probables relaciones evolutivas, han sido divididos en cuatro grupos o subfamilias designadas *ShI*, *ShII*, *ShIII* y *ShIV*. Cada una de ellas mas similar a cada subfamilia de homólogos de *Drosophila* que a cualquiera otra, de tal forma que los genes *ShI* del mamífero son homólogos a *Shaker*, *ShII* a *Shab*, *ShIII* a *Shaw* y *ShIV* a *Shal* (Butler et al, 1989; Jan y Jan, 1989, 1992; Wei et al, 1990; Perney y Kaczmareck, 1991; Rudy et al, 1991<sup>a y b</sup>; Pongs, 1992; Salkoff et al, 1992). El análisis de cada subfamilia identificada en los mamíferos, ha reconocido la existencia de múltiples genes en ellas: siete en *ShI*, dos en *ShII*, cuatro en *ShIII* y tres en *ShIV* (Luneau et al, 1991; Rudy et al, 1992; Vega-Saenz de Miera, 1992<sup>b</sup>, tabla 2).

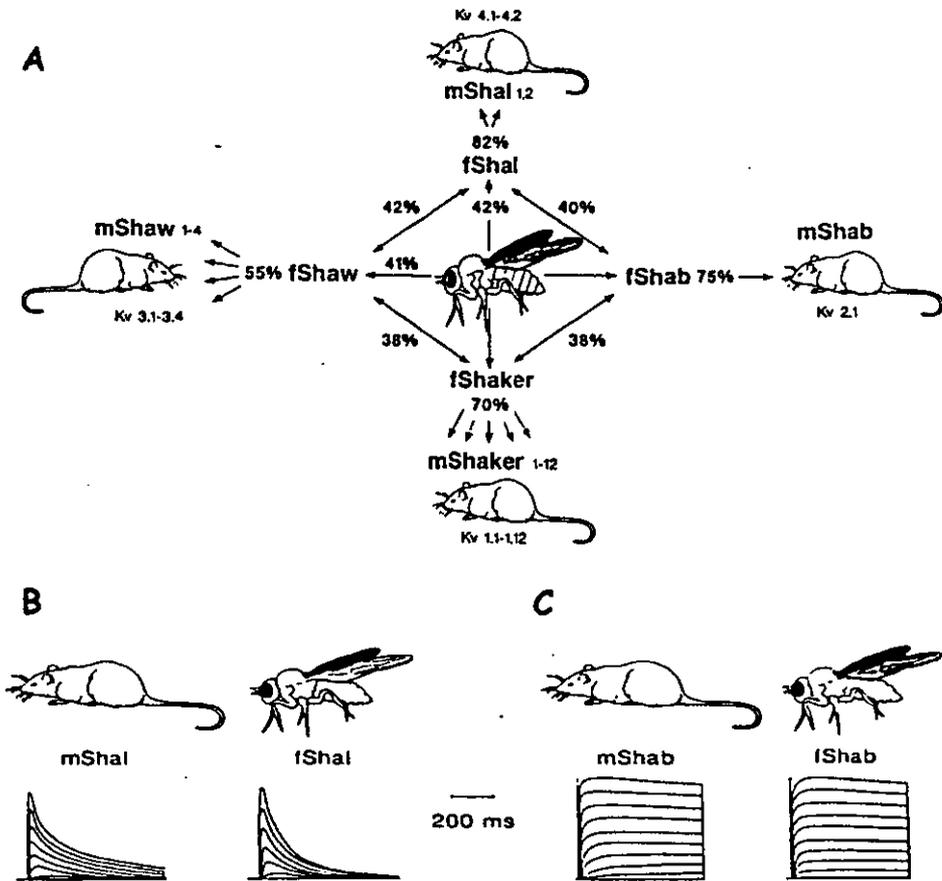
**Tabla 2.**

**SUPERFAMILIA DE CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE E INDEPENDIENTES DE CALCIO (FAMILIA Kv) IDENTIFICADOS EN MAMIFEROS.**

<b>SUBFAMILIA</b>	<b>MIEMBROS CONOCIDOS (aquellos que expresan corrientes en sistemas de expresión heterólogos).</b>
Shaker	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv1.7, Kv1.8
Shab	Kv2.1, Kv2.2
Shaw	Kv3.1, Kv3.2, Kv3.3, Kv3.4
Shal	Kv4.1, Kv4.2, Kv4.3
Eag	Eag1 y 2 HERG
KQT	KvLQT1

Evolutivamente, lo anterior sugiere que cada una de estas subfamilias se deriva de precursores que existían previamente a la divergencia entre mamíferos e insectos y plantea la posibilidad de que al menos en la línea de los Deuterostomados o Cordados, los precursores génicos se hayan diversificado enormemente después de haber sufrido una extensiva duplicación, dando origen a un gran número de genes (Ranganathan, 1994; figura 6).

Entre 1991 y 1994 ante la cantidad de genes homólogos a *Shaker* descritos, se propuso un sistema de nomenclatura que al considerar las relaciones evolutivas existentes entre las diferentes familias, evitaría las clasificaciones y los nombres redundantes. Se planteó así un sistema estándar de nomenclatura con letras y números en el cual la primera letra denota la clase de canal particular, en este caso, un canal de potasio (K). La dependencia del voltaje se indica a continuación mediante una "v" minúscula y finalmente, mediante números, el grupo de genes al cual pertenece. Así, el primer canal de potasio dependiente de voltaje representante del tercer grupo de genes homólogos a *Shaker* en mamíferos (*Shaw*), recibiría el nombre de Kv3.1 (Chandy et al, 1991; Chandy y Gutman, 1993; tabla 3).



**Figura 6.** Conservación de las familias de canales de potasio *Shaker*, *Shal*, *Shaw* y *Shab*. **A:** Cada miembro representa a una subfamilia de genes si bien conservados, independientes entre sí. Los números en cada flecha representan el porcentaje de identidad en las regiones S1-S6 entre los diferentes miembros y entre sí. La comparación entre las proteínas codificadas por el gene *Shaker* con sus homólogos *Shal*, *Shab* y *Shaw* en *Drosophila* (denotadas por una "f"), muestra un porcentaje de identidad aproximado del 40%. Sin embargo, la comparación de cada una de las proteínas de la mosca con sus homologas en mamíferos (denotadas con una "m") indica un mayor índice de identidad entre cada subfamilia (cerca del 70%). Al igual que en la mosca, la comparación entre las cuatro diferentes subfamilias del mamífero muestra un porcentaje de identidad cercano al 40%. En el lado derecho de cada uno de los nombres de los homólogos en mamíferos se indica el número de miembros identificados. **B y C.** Se ejemplifica el grado de conservación de las propiedades cinéticas de las proteínas codificadas por las subfamilias *Shal* y *Shab* entre mamíferos e insectos. Ambos tipos de corrientes fueron expresadas en ovocitos de *Xenopus*. Tomado de Covarrubias et al, 1991.

Recientemente cinco familias adicionales han sido aisladas en mamíferos para los que no han sido descritos homólogos en *Drosophila*: Kv5.1, Kv6.1, Kv7, Kv8 y Kv9 (Drewe et al, 1992). Sin embargo ninguna de ellas es capaz, por sí misma, de producir algún canal funcional cuando son expresadas en sistemas heterólogos (Salinas, 1997<sup>a,b,c</sup>).

Tabla 3.

**NOMENCLATURA UTILIZADA EN LOS GENES DE LOS CANALES DE POTASIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN MAMÍFEROS.**

Nombre Estándar	Nombres Publicados			Cromosoma
	Ratón	Rata	Humano	
<b>Subfamilia 1 relacionada a <i>Shaker</i></b>				
Kv1.1 (KCNA1)	MBK1 MK1	RCK1 RBK1 RK1	HuK(I)	12P
Kv1.2 (KCNA2)	MK2 MK5	BK2 RCK5 NGK1 RK2 RAK	HuK(IV)	12
Kv1.3 (KCNA3)	MK3	RCK3 RGK5 KV3	HuK(III) hPCN3 HLK3 HGK5	1p13.3 1p21
Kv1.4 (KCNA4)	MK4	RCK4 RHK1 RK4 RK8	HuK(II) hPCN2 HK1	11q13.14 11p14.1
Kv1.5 (KCNA5)		KV1 RK3 RMK2	HuK(VI) hPCN1 HK2 HCK1	12p
Kv1.6 (KCNA6)	MK2 MK6	RCK2 KV2 RK6	HBK2 HuK(V)	
Kv1.7 (KCNA7)	MK6 MK4	RK6		19q13.3

**Subfamilia 2 relacionada a *Shab***

Kv2.1 (KCNCB1)	mShab	DRK1 CDRK		
Kv2.2 (KCNCB2)		CDRK		

**Subfamilia 3 relacionada a *Shaw***

Kv3.1 (KCNC1)	NGK2 mShaw22	Kv4 Raw2	HKv3.1 NGK2-KV4	11p15
Kv3.2 (KCNC2)	mShaw12	Rshaw12 RKShIIIA Raw1 RKShIIID	HKShIIIA	12
Kv3.3 (KCNC3)	mKv3.3 mShaw19	RKShIIID	HKShIIID hKv3.3	19q13.3-4
Kv3.4 (KCNC4)	mKv3.4	Raw	HKShIIIC	1p21

**Subfamilia 4 relacionada a *Shal***

Kv4.1 (KCND1)	mShal			
Kv4.2 (KCND2)		RK5 Shal1		
Kv4.3 (KCND3)		RKShIVB		

Tomada de Gutman y Chandy, 1993

### Subfamilia Kv3 (*ShIII*).

Hasta el momento, han sido aislados once diferentes cDNA's de la subfamilia Kv3 a partir de librerías génicas derivadas del mRNA de ratón y de humano (Yokoyama et al, 1989; McCormack et al, 1990; McCormack et al, 1991; Rudy et al, 1991<sup>a</sup>; Luneau et al, 1991<sup>a</sup>; Schroter et al, 1991; Ghanshani et al, 1992; Rudy et al, 1992; Vega-Saenz de Miera, 1992<sup>b</sup>; Vega-Saenz de Miera, 1992<sup>c</sup>; Ried et al, 1993). La comparación de sus secuencias y el análisis de su estructura génica, a permitido obtener suficiente evidencia en favor de la hipótesis que propone que estos cDNA's más que representar productos obtenidos de diversos genes altamente homólogos, representan transcritos generados mediante procesamiento alternativo de exones de cuatro diferentes genes representados una sola vez en el genoma del mamífero (figura 7).

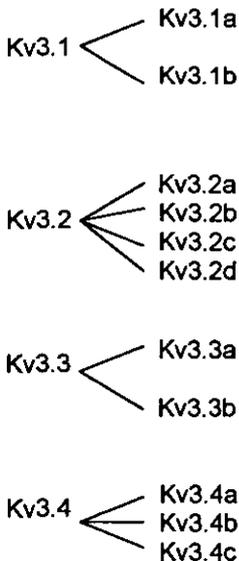


Figura 7. Subunidades Kv3 identificadas hasta el momento en los mamíferos. Los cuatro genes relacionados a *Shaker* en mamíferos (Kv3.1, Kv3.2, Kv3.3 y Kv3.4), codifican para 11 diferentes isoformas mediante procesamiento alternativo de exones. Tomado de Vega-Sáenz de Miera et al, 1994.

De esta manera, constituyen así la única clase de genes *Sh* para la cual existen evidencias de la participación del procesamiento alternativo de exones en la generación de transcritos múltiples (Luneau et al, 1991; Ghanshani et al, 1992; McKeown et al, 1992; Vega-Saenz de Miera, 1992<sup>b</sup> 1994 Weiser et al, 1994; Jan y Jan, 1998). Dicho mecanismo tiene una enorme importancia ya que pequeños cambios en el patrón de lectura o la inclusión de secuencias que no son traducidas, conllevan grandes variaciones en el comportamiento fisiológico del canal iónico *in vivo* (figura 8).

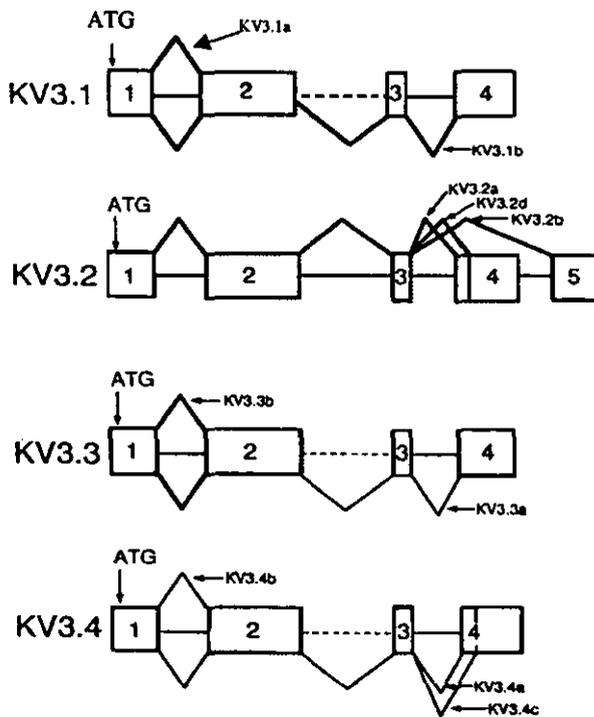


Figura 8. Estructura genómica y patrones de procesamiento alternativo de exones en cada uno de los cuatro genes *Kv3*. En esta descripción esquemática, los exones están indicados por las cajas numeradas y los intrones por líneas. Las líneas punteadas en *Kv3.1*, *Kv3.3* y *Kv3.4* indican secuencias que son leídas o cortadas y substituidas para generar diferentes transcritos maduros. En *Kv3.4* y *Kv3.2*, el exón 4 contiene un aceptor interno, la región precedente a este aceptor está marcada con líneas transversales. La figura no está a escala. Tomada de Vega-Sáenz de Miera et al, 1994.

Cada uno de los transcritos de esta familia produce corrientes de potasio dependientes del voltaje (algunas con propiedades aparentemente redundantes) cuando son expresados en sistemas heterólogos de expresión como ovocitos de *Xenopus* y células de mamífero en cultivo (Jan y Jan, 1989; Perney et al, 1991; Rudy et al, 1991<sup>a</sup> y <sup>b</sup>; Jan y Jan, 1992; Pongs, 1992; Salkoff et al, 1992; Jan y Jan, 1997<sup>a, b</sup>). Sin embargo, el significado funcional de tal variedad no está claro. Al respecto se han propuesto al menos tres posibles explicaciones: 1) Probablemente cada uno de los diferentes productos posean distintas localizaciones subcelulares. Se ha demostrado en diversas proteínas, que su localización subcelular final depende de una región no traducida del RNA en el extremo 3' (Steward y Banker, 1992; Weiser et al, 1994), 2) En algunos sistemas celulares, las regiones 5' no traducidas le confieren a la proteína un mecanismo de regulación durante la traducción, importante en el caso de algunos productos génicos redundantes, esto puede estar reflejando, por ejemplo, en el caso de algunas proteínas reguladas por sobreexpresión (Melefors y Hentze, 1993). La cola de poliA y otras secuencias que tampoco son traducidas, ofrecen la posibilidad de la regulación proteica mediante la modificación de la estabilidad del mRNA (Saini et al, 1990) y, 3) Es probable que cada uno de los diferentes transcritos posea diferencias funcionales sutiles y/o de regulación, lo que proporcionaría un control fino de la forma y duración de los distintos patrones de disparo observados en las diferentes células.

Cualquiera que sea la función de los numerosos transcritos de la familia Kv3, surgen algunas preguntas interesantes en cuanto al control de su regulación post-traducciona l y a su impacto fisiológico.

Los múltiples nombres dados tanto para los cuatro genes Kv3 o *Shlll* descritos, como para sus diversos subproductos generados por procesamiento alternativo de exones, se muestran en la tabla 4. Se incluyen además, los nombres de cada uno de los productos de acuerdo a la nomenclatura estándar

propuesta por Chandy y colaboradores en 1991, así como el asignado a cada gene de acuerdo al Comité de Nomenclatura del Genoma Humano.

**Tabla 4.**

**NOMENCLATURA USADA PARA DENOMINAR A LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES KV3 EN MAMÍFEROS.**

Nombre usado <sup>a</sup> .	Otros nombres.	Símbolo génico <sup>b</sup> .
Kv3.1a	NGK2, RKShIII <sup>B</sup> , KShIII <sup>B</sup> , Kv3.1 $\beta$	KCNC1
Kv3.1b	Kv4, Kv3.1 $\alpha$ , Raw3	
Kv3.2a	RKShIII <sup>A</sup> , (R)KShIII <sup>A</sup> .1, KShIII <sup>A</sup> .3	KCNC2
Kv3.2b	KShIII <sup>A</sup> .3	
Kv3.2c		
Kv3.2d	KShIII <sup>A</sup> .2, Raw1	
Kv3.3a	KShIII <sup>D</sup> .1	KCNC3
Kv3.3b	KShIII <sup>D</sup> .2	
Kv3.4a	Raw3	KCNC4
Kv3.4b	(H)(R)KShIII <sup>C</sup>	
Kv3.4c		

<sup>a</sup> Nomenclatura basada en Chandy et al, 1991

<sup>b</sup> Símbolo asignado al gene por el Comité de Nomenclatura del Genoma Humano.

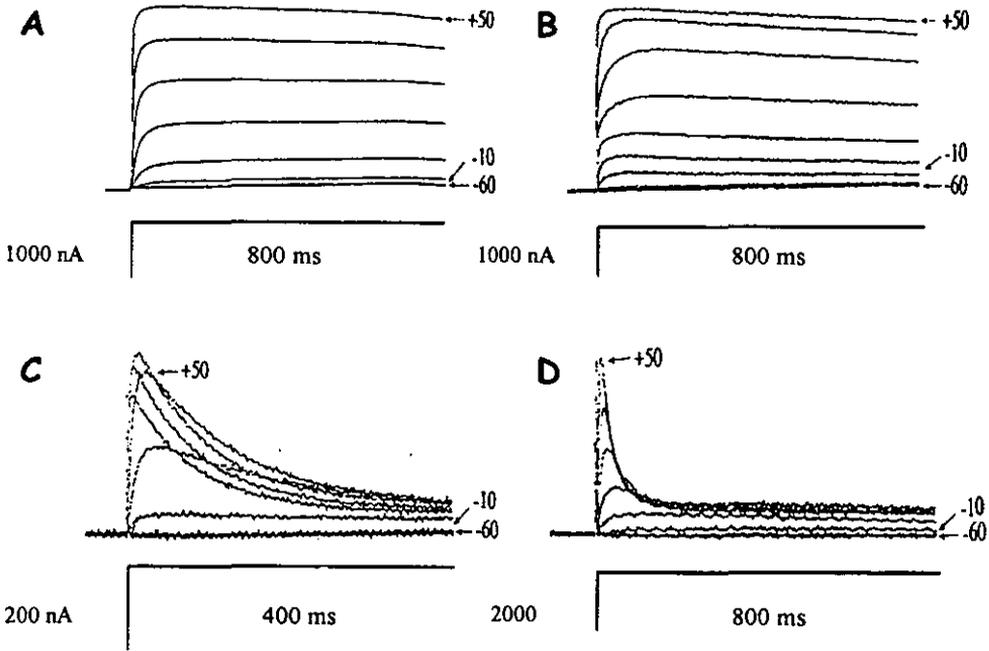
### Características Electrofisiológicas y Farmacológicas.

Como ya se mencionó previamente, los ovocitos de *Xenopus* inyectados con los transcritos de la subfamilia Kv3 expresan corrientes de potasio dependientes de voltaje ausentes en los ovocitos no inyectados (Yokoyama et al, 1989; McCormack et al, 1990; Luneau et al, 1991<sup>a,b</sup>; Rudy et al, 1991<sup>a y c</sup>; Schroter et al, 1991; Vega-Saenz de Miera, 1992<sup>b</sup>).

Una característica notable de los canales expresados por los transcritos Kv3 es su dependencia del voltaje, la cual es prácticamente idéntica para todos los miembros de esta subfamilia. En general, para activar estas corrientes se requieren potenciales de membrana más positivos que  $-10$  mV. Este nivel de despolarización es más positivo que el requerido por cualquier otra familia de canales de potasio dependientes del voltaje (Rudy et al, 1988<sup>a, b y c</sup>; Hille, 1992; Grissmer et al, 1994; Vega-Saenz de Miera et al, 1994). Como se puede observar en la figura 9, donde se muestran las corrientes expresadas de cada uno de los cuatro genes Kv3 en ovocitos de *Xenopus*, si bien los transcritos Kv3.1 y Kv3.2 expresan corrientes de tipo rectificador retardado con una velocidad de activación similar y una inactivación extremadamente lenta (en el orden de decenas de minutos), los transcritos Kv3.3 y Kv3.4 por su lado, expresan corrientes de potasio de tipo inactivante con claras diferencias entre ellos en cuanto a la velocidad de inactivación. Las corrientes Kv3.4 son las que se activan y se inactivan más rápidamente de toda la subfamilia Kv3. Adicionalmente, estas corrientes también difieren en cuanto a la dependencia del voltaje y a su inactivación en el estado estacionario. Como resultado de estas diferencias, las corrientes Kv3.3 conducen a través de una ventana más amplia de potenciales que las corrientes Kv3.4 (Rudy et al, 1991<sup>a, b, c</sup>). Vega-Saenz de Miera y colaboradores (1992<sup>b</sup>) propusieron que estas diferencias podrían ser explicadas a partir de las variaciones en el acoplamiento entre la inactivación y la apertura del canal, con los canales Kv3.4 inactivándose a partir de estados cerrados mucho más rápidamente que los canales Kv3.3.

Farmacológicamente, los canales Kv3 son altamente sensibles a concentraciones submilimolares de 4-Aminopiridina (4-AP) y Tetraetilamonio

(TEA) y son prácticamente insensibles a la mayoría de las toxinas peptídicas que bloquean a otros canales *Sh* (sin embargo, durante la escritura de esta tesis, fueron reportadas dos nuevas toxinas como específicas para los canales Kv3.4: BDS-I y BDS-II (a dosis de entre 100 nM a 5µM), Diocot y colaboradores, 1998. J. Biol. Chem. 273, 6744).



**Figura 9.** Corrientes expresadas por una de las variantes generadas por procesamiento alternativo de exones de cada uno de los cuatro genes Kv3 en ovocitos de *Xenopus*. **A:** Kv3.1a; **B:** Kv3.2a; **C:** Kv3.3b y **D:** Kv3.4a. Las corrientes fueron registradas mediante la técnica de fijación de voltaje durante pulsos despolarizantes desde -60 hasta +50 mV en incrementos de 10 mV a partir un potencial de mantenimiento de -100 mV. Nótese las características cinéticas de cada transcrito. Kv3.2 y Kv3.1 expresan una corriente de tipo rectificador sostenido similar entre sí, en tanto que Kv3.3 y Kv3.4 muestran una corriente inactivante con diferente velocidad de inactivación. Tomada de Vega-Sáenz de Miera et al, 1994.

Las principales características electrofisiológicas y farmacológicas se resumen en la tabla 5.

**TABLA 5**  
**PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS CANALES KV3 EXPRESADOS EN**  
**OVOCITOS DE XENOPUS<sup>a,b</sup>.**

GENE	Activación			Inactivación				Farmacología IC <sub>50</sub> (mM)			
	V ½ mV	k mV	Δt (mseg)	V ½ mV	k mV	τ (mseg)	g (pS)	TEA	4AP	Quinina	DTX
Kv3.1	+10	8	24	---	---	---	16	0.150	0.6	1	NB
Kv3.2	+10	7	23	---	---	---	16	0.150	0.9	ND	NB
Kv3.2	+10	6	25	+5.2	6.1	240	14	0.140	1.2	ND	ND
Kv3.4	+10	8.5	9	-20	7.2	20	12	0.200	0.6	NB	ND

<sup>a</sup> Datos tomados de Yokoyama et al, 1989; McCormack et al, 1990; Rudy et al, 1991b; Rettig et al, 1992; Vega-Saenz de Miera et al, 1992; Moreno y Rudy 1998.

<sup>b</sup> Abreviaciones: Para activación: V ½, potencial de membrana al cual la conductancia es la mitad del valor máximo; k, pendiente de la curva de G/Gmax normalizada, milivoltios necesarios para producir un incremento de e veces en la conductancia; Δt, tiempo necesario para que la corriente alcance el 90% del valor final para las corrientes no inactivantes, tiempo al pico para las inactivantes, en ambos casos medida a +40 mV. Para la inactivación: V ½ potencial de membrana capaz de producir el 50% de la inactivación después de un prepulso de 1 segundo para Kv3.4 y de 2 segundos para Kv3.3; k, pendiente de la inactivación vs la curva de voltaje en el estado estacionario; τ, constante de tiempo para la inactivación medida a +30 mV; g, conductancia unitaria. Para la farmacología: TEA, Tetraetilamonio; 4AP, 4-Aminopiridina; DTX, Dendrotoxina. NB, No bloquea; ND, No determinado. Ni la caribdotoxina ni el peptido degranulador de las células cebadas tuvo algún efecto.

Una característica común a todos los miembros de la subfamilia Kv3 es la presencia de una ligera rectificación a potenciales más positivos que +20 mV (no tan evidente en los canales Kv3.1; (McCormack et al, 1990; Rudy et al, 1991<sup>a, b y c</sup>; Schroter, 1991; Vega-Saenz de Miera, 1992<sup>b</sup>). Vega-Saenz de Miera y colaboradores (1994) sugieren que la caída en la conductancia de los canales Kv3 es producto de un bloqueo de canal abierto dependiente de voltaje que involucra algún componente citoplásmico, probablemente a iones sodio o magnesio (Linsdell et al, 1990; Rudy et al, 1991<sup>a, b</sup>; Vega-Sáenz de Miera et al, 1992<sup>b</sup>). Al respecto, (Lopatin y Nichols, 1993) demostraron que estos iones producen bloqueos similares en otros canales de potasio dependientes de voltaje a potenciales más positivos que + 20 mV. Rettig y colaboradores (1994) observaron en canales Kv3.4, carentes del extremo amino-terminal, que dicho bloqueo es abolido al eliminar el magnesio de la solución extracelular.

Finalmente, cabe mencionar que: 1) Los canales Kv3.3 y Kv3.4 únicamente han podido ser expresados en ovocitos de *Xenopus* (por lo que sus características electrofisiológicas en otros sistemas heterólogos de expresión se desconocen) y, 2) Ninguno de los diferentes transcritos Kv3 originados por procesamiento alternativo de exones a partir del mismo gene, producen corrientes notablemente diferentes entre sí cuando son expresados en ovocitos de *Xenopus*, por lo que se desconoce su posible significado funcional (Kv3.1 (Yokoyama et al, 1989); Kv3.1b (Luneau et al, 1991); Kv3.2a (McCormack et al; 1990); Kv3.2b (Luneau et al, 1991); Kv3.2d Vega Saenz de Miera et al, 1994; Kv3.4a (Schroter et al, 1991); Kv3.4b (Rudy et al, 1991<sup>b, c</sup>).

#### Distribución Tisular y Celular.

Aunque se sabe poco de la expresión de los diferentes canales Kv3 durante el desarrollo, ha sido posible obtener algunos datos interesantes sobre la expresión de los canales Kv3.1 y Kv3.2 en el cerebro de la rata.

En lo que respecta a Kv3.1, bajos niveles de expresión de mRNA comenzaron a ser detectables alrededor del día gestacional 19 (E19), encontrándose una moderada expresión de este transcrito en el hipocampo y en la

corteza cerebral en el día postnatal 3 (P3) aproximadamente. Un gran incremento en la expresión se registró entre los días P7 y P14, de hecho, aproximadamente en P14 las ratas mostraron un patrón de expresión similar a la del cerebro adulto (>P90; Perney et al, 1992). En cuanto al mRNA para el canal Kv3.2 éste fue detectable desde el día P1, incrementándose varios órdenes de magnitud entre los días P10 y P15 (Vega Saenz de Miera et al, 1994).

La abundancia relativa de cada uno de los mRNA's de la subfamilia Kv3 fué estudiada en el cerebro de la rata adulta mediante Northern Blots (Drewe et al, 1992; Perney et al, 1992; Rudy et al, 1992; Weiser et al, 1994). Cuantitativamente, los productos Kv3.1 y Kv3.3 son los mas abundantes, mostrando niveles de expresión comparables a los transcritos del gen Kv2.1 (altamente representado en el SNC del mamífero, Stuhmer et al, 1988) y con los de la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio (Noda et al, 1986; Auld et al, 1988). Son 3 véces más abundantes que los Kv3.2 y 6 veces más que los Kv3.4 (que es el menos representado; Vega-Saenz de Miera et al, 1994; Weiser et al, 1994). Interesantemente, a pesar de que se emplearon sondas capaces de reconocer diferencialmente a cada uno de los transcritos de los cuatro genes Kv3 (pero no a los productos del procesamiento alternativo de exones), se encontró que la sonda Kv3.1 fue capaz de hibridizar contra dos bandas: de 8 y 4.5 Kb. Previamente Luneau y colaboradores (1991<sup>a</sup>) habían demostrado que los canales Kv3.1a y Kv3.1b hibidizaban con los mismos pesos respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos en los transcritos Kv3.2 (Rudy et al, 1992) y Kv3.3 (Vega-Saenz de Miera et al, 1992<sup>b</sup>). Confirmando así la presencia de distintos transcritos para cada uno de los genes Kv3 en células nativas (figura 10).

La histoquímica por hibridación *in situ* de los canales Kv3.1, Kv3.2, Kv3.3 y Kv3.4, así como la inmunohistoquímica contra las proteínas Kv3.1 y Kv3.2 (poco despues de terminado este trabajo aparecieron en el mercado nuevos anticuerpos contra las proteínas Kv3.4 y Kv4.3) llevada a cabo principalmente por el grupo del Dr. Bernardo Rudy (Drewe et al, 1992; Perney et al, 1992; Retting et al, 1992; Rudy et al, 1992; Weiser et al, 1994) combinada con la autoradiografía por rayos X

de baja resolución, revelaron algunos detalles sobre la distribución de los transcritos de la subfamilia Kv3 en el SNC de la rata:

1) Tanto el mRNA como las proteínas de la subfamilia Kv3 se encuentran principalmente en las neuronas y no en la glía.

Los estudios microscópicos mostraron que las señales específicas se encontraban en neuronas morfológicamente indistinguibles de otras carentes de alguna señal. Es posible, por lo tanto, distinguir algunas subpoblaciones de neuronas en ciertas estructuras con base en la expresión diferencial de los genes Kv3.

Se identificaron algunos RNA's mensajeros de la familia génica Kv3 en otros tejidos, por ejemplo: Kv3.1a en el riñón, en el músculo esquelético y en los linfocitos T. El transcrito Kv3.3 fue localizado en el tejido pulmonar, hígado, timo y en el músculo cardiaco. Cabe mencionar que el transcrito Kv3.4 es prácticamente exclusivo del músculo esquelético, (Ghanshani, 1992; Weiser et al, 1994).

2) Como en el caso de los neurotransmisores, receptores y otros marcadores moleculares, cada uno de los transcritos de Kv3 muestra un patrón de expresión único, no homogéneo, en todo el SNC.

En algunos casos esta distribución está relacionada con el origen embrionario y/o la fisiología particular del grupo celular específico (Jones 1985; Steriade et al, 1990; Perney et al, 1992; Weiser et al, 1994, 1995). Los patrones de expresión de los cuatro genes Kv3 se ilustran en la figura 11 y se resumen en la tabla 6.

3) En algunas poblaciones celulares se observó un nivel significativo de solapamiento en la distribución de algunos miembros de la subfamilia Kv3.

4) Aparentemente, los transcritos Kv3.2 no se traslapan con los productos de otros genes: muchas de las neuronas que expresan Kv3.2 lo hacen de forma predominante si no exclusiva. Llama particularmente la atención las marcadas diferencias en la expresión de los mRNA de Kv3 entre el tálamo ventral y el dorsal: los mRNA's de Kv3.2 se expresan más abundantemente en las neuronas de relevo talámicas del tálamo dorsal, pero se expresan débilmente en el núcleo reticular talámico, una estructura del tálamo ventral.

Los resultados en detalle de la distribución de las proteínas Kv3.1 y Kv3.2 se encuentran en la tabla 7.

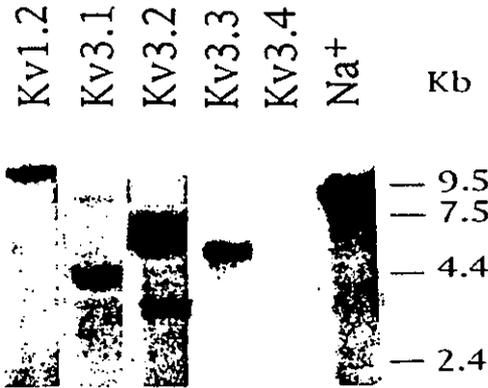


Figura 10. Análisis por Northern Blots del mRNA poli-A del cerebro de la rata. Cada línea se hibridizó contra sondas específicas para Kv1.2, Kv3.1, Kv3.2, Kv3.3 y Kv3.4 respectivamente. Los resultados se compararon contra la sexta línea que representa las subunidades  $\alpha$  de los canales de sodio dependientes de voltaje. Kb = kilobases. Tomado de Vega-Saenz de Miera et al, 1994.

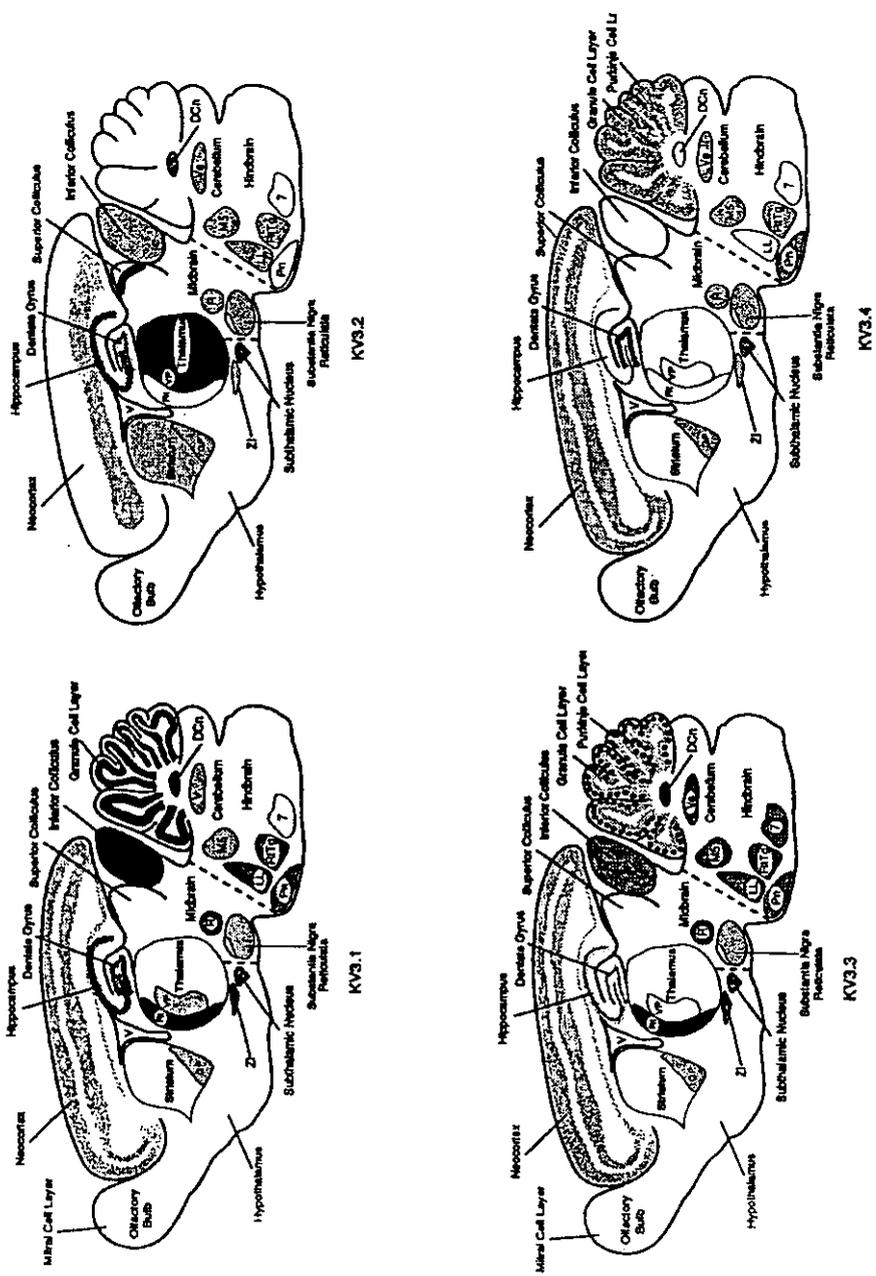


Figura 11. Se muestran diagramas que esquematizan la distribución de los RNA mensajeros para la subfamilia de canales Kv3 mediante hibridación *in situ* en cortes parasagitales en el cerebro de la rata. En la parte inferior de cada dibujo se indica el producto particular. El nivel relativo de expresión está mostrado en diferentes grados decrecientes de tonos grises con relación a la expresión de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio (nivel máximo) en el sistema nervioso del roedor. Tomado de Vega Saénz de Miéra et al, 1996.

**TABLA 6.**  
**DISTRIBUCIÓN DE LOS CUATRO TRANSCRITOS DE LOS GENES**  
**KV3 EN EL SNC DE LA RATA.**

	Kv3.2	Kv3.1	Kv3.3	Kv3.4
<b>Buibo Olfatorio.</b>				
Células periglomerulares	---	+	---	+
Células mitrales.	---	++	---	++
<b>Neocorteza.</b>				
Interneuronas.	V- VI	II-IV>V-VI	II-IV>V-VI	II-IV>V-VI
Células piramidales.	---	---	---	---
Corteza piriforme.	+	+	+	+
<b>Hipocampo.</b>				
Células piramidales CA1	+	+	---	+
Srt. Oriens.	+++	++	---	+
Srt. Radiatum.	---	++	---	+
Células piramidales CA3	++	+++	---	+
Giro dentado.	---	+++	++	++
<b>Núcleo basal.</b>				
Caudado-Putámen.	Escaso	---	---	---
Globo Pálido.	++	+	+	+
Núcleo subtálmico.	++	+++	+	++
<b>Septum.</b>				
Banda diagonal de				
<b>Broca.</b>	++	+		+
Septum medial.	++	+	+	+
Septum lateral.	---	---	---	+
<b>Epitálamo.</b>				
Habénula media.	---	---	---	---
Habénula lateral.	---	+	+	+
Núcleo paraventricular.	---	---	---	---
Pretectum.	---	++	+	+

Tálamo dorsal.	++++	+	---	±
Tálamo ventral.		++++		++
Núcleo reticular.	+	++++	+	++
Núcleo lateral ventral geniculado.	---	+	---	+
Tallo cerebral.	++	++	+	++
Substancia negra reticulata	+	++	+	+
Substancia negra compacta.	---	---	---	---
Cerebelo.	+	+++	+	+++
Medula espinal.	---	+++	+	+++

Para las interneuronas de la corteza cerebral y el hipocampo, los símbolos indican el número de células marcadas; de otra manera, los símbolos indican la intensidad de la señal de la manera como sigue: --- la señal es indistinguible del fondo; ±, indica que la señal es débil, pero claramente por arriba del fondo; +, débil; ++, moderada; +++, alta; ++++ muy abundante.

**TABLA 7.**  
**NEURONAS QUE EXPRESAN LAS PROTEINAS KV3.1 Y KV3.2 A**  
**NIVEL SOMATICO EN EL CEREBRO DE LA RATA.**

	RNA Somático	Proteína somática.
Bulbo Olfatorio.		
Celulas periglomerulares	+	+
Celulas mitrales.	+	---
Neocorteza.	En algunas células	+
Hipocampo.		
Celulas piramidales CA1		?
Celulas piramidales CA3	+	?
Giro dentado.	+	+++
Nucleo basal.	++	+++
Caudado-Putamen.	---	+
Globo Pálido.	+	++
Núcleo subtálamico.	+	++
Septum.	++	
Banda diagonal de Broca.		
Septum medial.		?
Septum lateral.	+	?
Epitálamo.	+	+
Tálamo dorsal.	++	+
Tálamo ventral.	+	+
Núcleo reticular.	+	++
Núcleo lateral ventral geniculado.	+++	+
Tallo cerebral.	+++	+
Substancia negra reticulata	+	++++
Substancia negra compacta.	+	
Cerebelo.		+
Medula espinal.	---	+++

## Un papel funcional para los canales Kv3.

Las propiedades particulares que poseen estos canales de potasio dependientes del voltaje, i.e. la localización celular y tisular altamente restringida, así como sus características electrofisiológicas, la hacen muy interesante para tratar de comprender su papel en la fisiología de las células que expresan sus distintos transcritos, ya que permiten suponer que posee un papel específico en los procesos de señalización y excitabilidad neuronal.

Una estrategia que ha demostrado ser útil para la identificación de las corrientes nativas producto de canales iónicos que han sido clonados, consiste en la búsqueda e identificación de conductancias similares en las células de interés, a las descritas en sistemas de expresión heteróloga. De esta forma, ha sido posible en algunos casos proponer candidatos y posibles funciones para las corrientes nativas identificadas previamente mediante técnicas electrofisiológicas y bioquímicas. Por ejemplo: 1) Pardo y colaboradores (1992) encontraron una corriente de tipo A en las células hipocampales en cultivo primario similar en su dependencia del voltaje, farmacología y cinética, incluyendo el restablecimiento lento de la inactivación y la sensibilidad a concentraciones bajas de potasio a la corriente Kv1.4 registrada en sistemas heterólogos, 2) El canal de potasio tipo N que se encuentra en los linfocitos T recuerda en sus propiedades macro y microscópicas, a las corrientes obtenidas por la expresión de los transcritos Kv1.3 en ovocitos de *Xenopus* (Chandy et al, 1990<sup>a</sup>; Grissmer et al, 1990<sup>a, b</sup>). Interesantemente, en este caso, los canales Kv1.3 expresados en sistemas heterólogos son los únicos canales de potasio clonados que pueden ser bloqueados por la margatoxina, un péptido derivado del veneno del escorpión *Centruroides margaritus*, que también bloquea la corriente tipo N de los linfocitos (Leonard et al, 1992), 3) Grissmer y colaboradores (1992), propusieron que la corriente de potasio tipo L identificada en linfocitos, es un homomultímero de la proteína Kv3.1. Grissmer encontró que las corrientes macroscópicas de los canales Kv3.1 expresados en ovocitos son indistinguibles de las corrientes macroscópicas Kv3.1 expresadas en linfocitos.

La aplicación de técnicas de biología molecular ha permitido realizar experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* donde ha sido posible poner a prueba las hipótesis sobre la participación de las numerosas isoformas de los canales iónicos en distintos procesos fisiológicos. i.e. Diversos grupos habían propuesto, basados en sus propiedades biofísicas, que el canal de potasio sensible a oxígeno nativo en la células tipo I del cuerpo carotídeo, probablemente estuviera constituido por subunidades codificadas en la subfamilia génica Kv3 (Vega-Saenz de Miera y Rudy, 1992; Lopez-Barneo et al, 1988; Lopez-Lopez et al, 1989; Urena et al, 1989). Mediante PCR se demostró que los RNA's mensajeros de Kv3.3 están presentes en los cuerpos carotídeos del conejo (Vega-Saenz de Miera et al, 1994). En otro ejemplo, los experimentos en los que se emplearon secuencias antisentido demostraron que las subunidades Kv4.2 constituyen un componente importante de la corriente de bajo umbral tipo A expresada en ovocitos de *Xenopus* inyectados con el mRNA total del cerebro de la rata, sugiriendo además la existencia de proteínas adicionales que pueden ser responsables de las diferencias encontradas entre los canales Kv4.2 nativos y aquellos expresados en ovocitos de *Xenopus* (Serodio et al, 1994).

Sin embargo, el aislamiento de los componentes individuales en las corrientes macroscópicas *in vivo* sigue siendo necesario ya que, 1) Es probable que las corrientes nativas de interés no constituyan el principal componente en una célula particular, 2) Las corrientes de interés podrían estar enmascaradas por otras corrientes que se sobrelapan en sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas. Por ejemplo, ninguna de las corrientes descritas en las células de Purkinje en cultivo es similar a las corrientes expresadas por los transcritos Kv3.3 (abundantes en estas células), expresados en ovocitos de *Xenopus* aunque pueden estar aportando algún componente a las corrientes inactivantes observadas en los cultivos organotípicos (Gahwiler y Llano, 1989).

Existen al menos tres explicaciones para la aparente carencia de corrientes similares a las corrientes Kv3 descritas en ovocitos, en neuronas nativas (Vega-Sáenz de Miera et al, 1994): 1) Los estudios de fijación de voltaje en neuronas

emplean tejido disociado embrionario o neonatal el cual es posible que aún no exprese subunidades Kv3, 2) Los canales nativos que contienen proteínas Kv3 pueden poseer, al menos en algunas células, propiedades electrofisiológicas diferentes a las observadas en sistemas heterólogos debido a la presencia de diversos factores, tales como subunidades beta, modificaciones postraduccionales, diferente composición lipídica de la membrana etc. y, 3) Los canales Kv3 pueden estar localizados preferencialmente en los procesos neuronales o en las terminales siendo así inaccesibles a los métodos electrofisiológicos convencionales.

Considerando los antecedentes presentados en este trabajo es posible comenzar la caracterización de esta familia de canales iónicos en grupos celulares específicos donde la abundancia y disponibilidad de las correspondientes proteínas contribuya a dilucidar su papel funcional en el SNC del mamífero.

Para este fin, en el presente trabajo se emplearán neuronas del GP del mamífero debido a la relativa facilidad para la identificación de los canales Kv en preparaciones frescas dadas sus características electro y farmacológicas y a que en estas células se ha demostrado a nivel somático, la existencia tanto del mRNA como de las proteínas de la subfamilia Kv3.

A continuación se revisan algunos aspectos sobre la anatomía y fisiología del globo pálido que se consideran relevantes para el presente trabajo.

## **El Globo Pálido.**

De manera general, en los mamíferos los ganglios basales (GB) están constituidos por el núcleo estriado, el globo pálido, el núcleo entopeduncular, el núcleo subtalámico y la sustancia negra (Albin et al, 1989; Alheid et al, 1990; Braak y Braak, 1993; Hauber, 1998). Los GB forman parte del Complejo Estriatal y del Sistema Extrapiramidal Motor. El primero incluye además del núcleo estriado y del globo pálido, al núcleo acumbens, a la mayor parte del tubérculo olfatorio y a la parte rostral de la sustancia innominata (considerada como una extensión ventral del GP). El segundo, está formado por las regiones ventrales del núcleo estriado y del globo pálido así como por el allocortex, el núcleo acumbens, el núcleo mediodorsal talámico y las regiones prefrontal, prelímbica, cingulada y premotora 6 de la corteza cerebral. Ambos circuitos ejercen una influencia considerable sobre las áreas corticales y núcleos subcorticales involucrados en el control de la postura, en la iniciación, ejecución y secuenciación de movimientos estereotipados (Schwab et al, 1954; Denny-Brown y Yanagisawa, 1976; Flowers, 1976; Hallet y Khoshbin, 1980; Evarts y Calne, 1981), en la ejecución automática de movimientos rutinarios (Marsden y Obeso, 1994), en la inhibición de programas motores competitivos (Mink, 1996) y en el aprendizaje motor (Kimura, 1995); Nieuwenhuys et al, 1998) así como en un amplio rango de funciones y procesos cognitivos en los que la motivación o el estado emocional juega un importante papel regulador (Lidsky et al, 1985; Nieuwenhuys et al, 1998).

La patogénesis de los GB produce característicamente movimientos involuntarios (discinecias) lentos, pobres en ejecución y anormales como la Atosis (movimientos exageradamente lentos acompañados de sacudidas en los dedos de pies y manos), la Corea de Huntington, los balismos, los temores y el mal de Parkinson. También están caracterizados por estar involucrados en desórdenes del tono muscular y la postura.

Se desconoce en detalle el papel regulador de los GB sobre las conductas mencionadas debido principalmente a nuestro desconocimiento sobre como se procesa la información en ellos y a que involucran a los mayores y más complejos

sistemas neuroquímicos del Sistema Nervioso Central (McGeer y McGeer, 1993; figura 12).

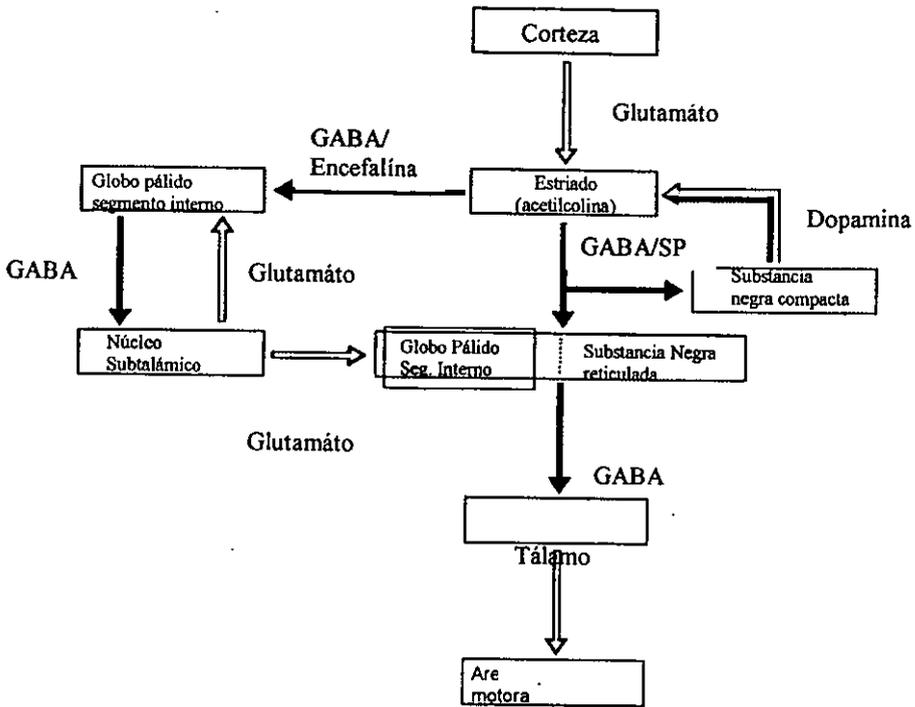


Figura 12. Se muestran las dos principales vías a través del GP de los mamíferos y las posibles interacciones entre los diferentes neurotransmisores entre los ganglios basales. En líneas negras se indican las vías inhibitorias, mientras que en líneas claras están las excitatorias. Tomado de Kandel, 1986.

Con el fin de tener una visión simplificada de su funcionamiento, los GB han sido subdivididos en cuatro subsistemas o asas de retroalimentación:

- 1) El Circuito motor: Básicamente está constituido por una vía que interconecta a las áreas corticales motoras (cortezas premotora, motora, somatosensorial, área suplementaria motora, y lóbulo parietal motor) con el

putamen, el globo pálido y la sustancia negra, formando un asa de retroalimentación con las áreas suplementarias motoras y premotoras.

2) El Circuito oculomotor: Este circuito está involucrado en el control de los movimientos sacádicos oculares. Anatómicamente, los campos visuales primarios junto con otras áreas corticales relacionadas, proyectan hacia el núcleo caudado, quien a su vez proyecta hacia el colículo superior y de regreso a los campos visuales vía el tálamo.

3) El Circuito prefrontal dorsolateral: Este circuito está involucrado en diversos aspectos de la memoria relacionados con la orientación espacial. Anatómicamente, la corteza prefrontal dorsolateral y algunas otras áreas de asociación cortical proyectan hacia la cabeza dorsolateral del caudado quien envía eferentes de regreso a la corteza prefrontal dorsolateral vía el tálamo.

4) El Circuito lateral orbitofrontal que enlaza a la corteza lateral orbitofrontal con el caudado ventromedial. Se cree que está involucrado en el control y regulación de los diferentes patrones conductuales motores.

El globo pálido puede así controlar directamente la salida de información de los ganglios basales hacia otros núcleos y áreas corticales, por lo que es posible que no solamente sea una estructura de relevo en la transmisión de información entre las estructuras de entrada y salida de los GB, sino un regulador del control motor (Kita y Kitai, 1994; Parent y Hazrati, 1995; Parent, 1995; Chesselet y Delfs, 1996; Shammah-Lagnado et al, 1996; figura 13).

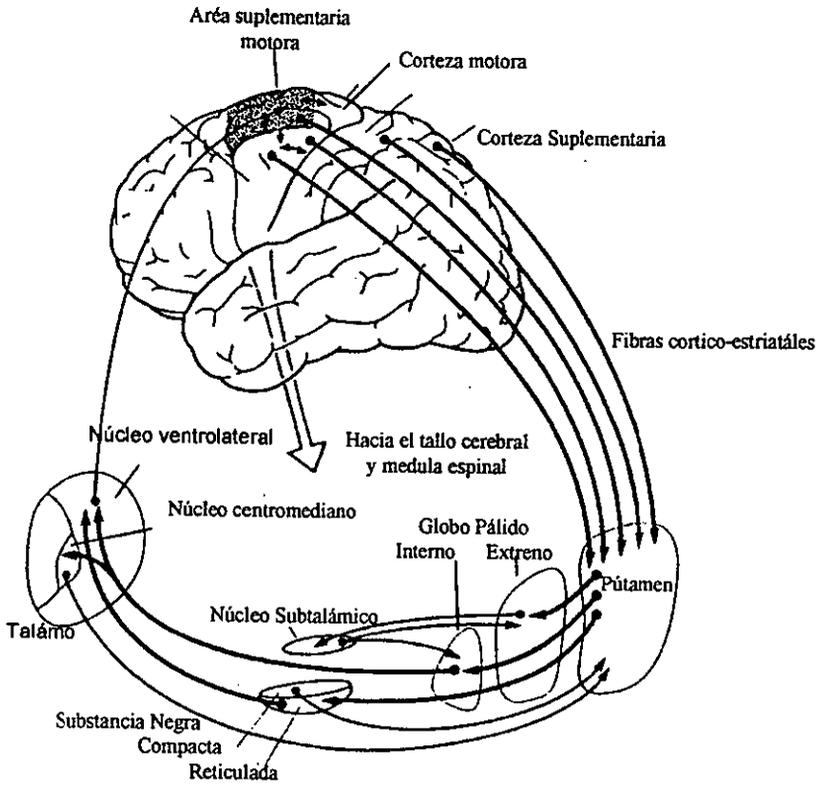


Figura 13. El circuito motor de los ganglios de la base o Ganglios Basales constituye un asa de retroalimentación desde las áreas motoras y somatosensoriales de la corteza cerebral hacia regiones muy restringidas de los mismos ganglios basales, del tálamo, de regreso a la corteza premotora, áreas suplementarias motoras y corteza motora. Aquí se esquematizan las principales vías existentes en este circuito. Tomado de Braak y Braak, 1993.

A continuación se revisarán brevemente algunos aspectos de la organización anatómica y neurofisiológica del globo pálido.

## Anatomía.

El globo pálido o pálido diencefálico (GP, (Braak y Braak, 1993) es un núcleo con abundantes fibras mielínicas (lo que le da un aspecto translúcido opalescente en las preparaciones frescas) ubicado en la región medial del estriado de quien se encuentra separado por la lámina medular externa (LME). Anteromedialmente, está en contacto con el núcleo de la cama de la estria terminal y la cápsula interna, misma que lo separa del núcleo reticular talámico. Ventralmente, descansa sobre el núcleo de la banda diagonal y sobre el núcleo tuberomamilar, mientras que en su parte ventrolateral se une al hipotálamo lateral y se estrecha cerca de la comisura anterior (Paxinos, 1982, figura 14).

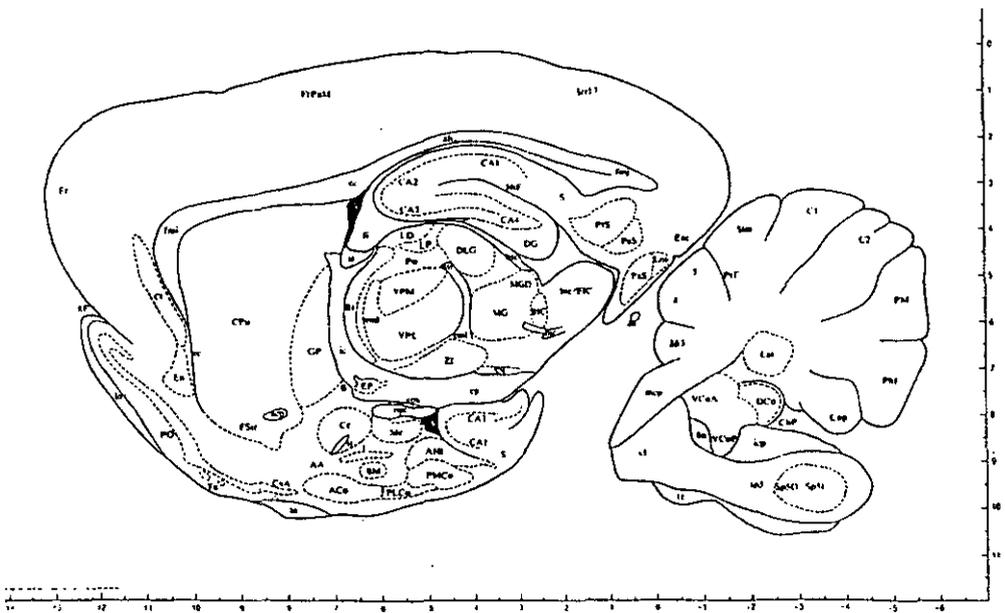


Figura 14. Corte parasagital del cerebro de la rata indicando al globo pálido. Los ejes representan la posición aproximada de cada estructura en coordenadas estereotáxicas. Referencia a 3.4 mm de Bregma. GP, globo pálido; CPU, Caudado-Putamen; ic, Capsula interna; Rt, Núcleo reticular talámico; acp, Comisura anterior región posterior; FStr, fundus striati; B, Núcleo basal de Meynert, st, stria terminalis; ce, Núcleo central amigdalioide. Tomado de Paxinos, 1982.

Filogenéticamente, el GP está organizado de diferentes formas; en primates y humanos, la lámina medular interna (LMI) divide dorsoventralmente al GP en dos regiones: lateral y medial (o segmentos externo e interno). Esta última a su vez, está subdividida por la lámina medular accesoria (LMA) en medial interno y medial externo (Paxinos y Watson, 1982) En los roedores y en otros mamíferos no primates, existen pocas evidencias sobre la presencia de la LMI, por lo que aparentemente, el GP está constituido por una sola masa compacta de células que al ser considerada homóloga al globo pálido lateral del primate es llamada simplemente globo pálido (Paxinos y Watson, 1982) El segmento medial del GP del primate, por su lado, es homólogo al núcleo entopeduncular del roedor (Iwahori y Mizuno, 1981; Heimer et al, 1982; Heimer et al, 1995).

Diversos estudios (para revisión ver Braak y Braak 1993 y Hauber, 1998) proponen que el núcleo entopeduncular es una subdivisión del globo pálido en roedores, sin embargo, en estos organismos, el primero está embebido entre las fibras corticofugales de la cápsula interna, formando así un núcleo intracapsular que a pesar de ser histológicamente idéntico al GP (Nieuwenhuys et al, 1998) puede ser considerado una estructura diferente. Aunque las aferentes son similares (y posiblemente estén duplicadas entre los dos núcleos), ambos proyectan hacia distintos sitios (Alexander y Crutcher, 1990), los patrones espontáneos de disparo y los efectos conductuales producidos por lesiones son diferentes (Marchand et al, 1986<sup>a,b</sup>; Braak y Braak, 1993) y presentan distintos orígenes embriológicos: el núcleo entopeduncular se origina a partir del diencefalo como un derivado del hipotálamo (Marchand et al, 1986<sup>a,b</sup>) en dos gradientes intranucleares: caudal y rostral entre los días embrionarios (E) 10 y 15 (E10-E14 caudal, E10-E15 rostral), mientras que el GP (de origen telencefálico) se genera entre los días E11 y E16, igualmente en dos gradientes neurogénicos: E11-E16 caudal y E12-E16 rostral (Marchand et al, 1986<sup>a,b</sup>; figura 15).

Por estas razones en el presente trabajo no se incluye al núcleo entopeduncular como parte del globo pálido.

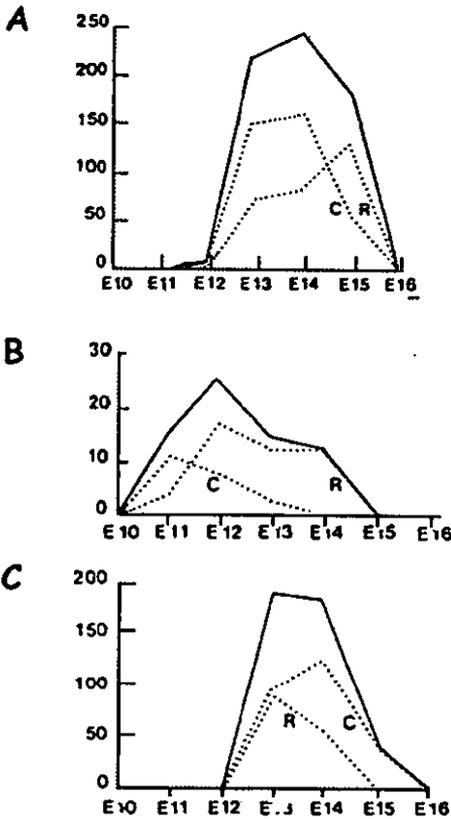


Figura 15. Períodos de neurogénesis y formación de los núcleos entopeduncular (A), subtalámico (B) y globo pálido (C) en el cerebro de la rata. Las células fueron marcadas con timidina tritiada de tal forma que la escala vertical indica el número relativo de células marcadas encontradas en las fechas indicadas en la escala horizontal.

Las líneas punteadas en cada caso indican los períodos de neurogénesis de las porciones caudal (C) y rostral (R), la línea continua indica el promedio de ambos y representa en período de formación del núcleo particular. Todas las fechas indicadas son días prenatales. Tomado de Marchand et al, 1986.

En GP de los roedores se han descrito diferentes tipos y tamaños celulares (Parent, 1979; Iwahori y Mizuno, 1981; Park et al, 1982; Difiglia et al, 1982; Jaraman, 1983; Falls, 1983; Francois et al, 1984; Millhouse, 1986). Si bien estas diferencias pueden deberse a discrepancias entre las especies (rata y ratón) o bien a la edad gestacional o las técnicas empleadas, en general se describen tres grupos celulares:

- 1) Células triangulares y bipolares de tamaño mediano a grande (de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de largo en su eje mayor) y células multipolares (20-50  $\mu\text{m}$  de diámetro) características de la región medial y lateral del GP respectivamente (Fox et al, 1966, 1974; Millhouse, 1986). En el ratón el

tipo multipolar es característico de la región medial (Iwahori y Mizuno, 1981, figura 16).

- 2) Células multipolares gigantes (35-50  $\mu\text{m}$ ). Este grupo está conformado por una escasa población de células situadas de manera preferencial en la región peripalidal. Sus axones atraviesan el borde palido-estriado penetrando profundamente en el núcleo estriado (Francois et al, 1984). Por lo que se les considera neuronas de proyección (DeVito et al, 1980, 1982; DiFiglia et al, 1982, 1994; figura 17).
- 3) Células pequeñas (12-16  $\mu\text{m}$ ). A este grupo pertenecen todas las que han sido clasificadas como interneuronas y están localizadas principalmente en la región medial del GP (DiFiglia et al, 1982; Millhouse 1986; figura 18).



Figura 16. Dibujo en cámara lúcida de una tinción metálica del GP obtenida mediante la técnica rápida de Golgi. Se pueden observar algunas células bipolares y triangulares localizadas cerca del borde con el caudado-putamen (C-P), indicado por una línea punteada. El inserto muestra la localización aproximada de las células marcadas con un punto en una rebanada del cerebro de la rata. La barra de calibración equivale a 20 micrometros. Tomado de Millhouse, 1986.

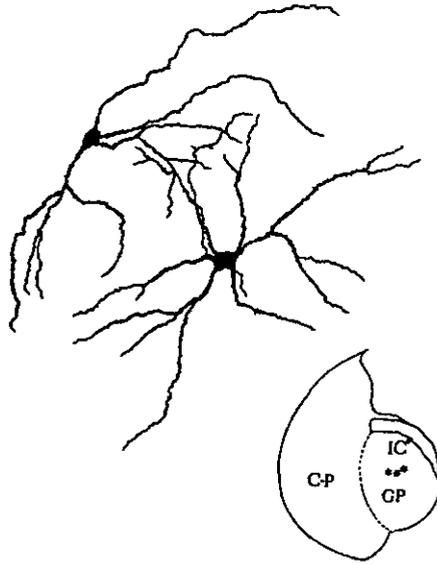


Figura 17. Dibujos en cámara lúcida del GP teñido mediante impregnación metálica de acuerdo al método rápido de Golgi. Las células que se muestran corresponden a neuronas multipolares gigantes localizadas hacia la región lateral del GP. En el inserto se muestra su localización aproximada. C-P, Caudo-Putamen; GP, Globo pálido; IC, Cápsula interna. La escala es igual a 50 micrómetros. Tomado de Millhouse, 1986.



Figura 18. Dibujos en cámara lúcida del GP teñido mediante impregnación metálica de acuerdo al método rápido de Golgi. Se observan las células pequeñas localizadas principalmente en la región medial del GP de la rata. Compárese su tamaño con las neuronas triangulares y bipolares también esquematizadas. En el inserto se muestra su localización aproximada: C-P, Caudo-Putamen; GP, Globo pálido; IC, Cápsula interna; EL, borde Caudo-Putamen. La escala es igual a 20 micrómetros. Tomado de Millhouse, 1986.

## Electrofisiología.

Historicamente, la mayoría de los estudios electrofisiológicos de los GB han sido realizados en primates. En estos han sido descritos mediante registros extracelulares dos clases de actividad en el GP externo (DeLong, 1971, 1974): El primero de ellos, que representa el 85% de los casos registrados, ha sido denominado grupo de alta frecuencia con pausas (AFP) debido a la presencia de períodos recurrentes de disparo de alta frecuencia (intervalo medio de disparo en el reposo: 10-100/sec, media grupal: 55/sec) separados por períodos de silencio de más de 500 mseg. de duración con una ocurrencia de 9.0/min en un rango de 1-40/min. El segundo grupo (15% del total) denominado células de baja frecuencia de disparo en ráfagas o BFD-R, presenta bajas frecuencias de descarga en ráfagas intermitentes de alta frecuencia (de 5 a 20 espigas por minuto), con una tasa media de disparo de 1-30/sec (media grupal de 10/sec) e intervalos interespiga de 2 a 3 sec. (figura 19).



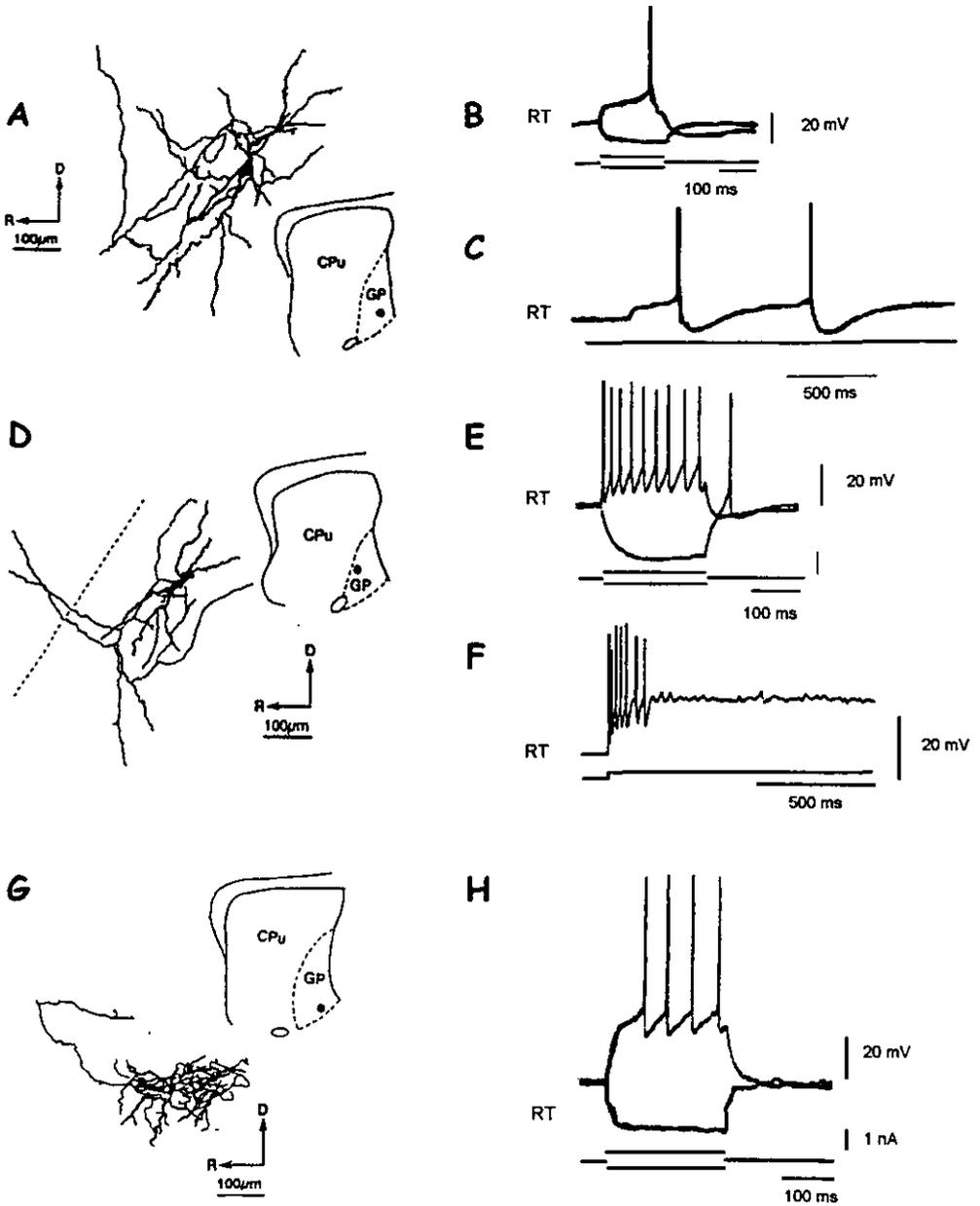
Figura 19. A. Actividad unitaria basal de una célula AFP en el GP externo del primate. B. Actividad unitaria de una célula BFD-R durante el reposo. Compárense sus características. Tomado de De Long, 1971.

En la rata, los estudios extra e intracelulares del GP, reportan la existencia de al menos tres tipos de células con base en sus patrones de disparo (Adams y Galvan, 1986; Nakanishi et al, 1990; Kita y Kitai, 1991; 1994; Lavin y Grace, 1996) mismos que son muy similares a los que Nambú y Llinás (1994; 1997) describieron en las rebanadas del GP extraídas del cerebro de cuyo:

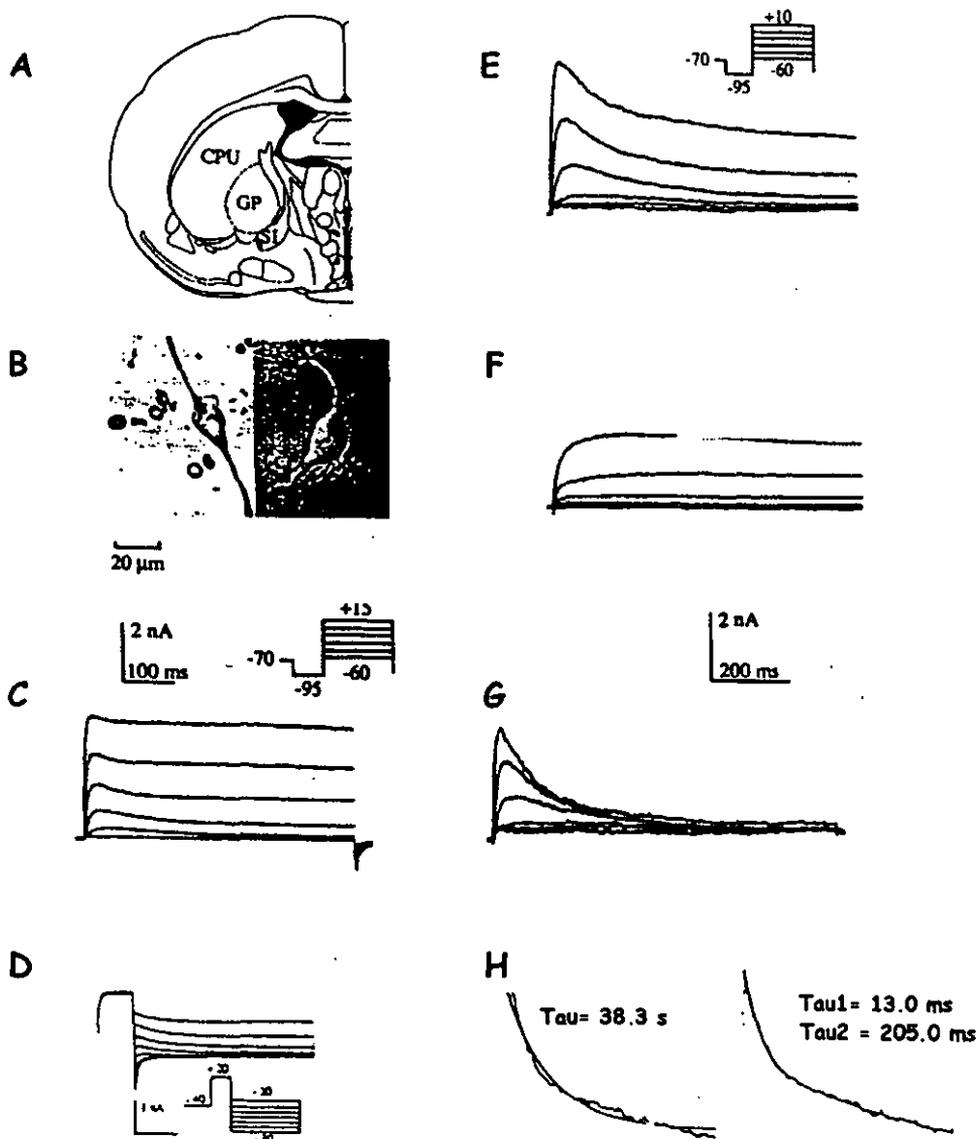
- 1) Neuronas tipo I: Poseen un soma con tamaño promedio de  $40 \times 23 \mu\text{m}$ . Son principalmente silentes, con un potencial de membrana ( $-65 \pm 10 \text{ mV}$ ) pero pueden generar ráfagas con notoria acomodación. En ellas han sido identificadas una conductancia de calcio de bajo umbral y una corriente transitoria de potasio tipo A. Presentan potenciales postsinápticos inhibitorios. Representan al 59% del total de células registradas.
  
- 2) Neuronas tipo II: Estas células son más pequeñas: poseen un soma de  $29 \times 17 \mu\text{m}$ . Disparan espontáneamente en el potencial de reposo ( $-59 \pm 9 \text{ mV}$ ) presentando también disparos repetitivos ( $<200\text{Hz}$ ) con débil acomodación. En estas células ha sido identificada una corriente de calcio de bajo umbral. Presentan potenciales postsinápticos inhibitorios. Representan al 37% del total registrado.
  
- 3) Neuronas tipo III: Este grupo no presenta disparos espontáneos en el potencial de reposo ( $-73 \pm 5 \text{ mV}$ ), sin embargo, una vez despolarizadas, presentan potenciales de acción de larga duración ( $2.3 \pm 0.6 \text{ ms}$ ) sin acomodación. El soma mide en promedio  $18 \times 12 \mu\text{m}$  lo que indica que probablemente sean interneuronas (figura 20).

Stefani y colaboradores (Stefani et al, 1992, 1995) estudiaron mediante registros de fijación de corriente en la modalidad de célula completa, a las células bipolares grandes del globo pálido de la rata obtenidas por disociación enzimática. Bajo fijación de voltaje demostraron la presencia de una familia de corrientes salientes de potasio activadas por voltaje constituidas predominantemente por al menos dos conductancias: una sostenida y otra inactivante. Ambas corrientes mostraron umbrales de activación cercanos a los  $-40 \text{ mV}$  a partir de un potencial de mantenimiento de  $-70 \text{ mV}$ . Tanto la aplicación de TEA ( $5-15 \text{ mM}$ ) como el empleo de un protocolo de pulsos despolarizantes a partir de un potencial de mantenimiento de  $-70 \text{ mV}$  seguido de un prepulso a  $-45 \text{ mV}$  redujeron

aproximadamente el 95% del componente sostenido aislando el inactivante (figura 21). Debido a las características de cada una de ellas es probable que la corriente inactivante sea del tipo Kv4 en tanto que la corriente sostenida probablemente sea una corriente de potasio dependiente de voltaje de tipo D sensible a dendrotoxina, inicialmente descrita por Storm (Storm, 1987).



**Figura 20.** *A:* Neurona del globo pálido tipo I. *D:* Neurona del globo pálido tipo II. *G:* Neurona del globo pálido tipo III. En todos los casos se trata de reconstrucciones a partir de cortes parasagítales del cerebro de la rata. Los insertos muestran con un punto negro la localización aproximada de cada tipo celular en el GP. La línea punteada representa la división entre el GP y el caudado. *B, E y H:* muestran la respuesta de la membrana en las células tipo I, II y III respectivamente, al pulso despolarizante indicado en la parte inferior de cada trazo de corriente (RT: potencial de reposo). *C y F:* Oscilación del potencial de membrana que acompaña a las espigas mostradas en B y E respectivamente, producida por el pulso de corriente mostrado en la parte inferior de este diagrama. Tomado de Nambú y Llinás, 1996.



**Figura 21.** Activación de las corrientes salientes en células del GP de la rata. **A:** Esquema de la localización del GP. **B:** Dos ejemplos típicos de células bipolares largas recién disociadas del GP. **C:** Corrientes registradas en las células completas mostradas evocadas por pulsos despolarizantes a partir de  $-60$  mV y hasta  $+15$  en pasos de  $15$  mV desde un potencial de mantenimiento de  $-70$  mV. **E y F:** Una célula diferente en presencia de  $10$  mM de TEA, antes y después respectivamente. **G:** Corrientes sensibles al TEA obtenidas mediante sustracción digital de E menos F. En el inserto se muestra el protocolo de pulsos despolarizantes empleado. **D:** Colas de corriente de la corriente saliente de tipo rectificante resistente al TEA mostrada en los trazos anteriores. Las colas deactivan en una exponencial simple con un potencial reverso de  $-72$  mV. **H:** Se muestran las colas de corriente de los trazos sensible a  $10$  mM de TEA y control respectivamente. Puede observarse que la corriente sensible a TEA se inactiva de manera monoexponencial. Tomado de Stefani et al, 1994.

## OBJETIVOS

Mucho del trabajo de identificación molecular de los diferentes miembros de la superfamilia de canales de potasio dependientes de voltaje, se ha llevado a cabo sin el previo aislamiento de las proteínas correspondientes y su expresión y caracterización en sistemas aislados. Por esta razón, a menudo se desconoce cual es la relación entre los componentes moleculares identificados por clonación y los canales iónicos nativos.

Este proyecto tiene el propósito de estudiar electrofisiológicamente y mediante técnicas de biología molecular, el posible papel funcional de las corrientes de potasio activadas por voltaje cuyos canales estén constituidos por subunidades codificadas en genes de la subfamilia Kv3.

Gracias al conocimiento que tenemos sobre las características biofísicas y farmacológicas, así como sobre la distribución tisular y celular de los diferentes miembros de esta subfamilia, es posible comenzar su caracterización en grupos celulares específicos donde la abundancia y disponibilidad de las correspondientes proteínas contribuya a dilucidar su papel funcional en el SNC del mamífero.

Si bien el núcleo talámico expresa en grandes cantidades algunos de los transcritos Kv3, las proteínas se encuentran en la terminales corticales donde son difíciles de acceder electrofisiológicamente. Por esta razón, en el presente trabajo se decidió utilizar neuronas del GP del mamífero ya que en ellas se ha demostrado a nivel somático, la existencia de las proteínas, producto de esta familia génica Kv3. En principio los canales de potasio nativos deberían ser accesibles para su estudio mediante la técnica de fijación de voltaje en célula completa.

Los datos obtenidos en este estudio permitirán formular hipótesis sobre la participación de estos canales en la regulación de la frecuencia de disparo y en la forma del potencial de acción en aquellas células donde se compruebe la presencia de estas proteínas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener a partir del cerebro de ratas jóvenes, neuronas disociadas viables del GP (en donde se ha demostrado la abundancia de las proteínas Kv3 a nivel somático) susceptibles de ser registradas electrofisiológicamente.
2. Caracterizar e identificar en dichas células, mediante criterios electrofisiológicos y farmacológicos, aquellas corrientes nativas de potasio activadas por voltaje cuyos canales puedan contener subunidades codificadas por la subfamilia de genes Kv3.
3. Caracterizar las propiedades biofísicas y farmacológicas de las corrientes nativas identificadas como pertenecientes a la subfamilia Kv3, comparándolas con aquellas expresadas en células CHO transfectadas con transcritos de esta familia de proteínas.
4. Estudiar y en su caso, confirmar mediante técnicas de biología molecular, la existencia en las neuronas estudiadas de las subunidades que conforman los canales Kv3 que fueron electrofisiológicamente demostrados en estas células.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo y Mantenimiento de las Células de Ovario de Hamster Chino.

Las células CHO silvestres (CHO- K1, Chinese Hamster Ovary; American Type Culture Collection #ATCC CCL 61 de *Crisetulus griseus* donativo del Dr. Bernardo Rudy, NYUMC) constituyen uno de los sistemas celulares de mamíferos para expresión heteróloga mas frecuentemente usados. Requieren relativamente pocos cuidados y sobreviven bastante bien a los diversos métodos de transfección.

Las células CHO empleadas en este trabajo como vectores de expresión para los cDNA's de Kv3.1 y Kv3.2 fueron cultivadas y mantenidas en  $\alpha$ -MEM (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 10,000 u/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomina ( $\alpha$ -MEM Completo; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), a pH 7.3 bajo una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C en cajas de Petri plásticas de 100 mm de diámetro para cultivo de tejidos (Costar, Cambridge, MA).

Una vez en confluencia, el medio completo era removido y substituído por 1 ml de tripsina al 0.05% en PBS sin calcio (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), en donde la monocapa celular era incubada durante un 1 minuto a 37°C. Posteriormente, la solución enzimática era desechada y las células resuspendidas mediante pipeteo suave en aproximadamente 2 ml de  $\alpha$ -MEM completo. Una vez en suspensión eran diluidas 1/10 con  $\alpha$ -MEM completo. En cada ocasión, 0.5 ml de la suspensión celular se sembró en placas nuevas de 100 mm de diámetro con 10 ml de  $\alpha$ -MEM completo.

El medio era cambiado cada dos días y las células resembradas cada vez que alcanzaban confluencia.

## **Expresión Funcional de Canales Kv3.1b y Kv3.2a en las Células CHO.**

El estudio de las corrientes generadas por los transcritos Kv3.1b se realizó en células CHO silvestres (CHO-) transfectadas transitoriamente con el cDNA de dicha proteína.

Cuando las células CHO- alcanzaban confluencia eran tripsinizadas en la forma ya descrita y resuspendidas en 2 ml de  $\alpha$ -MEM completo. Medio mililitro de la suspensión era resembrado según se explicó ya, para mantener la línea celular y el restante era diluido y sembrado a baja confluencia (~ 40%) en cajas de Petri plásticas de 30 mm de diámetro para cultivo de tejidos (Costar, Cambridge, MA) con varios cubreobjetos de vidrio estériles (5 mm de diámetro; Corning, Swedesboro, NJ) en su interior. Un par de horas después, las células ya adheridas a los cubreobjetos, eran lavadas dentro de la misma caja de Petri un par de veces durante 5 minutos con  $\alpha$ -MEM sin suero y transfectadas mediante la técnica de liposomas (Lipofectamine, Life Technologies, Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Debido a que el proceso de transfección ofrece una eficiencia variable, con el fin de identificar aquellas células que estuvieran expresando la proteína Kv3.1b, fue necesario cotransfectar en ellas un plásmido (pCDNA 3.0, Invitrogen, Co. Carlsbad, CA) con el cDNA de la Proteína Fluorescente Verde (GFP, Life Technologies, Gaithersburg, MD) para que funcionara a manera de proteína reportera. La GFP fue detectada por la emisión de fluorescencia a 520 nm bajo excitación a 480 nm con epifluorescencia.

Típicamente los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo dos días después de cada transfección.

El estudio de las corrientes generadas por los canales codificados por los transcritos Kv3.2a se realizó en células CHO- trasfectadas establemente de acuerdo a la metodología descrita en 1995 por Moreno y colaboradores. Estas células fueron proporcionadas por el Dr. Bernardo Rudy del Centro Médico de la Universidad de Nueva York. Las células mantenidas en cultivo bajo las condiciones descritas anteriormente fueron tripsinizadas, resuspendidas y

sembradas en cubreobjetos de vidrio de 5 mm de diámetro contenidos en cajas Petri de plástico a una densidad de 50-60% 48 horas antes de cada registro.

En ambos casos, al momento del registro, uno de los cubreobjetos con las células era transferido a una cámara de registro (RC-13, Warner Inst. Hamden, CT) montada en la platina de un microscopio Nikon invertido (Nikon Diaphot, Nikon Corp. Japan). Las células eran perfundidas continuamente con Solución Extracelular para Mamífero (SEM, en mM: NaCl 130, KCl 3, MgCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, HEPES 5, CaCl<sub>2</sub> 2, Glucosa 5, pH 7.4 con NaOH. Sigma Chemical, St Louis, MO) a temperatura ambiente.

### **Disociación de Neuronas del Globo Pálido (GP).**

Para obtener células vivas se utilizaron ratas jóvenes Sprague-Dawley de 10-16 días de edad cuyo cerebro fue extraído rápidamente y sumergido en SEM fría burbujeada con Carbógeno (95% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, Infra, SA. México) 15 minutos antes de comenzar el experimento y continuamente durante el procedimiento. Una vez removido el cerebelo, los hemisferios fueron separados siguiendo la línea media y seccionados en plano parasagital con ayuda de un vibratomo (Campden Instruments, London, UK) en rebanadas de 400 micrómetros de grosor. Las rebanadas se colectaron y mantuvieron en SEM fría hasta el momento de su disección.

El GP se identificó en aquellas rebanadas que lo contenían (normalmente de 4 a 7 de ellas), mediante inspección visual bajo un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 2T, Nikon Corp. Japan). Una vez localizado el tejido de interés, este era separado del resto de la rebanada mediante microdisección y sometido a digestión enzimática en una solución de Pronasa (Pronasa XIV Tipo E 1 mg/ml, Sigma Chemical, St Louis, MO) en SEM durante 25-35 minutos (dependiendo de la edad del animal), a 35 °C bajo agitación suave continua. Posteriormente, el tejido fué lavado tres veces en SEM sin calcio (en mM: NaCl 130, KCl 3, MgCl<sub>2</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, HEPES 5, Glucosa 5, pH 7.4 con NaOH, Sigma Chemical, St Louis, MO, a temperatura ambiente) y triturado mecánicamente mediante pipetas Pasteur (cuyas puntas fueron estrechadas al fuego de tal forma

que se obtuvieron varios diámetros decrecientes), en un volumen final de 2 ml de la misma solución. Una alícuota (~ 1 ml) de la suspensión celular era entonces sembrada en una cámara de registro (RC-13, Warner Inst. Hamden, CT) con fondo de vidrio, montada en la platina de un microscopio Nikon invertido (Nikon Diaphot, Nikon Corp. Japan). Antes de ser perfundidas con solución extracelular con calcio a temperatura ambiente, las células se dejaron reposar durante un período de 15 a 20 minutos para que se pegaran a la superficie de vidrio de la cámara de perfusión.

### **Transfección de Transcritos Dominantes Negativos.**

Con el objetivo de eliminar selectivamente las corrientes Kv3 *in vitro*, se realizó la transfección del cDNA para subunidades Kv3 dominantes negativas en las células del GP.

Estas subunidades carecen de alguna característica fundamental para el correcto funcionamiento del canal, por lo que producen proteínas "defectuosas". El DNA responsable de estas subunidades está incluido en un vector de transfección de alta eficiencia de traducción por lo que se producen en mayor cantidad y compiten con las normales durante el ensamblado final del canal. Al cabo de algún tiempo (generalmente determinado por la velocidad de recambio de la proteína en cuestión) todos los canales de potasio de la subfamilia Kv3 incluyen al menos a una de las subunidades "defectuosas" lo que impide su correcto funcionamiento.

Las neuronas empleadas para este fin, fueron obtenidas siguiendo la técnica de disociación descrita con anterioridad. Se sembraron 100  $\mu$ l de la suspensión celular en cubreobjetos de vidrio de 5 mm de diámetro colocados dentro de cajas de Petri plásticas de 30 mm de diámetro para cultivo de tejidos (Costar, Cambridge, MA). Pasados 10 minutos, la solución extracelular normal fué substituída por  $\alpha$ -MEM (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) suplementado con 15 % de Suero Fetal Bovino (SFB, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), 10,000u/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina, 60 ng/ml de NGF, 2 nM de FGF, 2 nM de EGF y 10 nM de IGF (donados por el Dr. Bernardo Rudy). Los cultivos celulares fueron mantenidos a pH 7.3 bajo una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Dos días después de sembradas, las células fueron lavadas un par de veces con Opti-mem bajo en suero (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) durante 5 minutos cada una y transfectadas siguiendo la metodología descrita por Xia y colaboradores en 1996 con el cDNA de un dominante negativo específico para la familia Kv3. Dicho dominante negativo carece de los 21 aminoácidos que forman la región H5 (proporcionado por el Dr. Bernardo Rudy, Vega Saenz de Miera et al, 1994). Adicionalmente y como elemento reportero, a la misma proteína se le fusionó el DNA responsable de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) en el extremo carboxilo terminal. El constructo fue introducido en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen. Co Madison, Wi) que se caracteriza por su alto nivel de traducción, que como ya se mencionó es una característica fundamental para que la proteína resultante funcione como dominante negativo.

Los registros electrofisiológicos se realizaron después de la transfección, durante todo el tiempo de sobrevivencia de las células del GP en cultivo o hasta que las condiciones del mismo lo permitieran (en promedio 4 días). En cada caso se precedió al registro de varias células cada vez, en condiciones control y en presencia de mM de TEA con el fin de evaluar la disminución en el porcentaje total de corriente sensible a dicho bloqueador de corrientes de potasio.

### **Electrofisiología.**

Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo mediante la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa. En todos los experimentos a la Solución Extracelular para Mamífero utilizada se le adicionaron 1  $\mu\text{M}$  de TTX (Alomone Labs. Jerusalem, Israel) y 200  $\mu\text{M}$  de Cloruro de Cadmio (Sigma Chemical, St Louis, MO), con el fin de bloquear las corrientes de sodio y calcio dependientes del voltaje. El  $\text{CdCl}_2$  al inhibir el influjo de calcio, limita la activación de corrientes de potasio activadas por calcio. Todos los experimentos electrofisiológicos fueron realizados a temperatura ambiente (21-23 °C).

Las micropipetas de registro fueron elaboradas a partir de tubos capilares de borosilicato con microfilamento (GC120F-10, Warner Instrument Corp. Hamden, CT) estirados al calor mediante un jalador de pipetas (Narishige PP-83,

Setagaya-Ku, Japon) y llenados con una solución intracelular diseñada para registrar corrientes de potasio dependientes de voltaje, (Bargas et al 1996;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  106 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, HEPES-K 10 mM, BAPTA-K 10 mM (Molecular Probes, Inc. Eugene OR), ATP-Na 2 mM y GTP 0.5 mM (Sigma Chemical, St Louis, MO); pH 7.35). La alta concentración intracelular del quelante rápido de calcio BAPTA-K se utilizó para limitar aún más la activación de conductancias activadas por calcio. Las resistencias típicas de las micropipetas llenas con esta solución variaron entre 2.5 y 3.0 M $\Omega$ . Los registros de fijación del voltaje fueron realizados mediante un amplificador Axopatch-1D o 200A (Axon Instruments, Foster City, CA) y las corrientes monitoreadas, filtradas (4-pole Bessel; -3 dB a 2 kHz) y digitalizadas a 40 kHz mediante el software pCLAMP 6.0 (Axon Instruments, Foster City, CA) y una tarjeta Digidata 2000 (Axon Instruments) instalada en una computadora 486/100 MHz AT/PC. Los datos experimentales se almacenaron en discos Bernoulli de 90 Mb o en discos ZIP de 100 Mb (Iomega Co. Roy, Utah) y fueron analizados mediante los programas Clampfit de Axon Instruments (Foster City, CA) y Origin 5.0 (Microcal Software Inc. Northampton, MA).

### **Protocolos de Fijación del Voltaje.**

Una vez seleccionada la célula que sería sometida a los protocolos experimentales y desde el momento en que entraba en contacto con la solución extracelular, la micropipeta era mantenida a un potencial de 0 mV con presión positiva en su interior. Ya en contacto con la membrana plasmática, el potencial era fijado en -80 o -40 mV según fuera el caso, aplicándose en la pipeta una pequeña presión negativa mediante succión hasta el establecimiento del sello de alta resistencia. En ese momento se compensaban los transitorios capacitivos generados por la micropipeta en respuesta a un pulso despolarizante de 12.5 ms de duración y 20 mV de amplitud.

Para romper el pedazo de membrana que se encontraba dentro de la boca de la pipeta y alcanzar la configuración de "célula completa", se emplearon pulsos suaves de succión o bien un pulso de alta frecuencia y corta duración (ZAP, <1

ms). La resistencia en serie de la pipeta se compensó usualmente entre el 75 y el 85%. Un vez en la configuración de célula completa, se aplicaba un protocolo para medir la capacitancia de la membrana y evaluar la estabilidad del sello. Dicho protocolo consistía en un escalón de voltaje generado a partir de un potencial de mantenimiento de  $-80$  o  $-40$  mV que despolarizaba hasta  $-60$  o  $-20$  mV respectivamente, durante 15 milisegundos de duración, con una resolución de  $30\mu\text{s}$  por punto a 33 kHz. Típicamente para cada medición se promediaron 50 pulsos.

Para la obtención de las curvas-IV y de activación, se emplearon en todos los casos, pulsos cuadrados de 350 ms de duración con una velocidad de muestreo de  $600\ \mu\text{s}$  por punto a 1.67 kHz. En algunos de ellos se utilizó un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV. En estos, el primer pulso de prueba ocurría a  $-70$  mV y el último a  $+50$  mV incrementándose en pasos de 10 mV cada vez. En aquellos experimentos que se realizaron partiendo de un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV con el fin de eliminar las conductancias inactivantes que tenían umbral de activación inferior a este potencial, el primer pulso de prueba ocurría a  $-30$  mV y el último a  $+50$  en incrementos de 10 mV.

En los experimentos donde se midió la dependencia del voltaje de las colas de corriente y el potencial de inversión de la conductancia de potasio, se empleó un protocolo que consistía de un pulso condicionante seguido de un pulso de prueba. El pulso condicionante despolarizaba a la célula hasta un nivel de  $+50$  mV partiendo de un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV durante 173 ms (momento en el cual la corriente se encontraba claramente en el estado estacionario), a una velocidad de muestreo de  $1000\ \mu\text{s}$  por punto. El pulso de prueba por su parte, hiperpolarizaba a la célula inmediatamente después del pulso condicionante llevando el potencial de membrana hasta  $-100$  mV. En ciclos subsecuentes, el potencial de este pulso se iba despolarizando en escalones de 10 mV cada vez hasta un nivel máximo de  $+10$  mV. Este pulso duró 20 ms muestreando a una velocidad de  $5\ \mu\text{s}$  por punto (200 kHz). Para obtener una mejor resolución en la porción final de la cola de corriente, la velocidad de captura se cambió a  $1.3\ \mu\text{s}$  por punto, 4 milisegundos antes de terminar el pulso condicionante.

Con el fin de evitar la acumulación de la inactivación, el tiempo entre cada episodio de estimulación fue de 15 segundos.

### **Farmacología.**

Las drogas empleadas en este estudio fueron aplicadas únicamente sobre la célula en estudio mediante una pipeta de vidrio de punta relativamente ancha (10  $\mu\text{m}$ ) hecha a partir de un capilar de borosilicato estirado al calor y colocada a una distancia de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de la célula con ayuda de un micromanipulador electrónico (MS 314, Fine Science Tools Inc. Foster City, CA). La aplicación se realizó, ya sea por gravedad o por pulsos de presión (10 psi) controlados con un dispositivo Picospritzer II (General Valve Corp. Fairfield, NJ).

Las corrientes sensibles a cualquiera de los fármacos empleados, fueron aisladas por substracción digital punto a punto de las familias de corrientes obtenidas antes y después de la aplicación de la droga. En algunos experimentos, las células fueron expuestas a una solución que contenía de 0.1 a 10 mM de Cloruro de Tetraetilamonio (TEA, Sigma Chemical, St Louis, MO) o 4-Amino-Piridina (4-AP, Sigma Chemical, St Louis, MO) disuelto en SEM con TTX y  $\text{CdCl}_2$ . Típicamente se aplicó 1 mM de TEA para identificar aquellas corrientes nativas posiblemente pertenecientes a la subfamilia Kv3 (ver mas adelante).

### **Reaccion en Cadena con Polimerasa en Celula Unica (Single Cell RT-PCR).**

La presencia del RNA mensajero para cada uno de los genes de la familia Kv3 en las células disociadas del GP se determinó mediante la Reacción en Cadena con Polimerasa en Célula Única (Single Cell RT-PCR) siguiendo los protocolos descritos en (Vega-Sáenz de Miera y Lin, 1992) con las siguientes modificaciones: Todas las soluciones se prepararon en agua bidestilada libre de RNAsas (Sigma Chemical, St Louis, MO). Todo el material de vidrio empleado fue lavado previamente en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma Chemical, St Louis, MO) y horneado a 150°C durante 12 horas.

Las células individuales fueron colectadas directamente de la cámara de registro mediante una micropipeta estéril de punta ancha (2-5  $\mu\text{M}$  de diámetro) llena con 3  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía 150 mM de KCl, 30 mM de Tris-HCl pH 8.3 y 10 unidades de Inhibidor de RNAsa (Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor, Promega Co. Madison, Wi.) empleando succión suave. Posteriormente, el contenido de la pipeta fue depositado, rompiendo la punta, en el fondo de un tubo Eppendorf de 500  $\mu\text{l}$  nuevo el cual se mantuvo en nitrógeno líquido hasta su uso.

Para la obtención del cDNA mediante la reacción de Transcripción Reversa de RNA, se emplearon, por cada tubo, 17 microlitros de una solución conteniendo 1.18 mM de dNTP's, 3.82 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 50 unidades de Transcriptasa Reversa Rnasa H minus del Virus de la Leucemia Murina (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), 4.4  $\mu\text{M}$  de iniciadores aleatorios (Hexamer Random Primer, Pharmacia, Crawley Sussex, GB), 20 unidades por mililitro de Inhibidor de RNAsa, 30 mM de KCl y 6 mM de Tris-HCl pH 8.3 mas 50  $\mu\text{l}$  de aceite mineral para PCR libre de RNAsas (Sigma Chemical, St Louis, MO) en la parte superior de la fase acuosa con el fin de evitar la evaporación durante la termociclación. Los tubos fueron incubados sucesivamente a 25  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, a 37  $^{\circ}\text{C}$  15 minutos y a 42  $^{\circ}\text{C}$  15 minutos. Finalmente fueron calentados a 94 $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para dar por terminada la reacción y luego mantenidos a 0 $^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior amplificación por PCR (Vega-Sáenz de Miera y Lin, 1992).

Ya que se esperaba obtener una baja cantidad de RNA para cada uno de los diferentes canales Kv3 en virtud de que se emplearon células únicas y del (posiblemente) bajo número de copias de estos mensajeros en cada célula, con el fin de obtener producto suficiente para una identificación confiable (a pesar de la enorme sensibilidad de esta metodología), se resolvió utilizar una modificación del RT-PCR típico conocida por su nombre en inglés como "Nested RT-PCR". En esta técnica se hacen dos rondas de amplificación: la primera utilizando iniciadores "degenerados" o genéricos capaces de amplificar a todos los RNA's presentes o únicamente a una familia en particular de RNA's relacionados entre si. La segunda

ronda emplea iniciadores específicos para así obtener una mayor cantidad del producto buscado (Vega-Sáenz de Miera y Lin, 1992).

Para la primer ronda de amplificación se utilizaron 75  $\mu$ l de una solución conteniendo 50 mM de KCl, 0.85 mM de  $MgCl_2$ , 1.7  $\mu$ M de cada uno de los iniciadores genéricos para la familia Kv3 (sentido: CTC GAA TTC | TT(C/T) TG(C/T) (C/T)TN (A/G)A(A/G) CAN CA, antisentido: CTCGAATTC GGA (A/G)TA (A/G)TA CAT N(C/G)C (G/A)AA) y 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 los cuales fueron agregados a cada uno de los tubos que contenían el producto de la reverso transcripción. Los tubos fueron entonces calentados durante 5 minutos a 94°C. Estando los tubos todavía a 94 °C ("hot start"), se les adicionó a cada uno, 5  $\mu$ l de una solución conteniendo 2.5 unidades de Taq Polimerasa (Taq Polimerase, Perkin Elmer, Norwalk, CT), 50 mM de KCl y 10 mM de Tris-HCl pH 8.3. En los casos las soluciones fueron mezcladas a través del aceite mineral que cubría la superficie acuosa.

Los tubos fueron sometidos a 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo estuvo estructurado de la siguiente forma: 1) desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, 2) alineamiento a 48 °C por 1 minuto y, 3) extensión a 72 °C por 1 minuto. Finalizando los primeros 35 ciclos, la reacción se dio por terminada calentando los tubos por 7 minutos a 72 °C.

Para la segunda ronda de amplificación, en un tubo nuevo de PCR, se añadieron: un microlitro del producto de la primera ronda de amplificación mas 94  $\mu$ l de una solución conteniendo 2.63 mM de  $MgCl_2$ , 210  $\mu$ M de dNTPs, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 y 160 nM de los iniciadores específicos para cada uno de los diferentes miembros de la familia Kv3 (Kv 3.1b -532 pb- sentido 1441-1461: CGC TTC AAC CCC ATC GTC AAC, Antisentido 1930-1951: GTG TGT GTG TTC GCT GGC GCT en Acc# M37845; Kv3.2a -447 pb- Sentido 882-901: CC AGC GCT GTT CTC CAG TAT, Antisentido 1358-1337: C AAT GGG GAT GTT TTT GAA CTG en Acc# M34052; Kv3.3 -209 pb- Sentido 1192-1210: GTG ACG CAG GCC TCT CCA A, Antisentido 1381-1400: AAG GGC AAG ATG GCT ACA

CA en Acc# M84211; Kv3.4 -336 pb- Sentido 1312- 1333: CCT GAT ACG TTG GAC TTT GTC, Antisentido 1629-1647: ATT GCC CCG TGG GTC AGA en Acc# X62841). Finalmente, en la superficie de cada tubo se pusieron 50  $\mu$ l de aceite mineral y fueron calentados a 94 °C durante 5 minutos para inmediatamente después agregárseles la Taq Polimerasa en la manera como se describió previamente. Los tubos se sometieron esta vez a 20 ciclos de amplificación (1 minuto de desnaturalización, alineamiento y extensión a 94, 55 y 72°C respectivamente) seguidos de un último período de extensión a 72°C por 7 minutos. Los productos finales fueron mantenidos en refrigeración hasta su análisis por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

# RESULTADOS

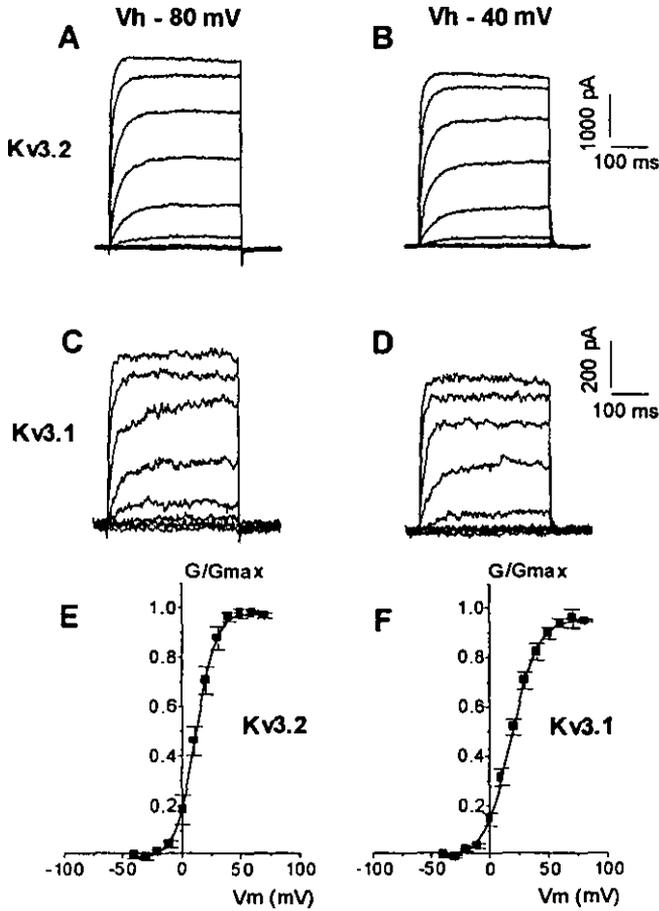
## Corrientes de Potasio en las Células CHO.

Las neuronas nativas del SNC poseen un amplio repertorio de canales de potasio dependientes del voltaje de los cuales una cierta proporción podría corresponder a canales formados por subunidades codificadas por genes de la subfamilia Kv3. Debido a que las corrientes generadas por estos genes en los sistemas de expresión heteróloga poseen un umbral de activación particularmente elevado ( $\sim -10$  mV), se consideró que una estrategia potencialmente útil para eliminar una fracción importante de las corrientes de potasio que se activan a potenciales más negativos ( $\sim -50$  mV) en las células nativas, sería fijar el potencial de mantenimiento a un valor que inactivase dichas corrientes, pero sin afectar de forma importante a las corrientes de interés.

Para conocer cuál sería el potencial de mantenimiento apropiado para esta maniobra, se estudió el efecto de variar el potencial de mantenimiento sobre las corrientes de potasio Kv3.1 y Kv3.2 expresadas aisladamente en las células CHO. En la figura 22 se comparan las corrientes producidas por una serie de escalones de voltaje similares a los ya descritos en la sección de materiales desde potenciales de mantenimiento de  $-80$  y  $-40$  mV en células CHO transfectadas estable o transitoriamente con el cDNA para los canales de potasio Kv3.2 o Kv3.1 respectivamente.

En la parte superior de cada columna se indica el potencial de mantenimiento utilizado en cada caso. Los paneles *A* y *B* muestran los efectos de cambiar el potencial de mantenimiento sobre una familia de corrientes de potasio activadas por el voltaje en células transfectadas con el transcrito Kv3.2, en tanto que *C* y *D* ilustran los efectos de la misma maniobra sobre la familia de corrientes de potasio activadas por el voltaje en células CHO transfectadas con el transcrito Kv3.1. Como puede observarse, los pulsos de voltaje aplicados desde potenciales

de mantenimiento de  $-80$  y de  $-40$  produjeron en ambos casos, corrientes salientes de potasio de tipo rectificador sostenido. El cambio del potencial de



**Figura 22.** Efecto de cambiar el potencial de mantenimiento sobre la amplitud de las corrientes de potasio dependientes de voltaje Kv3.1b y Kb3.2a en células CHO.

Corrientes producidas por una serie de escalones de voltaje aplicados desde un potencial de mantenimiento de  $-80$  (paneles **A** y **C**) ó desde  $-40$  mV (paneles **B** y **D**). En la parte superior de cada columna se indica el potencial de mantenimiento utilizado en cada caso. Los paneles **A** y **B** muestran las corrientes Kv3.2, en tanto que **C** y **D** ilustran los efectos de la misma maniobra sobre la familia de corrientes de potasio activadas por el voltaje en células transfectadas con el transcrito Kv3.1

Los paneles **E** y **F** muestran las curvas de conductancia máxima normalizada ( $G/G_{max}$ ) en función del voltaje obtenidos para las corrientes Kv3.2 y Kv3.1 respectivamente. En cuadros con barras de error estandar están los datos experimentales y con una línea continua el resultado del mejor ajuste a la función de Boltzman. Ver texto para más detalles.

mantenimiento de -80 a -40 mV redujo únicamente  $9.3 \pm 0.1\%$  y  $9.8 \pm 0.6\%$  ( $n=4$ ), de la corriente máxima inicial, respectivamente. Este cambio no es significativo.

En estudios realizados previamente (Vega-Saenz de Miera, 1994), se concluyó que de acuerdo con su dependencia del voltaje, las corrientes Kv3.1b y Kv3.2a, expresadas en ovocitos de *Xenopus*, eran prácticamente indistinguibles entre sí. Sin embargo, un examen más cuidadoso de nuestros registros obtenidos en células CHO reveló algunas diferencias sutiles. Los paneles E y F muestran las curvas de conductancia máxima normalizada ( $G/G_{max}$ ) en función del voltaje, para las corrientes Kv3.2 y Kv3.1 respectivamente. Los datos de corriente (transformados a conductancias considerando un potencial de equilibrio para el potasio ( $E_K$ ) de -80 mV), fueron ajustados a una función de Boltzman de la forma  $G/G_{max} = 1/[1 - \exp(V_m - V_{1/2})/k]$ . De la comparación de los parámetros derivados de este ajuste a las curvas de activación de ambas corrientes, puede inferirse que los canales formados con productos del transcrito Kv3.2 poseen una sensibilidad ligeramente mayor al voltaje que los canales Kv3.1. Esto se manifiesta tanto en el voltaje al cual la corriente alcanza la mitad de su activación ( $V_{1/2} = 12.1 \pm 1.26$  mV para Kv3.2 versus  $19.1 \pm 0.11$  mV para Kv3.1), como en el parámetro de pendiente  $k$  (milivolts necesarios para que se produzca un cambio de  $e$ -veces en la conductancia;  $8.4 \pm 0.25$  mV en Kv3.2 versus  $11.0 \pm 0.2$  mV en Kv3.1).

Cuando se analizaron las cinéticas de deactivación fueron aparentes algunas diferencias en los parámetros cinéticos de las corrientes Kv3.1 y Kv3.2 reportados en la bibliografía.

En la figura 23 se muestran ejemplos de los registros de colas de corriente observados en las células CHO transfectadas con el cDNA de los canales Kv3.1 y Kv3.2 (paneles A y B respectivamente). Dichas familias de corrientes fueron obtenidas mediante la aplicación de un protocolo que consistió de un pulso condicionante que despolarizó a la célula desde un potencial de mantenimiento de -40 mV hasta +50 mV durante 220 ms (momento en el cual la corriente y se encontraba en el estado estacionario) a una frecuencia de muestreo de 200 kHz,

seguido inmediatamente de varios pulsos de prueba hiperpolarizantes desde -100 mV hasta +10 mV en incrementos de 10 mV cada vez durante 20 ms.

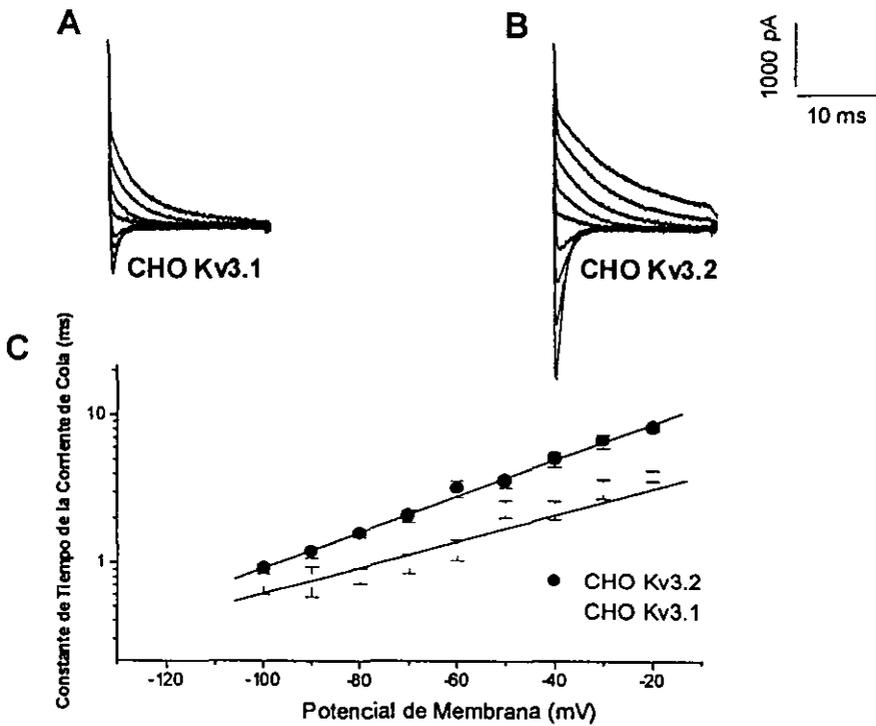


Figura 23. Comparación de las corrientes de cola generadas por el cierre de los canales de potasio dependientes de voltaje de tipo Kv3.1b y Kv3.2a expresados en células CHO.

A,B: Familias de colas de corriente obtenidas de células CHO trasfectadas con cDNA para Kv3.1 y Kv3.2 respectivamente. Nótese que las colas de corriente de los canales Kv3.1 tienen constantes de deactivación más rápida que las colas de corriente de los canales Kv3.2. C: Dependencia del voltaje de la constante de tiempo de deactivación para ambos casos. La simbología para cada trazo se encuentra del lado derecho inferior de la gráfica. Para detalles ver texto.

En esta figura puede observarse que las colas de corriente de los canales Kv3.1 tienen constantes de deactivación más rápida que las colas de corriente de los canales Kv3.2 ( $1.2 \pm 0.2$  ms vs  $5.3 \pm 0.1$  ms,  $n = 4$ ; respectivamente, a un potencial de +40 mV). En el panel C se muestra la dependencia del voltaje de la constante de tiempo de deactivación para ambos casos. La pendiente de la recta obtenida por ajuste lineal de los datos es de  $1.18 \pm 0.01$ ;  $R = 0.99$  para Kv3.1 y de

$0.78 \pm 0.01$ ;  $R = 0.94$  para Kv3.2, respectivamente. La diferencia en la dependencia al voltaje es significativa ( $P < 0.005$ ).

En lo que respecta al potencial de reversión obtenido cuando se gráficán los valores instantáneos de corriente en las colas en función del voltaje (figura 24), se encontró una diferencia de aproximadamente 10 mV entre las corrientes conducidas por cada tipo particular de canales Kv3: Kv3.2 =  $-65 \pm 2.35$  mV; Kv3.1 =  $-55 \pm 3.56$  mV ( $n = 3$ ).

La diferencia encontrada en el potencial de reversión indicaría que los canales Kv3.1 son menos selectivos para el ion potasio que los Kv3.2. Son necesarios experimentos adicionales variando las concentraciones extra e intracelulares de potasio para confirmar este fenómeno.

Las diferencias mencionadas entre los canales homomultiméricos Kv3.1 y Kv3.2 expresados en células CHO reportadas por primera vez en este trabajo, podrían servir en un momento dado como criterios adicionales a las características biofísicas reportadas previamente, para distinguir componentes resultado de la actividad de los respectivos canales en las células nativas.

Hasta el momento de escribir esta tesis no se disponía de bloqueadores específicos para ninguna de las corrientes iónicas producidas por los canales de potasio de la subfamilia Kv3. Sin embargo, en diferentes estudios (Yokoyama et al, 1989; McCormack et al, 1990; Rudy et al, 1991<sup>a, b, c</sup>; Vega-Sáenz de Miera et al, 1992<sup>a, b</sup>; Grissmer et al, 1994; Retting et al, 1992), se ha reportado que estos canales se bloquean con concentraciones muy bajas de tetraetilamonio (TEA) o de 4-Aminopiridina (4-AP).

En general, los estudios farmacológicos realizados hasta la fecha en esta subfamilia de canales iónicos se han efectuado en sistemas de expresión y bajo condiciones de registro diferentes a los empleados en este trabajo, razón por la que consideramos necesario e interesante confirmar los datos previos de

sensibilidad hacia TEA y 4-AP en las condiciones y en las células empleadas en este trabajo.

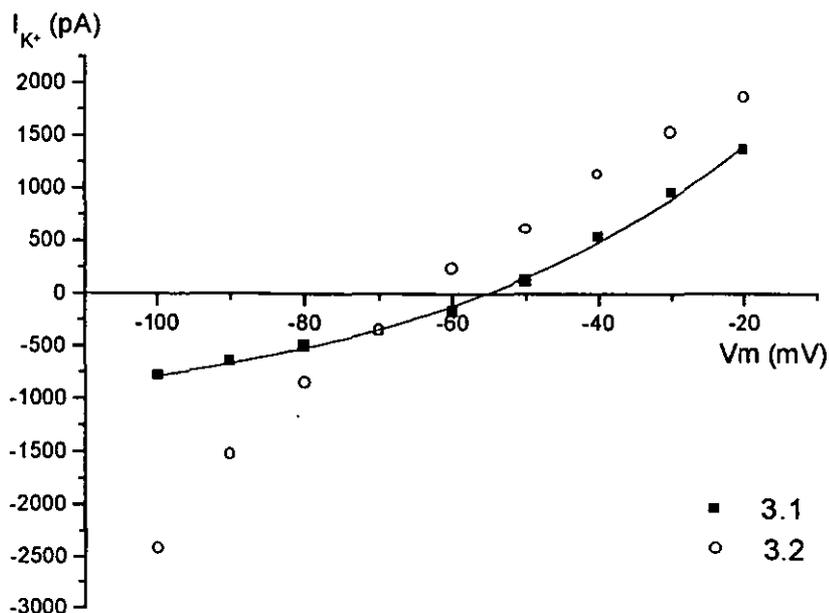


Figura 24. Potencial de inversión de las colas de corriente de potasio en las células CHO transfectadas con cDNA para las proteínas Kv3.1 y Kv3.2. Se puede observar que los canales Kv3.1 muestran una marcada rectificación saliente, en tanto que la corriente Kv3.2 posee una discreta rectificación entrante. El potencial de reversión calculado de acuerdo a la ecuación de Nernst indicó que el potencial de reversión teórico es de -81 mV.

La figura 25 muestra la curva dosis-respuesta para la inhibición por TEA de las corrientes registradas en las células CHO transfectadas establemente con el cDNA para el canal Kv3.2 y la obtenida en las células CHO transfectadas transitoriamente con el cDNA de Kv3.1 (veáse métodos). Las IC<sub>50</sub> que se calcularon en las curvas dosis-respuesta para TEA (Kv3.2 = 0.28 mM, n=4; Kv3.1 = 0.38 mM, n=4), son algo mayores que las reportadas por otros autores (Kv3.2 = 0.125 mM; Grissmer et al, 1994) al menos para los canales Kv3.2. Esto puede deberse a diferencias en las condiciones experimentales. Aunque no se examinaron en detalle los efectos de la 4-AP sobre estas corrientes, por razones

que se explicarán mas adelante, algunos experimentos realizados aquí (datos no mostrados) confirmaron la alta sensibilidad de esta subfamilia de canales hacia este bloqueador inespecifico de conductancias de potasio (~ 0.5 mM, McCormack et al, 1990; Grissmer et al, 1994).

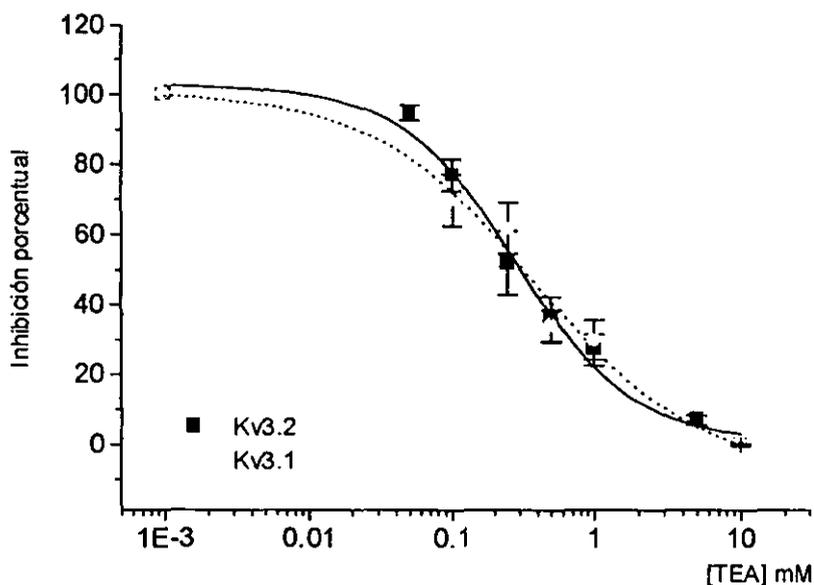


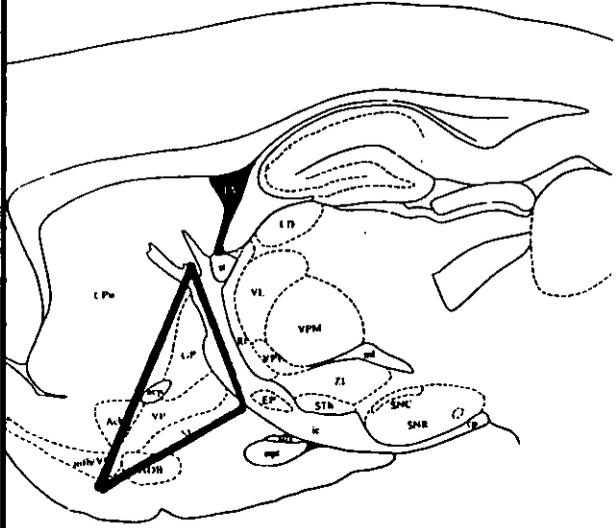
Figura 25. Curva dosis hacia TEA en los canales Kv3.1b y Kv3.2a expresados en células CHO. Las corrientes salientes antes y después de la aplicación de TEA fueron producidas por pulsos despolarizantes de 500 ms de duración a partir de un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV. El primer pulso ocurrió en  $-30$  y luego hasta  $+50$  mV en incrementos de 10 mV. La aplicación del bloqueador se describe en los métodos. Círculos abiertos Kv3.1b, círculos cerrados Kv3.2a.

Varias conclusiones se desprenden de los resultados obtenidos durante los experimentos en las células CHO transfectadas con canales Kv3.1 y Kv3.2:

- 1) El fijar un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV es una maniobra válida que en principio ayudaría a eliminar selectivamente por inactivación, aquellos componentes de corriente saliente de potasio con bajo umbral de activación que por sus características cinéticas y de dependencia al voltaje no son de interés para el presente trabajo. Las corrientes codificadas en los genes de la subfamilia Kv3, no se inactivan ni sufren otros cambios cinéticos significativos ante esta maniobra.

2) Se confirmó que bajo las condiciones de registro empleadas en este trabajo, las corrientes de potasio de la subfamilia Kv3 se inhiben a concentraciones muy bajas de TEA (Kv3.2  $IC_{50}$  = 0.28 mM; Kv3.1  $IC_{50}$  = 0.38 mM). La sensibilidad media obtenidas ubica a estas proteínas como las más sensibles hacia estas drogas de entre la superfamilia de canales sensibles al voltaje. Esto garantiza que empleando concentraciones cercanas a 1 mM, se eliminaría selectivamente una fracción importante (~ 80%) de la corriente generada por estos canales, sin afectar otras corrientes menos sensibles. Además permitirá mediante la substracción digital de los registros antes y después de TEA (ver más adelante), estudiar en aislamiento a los componentes de corriente que probablemente resultan de la actividad de canales en cuya composición intervienen productos de los transcritos de la familia Kv3.

3) Se detectó que las corrientes de potasio que fluyen a través de los canales codificados por transcritos de Kv3.1 y Kv3.2, presentan diferencias en su sensibilidad al voltaje, cinética de deactivación, y potencial de reversión. De confirmarse, estas diferencias podrían ser útiles como criterios para su identificación y discriminación en células nativas.



## **Corrientes de potasio activadas por el voltaje en las neuronas del globo pálido disociadas agudamente.**

Como producto de la disociación enzimática del GP, típicamente se obtuvieron tres tipos celulares que morfológicamente corresponden a aquellos reportados previamente en diversos estudios como característicos del GP (figura 26, comparar con las figuras 16, 17 y 18). Se encontraron igualmente abundantes astrocitos y algunas células multipolares pequeñas (no se muestran).

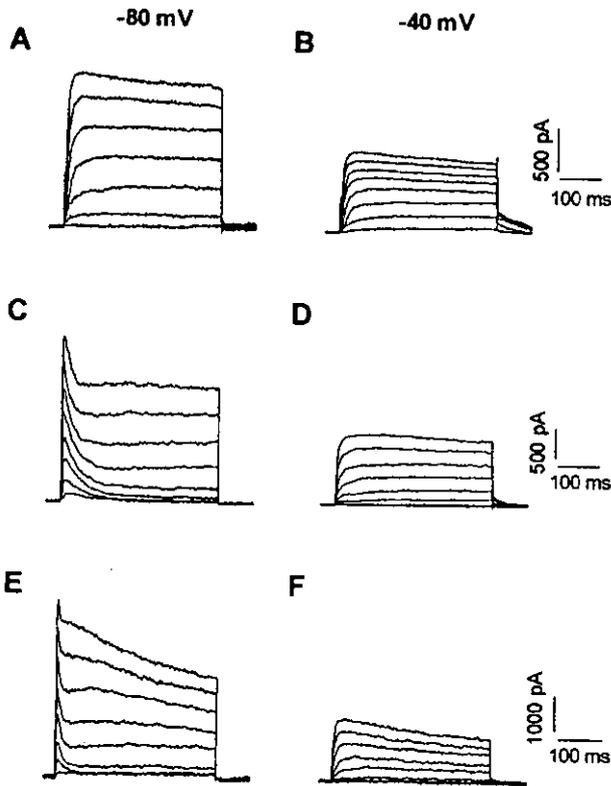
**Figura 26.** Microfotografías de los tipos celulares característicos obtenidos del GP de la rata mediante disociación. En el panel A se muestran las células triangulares y bipolares denominadas aquí como células tipo "A". En B se muestra un ejemplo de las células grandes multipolares tipo "B". La barra de calibración equivale a 20 micrómetros.

Fué posible agrupar a estas células de acuerdo con la proporción relativa de corriente saliente de potasio de bajo umbral de activación tipo "A" que presentaron como resultado de pulsos despolarizantes a partir de un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV (durante 350 ms, iniciándose en  $-70$  y hasta  $+30$  mV en incrementos de 10 mV). En la figura 27 paneles **A**, **C** y **D** se muestran ejemplos de tres diferentes células con proporciones baja, mediana y alta respectivamente de dicho componente de corriente inactivante. En la columna de la derecha, paneles **B**, **D** y **F**, se muestran las familias de trazos de corriente obtenidos en las mismas células mediante un protocolo similar al anterior pero partiendo de un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV. En este caso los escalones de voltaje inician a  $-30$  mV y terminan en  $+30$  mV, en pasos de 10 mV. Es claro que como resultado en el cambio del potencial de mantenimiento de  $-80$  a  $-40$  mV, desaparecen al menos dos componentes de corriente de bajo umbral de activación: un componente que corresponde a la corriente de tipo "A" clásica y un componente de corriente de potasio de tipo rectificador retardado de amplitud variable. En algunos casos, este segundo componente es tan grande que puede enmascarar casi completamente la inactivación de la corriente "A". Nótese que la corriente de potasio que no se inactiva a  $-40$  mV (aproximadamente el 50% de la corriente total registrada a  $-80$  mV), es muy similar en los tres ejemplos que se ilustran y tiene las características de un rectificador retardado. En los casos mostrados en **B** y **F** es apreciable una ligera inactivación lenta.

Según lo expuesto anteriormente, el cambio en el potencial de mantenimiento de  $-80$  a  $-40$  mV elimina una fracción de la corriente de potasio que por su inactivación y dependencia del voltaje no son candidatos a ser alguno de los miembros de la subfamilia Kv3.

A manera de complemento, en la figura 28 se observan las familias de corrientes de potasio producidas bajo un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV (panel **A**) y a  $-40$  mV (panel **B**). En el panel **C** se muestra el resultado de la substracción digital punto a punto de los trazos obtenidos en **A** menos los trazos obtenidos en **B**. Se puede ver que la maniobra de cambiar en el potencial de

mantenimiento elimina en su totalidad un componente inactivante rápido de bajo umbral de activación (~60 mV) y a un componente de corriente de potasio saliente sostenida también de bajo umbral de activación (~50 mV). En el caso de la corriente inactivante, dadas sus características cinéticas y su dependencia del voltaje aparentes, probablemente se trate de algún tipo de corriente inactivante "A" codificada por los genes Kv4. En el panel *D* se muestra la grafica de conductancia ( $G/G_{max}$ ) normalizada para las corrientes observadas en las células del GP a dos diferentes potenciales de mantenimiento. El posible origen de la corriente rectificadora de bajo umbral de activación se discutirá más adelante.



**Figura 27.** Familias representativas de las corrientes de potasio dependientes de voltaje obtenidas en las células disociadas del GP de la rata a dos diferentes potenciales de mantenimiento. Se comparan las corrientes producidas por una serie de escalones de voltaje aplicados desde un potencial de mantenimiento de -80 mV (paneles *A*, *C* y *E*) o desde -40 mV (*B*, *D* y *F*). Para más detalles ver texto.

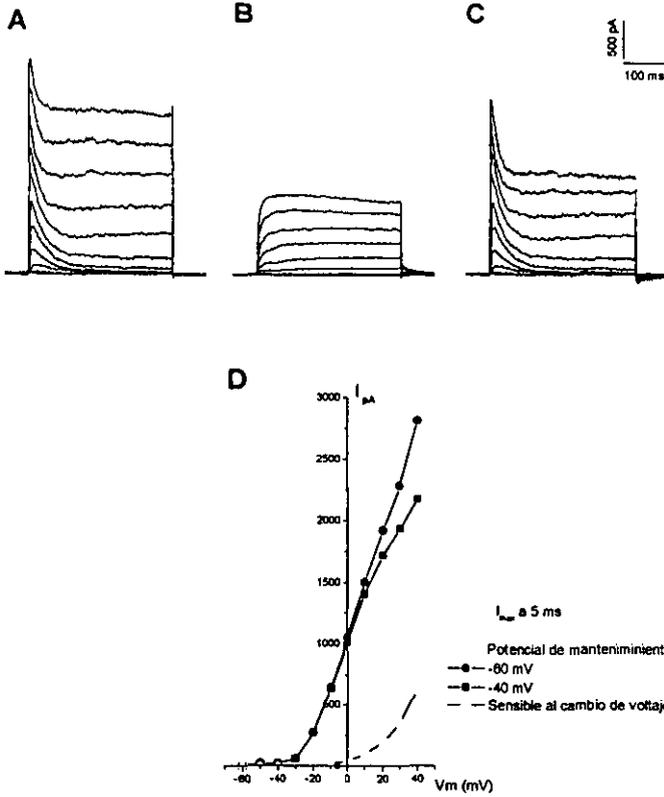


Figura 28. Familias de corrientes de potasio producidas en una célula del GP bajo un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV (A) y a  $-40$  mV (B). C. Resultado de la sustracción digital de los trazos obtenidos en A menos los trazos obtenidos en B. La maniobra de cambiar en el potencial de mantenimiento elimina en su totalidad un componente inactivante rápido de bajo umbral de activación ( $\sim 60$  mV) y a un componente de corriente de potasio saliente sostenida también de bajo umbral de activación ( $\sim 50$  mV). En D se muestra la gráfica de conductancia ( $G/G_{max}$ ) normalizada para las corrientes observadas en las células del GP a dos diferentes potenciales de mantenimiento. Puede observarse que el componente sensible a la maniobra de cambio de potencial posee un umbral de activación cercano a  $-10$  mV. La simbología correspondiente se indica en la gráfica.

Los experimentos que se describen a continuación estuvieron encaminados a responder la siguiente pregunta: ¿Existe en las células del globo pálido, algún componente macroscópico de la corriente de potasio cuya cinética, dependencia del voltaje y farmacología sugiera que resulte de la actividad de canales de potasio en cuya composición participan productos de los transcritos de genes Kv3?. De ser así, ¿a cuales transcritos de los ya clonados corresponden dichas corrientes?

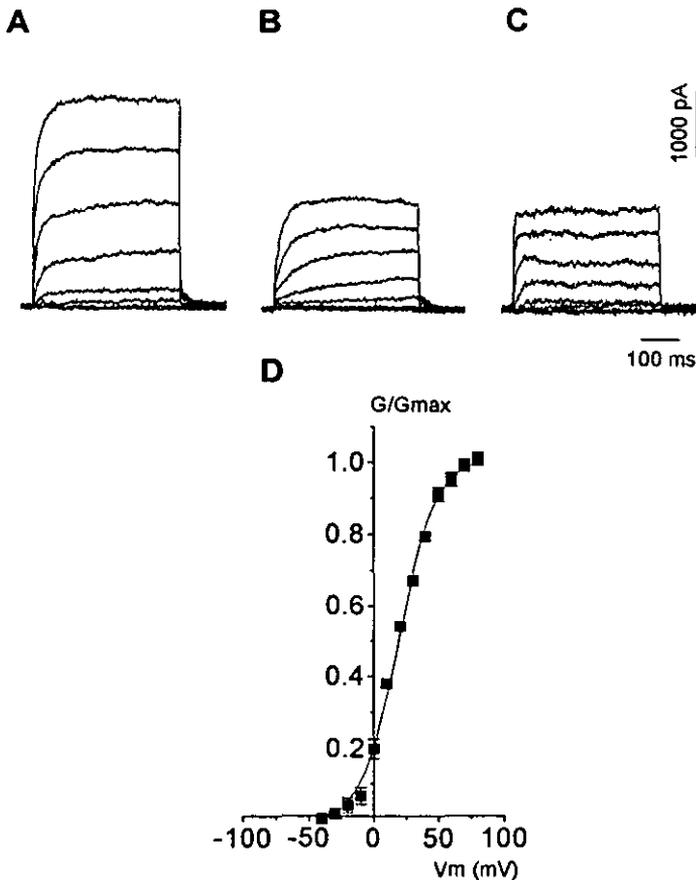
Los resultados serán presentados en dos partes. Cada una de ellas agrupa los datos obtenidos en dos aparentes subpoblaciones celulares existentes en nuestras disociaciones del GP distinguibles entre sí por su morfología y sus características electrofisiológicas: células de tipo "A" y células de tipo "B".

## **Características biofísicas de las corrientes de potasio de las neuronas del GP de tipo "A".**

A este grupo pertenecen las células de soma fusiforme o bipolar y triangular (ver figura 26 paneles **A**, **B**). En la figura 29, se presentan los registros típicos obtenidos de una célula con estas características morfológicas. En el panel **A**, se muestra la familia de corrientes de potasio obtenidas mediante la aplicación de pulsos de voltaje de 350 ms de duración a partir de un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV. Los pulsos inician a  $-30$  mV y continúan hasta  $+60$  mV en pasos de 10 mV. La familia de corrientes registradas en condiciones control, denominada aquí  $I_{GPc}$ , comienza a activarse a  $-30$  mV y tiene las características de una corriente sostenida de tipo rectificador tardío. La deactivación de las colas de corriente que se observan al repolarizar la membrana nuevamente a  $-40$  mV es relativamente lenta. El panel **B** muestra la familia de corrientes que permanecen en la misma célula luego de la aplicación de 1 mM TEA en el medio externo. Este componente de corriente remanente, llamado resistente al TEA o  $I_{GP,R}$ , también posee características de una corriente sostenida de tipo rectificador retardado, aunque muestra una cinética de activación más lenta que la de  $I_{GPc}$ .

La deactivación del componente de corriente  $I_{GP,R}$  es también lenta. En **C** se muestra el componente de corriente sensible al TEA ( $I_{GP,TEA}$ ) obtenido mediante la substracción digital de los trazos de corriente que se muestran en **A** de los trazos correspondientes en **B**. De manera característica, en las células de tipo A, la corriente  $I_{GP,TEA}$  es sostenida de tipo rectificador retardado y representa aproximadamente el 50% de la corriente total.

Típicamente, la cinética de activación de  $I_{GP,TEA}$  es más rápida que la de  $I_{GPc}$  ó  $I_{GP,R}$  (**A** y **B** respectivamente).



**Figura 29.** Corrientes de potasio activadas por el voltaje registradas en las células tipo A del GP de la rata. **A, B y C:** Familias de curvas de corriente de potasio obtenidas de la misma célula a partir de un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV.

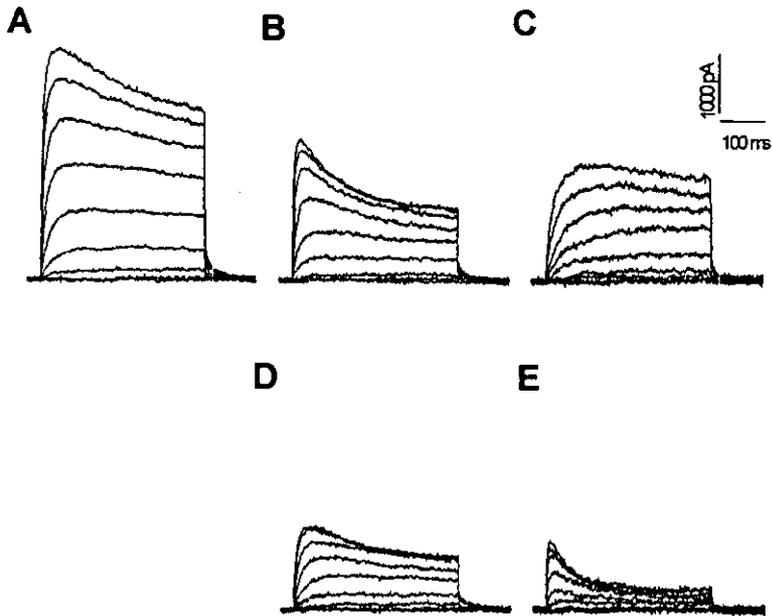
**A:** Registro control ( $I_{GP,C}$ ). Obsérvese las colas de corriente relativamente lentas ( $\tau_{deact} = 37.54 \pm 4.41$  ms a  $+40$  mV,  $n = 9$ ). **B:** La corriente resistente al TEA ( $I_{GP,R}$ ) mantiene las características de un rectificador sostenido con deactivación lenta ( $\tau_{deact} = 25.64 \pm 3.38$  ms, a  $+40$  mV,  $n = 9$ ). La corriente que se observa en esta figura representa aproximadamente el 50% de la corriente total control. **C:** Como resultado de la sustracción digital de los trazos observados en A y B, se obtuvo una corriente de tipo rectificador sostenido con alto umbral de activación sensible a 1 mM de TEA, esta corriente denominada  $I_{GP,TEA}$ , posee una muy rápida deactivación:  $\tau_{deact} = 2.27 \pm 0.24$  ms a  $+40$  mV;  $n = 6$ ). **D:** Se muestra la gráfica de conductancia ( $G/G_{max}$ ) normalizada para la corriente sensible al TEA. En cuadros están indicados los datos experimentales ( $n=6$ ) con barras de error estándar, la línea representa el mejor ajuste de acuerdo a la función de Boltzmann. Los parámetros derivados del ajuste y que representan la sensibilidad al voltaje de los canales durante su activación se encuentran en el texto.

La sola inspección superficial de la velocidad de deactivación de las colas de corriente  $I_{GP, TEA}$  revela que éstas decaen más rápidamente que observadas en  $I_{GP,C}$  ó  $I_{GP,R}$ . En el panel **D** se grafica la dependencia del voltaje en el estado estacionario de la conductancia normalizada ( $G/G_{max}$ ) calculada a partir de los trazos de corriente  $I_{GP, TEA}$ . Como puede verse, la conductancia de la  $I_{GP, TEA}$  comienza a activarse entre -20 y -10 mV. La línea continua representa el mejor ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann, calculada como se hizo para la figura 22. Los valores de los parámetros  $V_{1/2}$  y  $k$  que resultan del ajuste son:  $16.9 \pm 56$  mV y  $10.6 \pm 24$  mV, respectivamente.

Con base en sus características cinéticas y de dependencia del voltaje, podemos pensar que el componente de corriente que hemos denominado  $I_{GP, TEA}$  podría corresponder a la fracción de la corriente total que fluye a través de canales codificados por transcritos de la subfamilia Kv3 en las neuronas del globo pálido.

Como se mencionó anteriormente, estos canales poseen, además de una alta sensibilidad al TEA una exquisita susceptibilidad al bloqueo por 4-AP ( $IC_{50} < 1$  mM). Una pregunta que surge es: ¿el efecto combinado de estos agentes es sumatorio o por el contrario, se excluyen mutuamente?. En otras palabras: ¿el componente bloqueado por el TEA es el mismo que el bloqueado por 4-AP?

Para resolverla estudiamos el efecto de aplicar primero 1 mM de TEA y después TEA 1 mM +4-AP 1 mM sobre las corrientes de potasio de una célula de tipo A (figura 30).



**Figura 30.** Efecto del TEA y 4-AP sobre las corrientes de potasio de una célula de tipo A. **A:** Se muestra la familia de corrientes registradas bajo condiciones control. **B:** Registros de corriente obtenidos en la misma célula en presencia de 1 mM TEA. El panel **C** ilustra el resultado de la substracción digital realizada para revelar el componente sensible a TEA. En el panel **D** se muestra el resultado de la aplicación simultánea de 1 mM de TEA y 1 mM de 4-AP y en **E**, el resultado de restar digitalmente los trazos en D de los trazos en B para mostrar únicamente al componente sensible a 4-AP.

Claramente el TEA bloquea eficientemente un componente de corriente de activación lenta y sostenida, afectando menos al componente de activación rápida que exhibe inactivación (**B**). El bloqueo adicional producido por la 4-AP tiene características opuestas del que se establece luego de la aplicación de 1 mM TEA (comparar los paneles **C** y **E**). Por un lado, las corrientes remanentes tienen una cinética de activación aparentemente más lenta que las registradas en presencia únicamente de TEA. Además, el efecto combinado es mayor sobre la fase inicial transitoria de la corriente y menor sobre la fase sostenida. Esto se ve claramente

en el panel *E*. Las corrientes de potasio sensibles al 4-AP obtenidas de esta manera, constan de un componente inactivante rápido y de una fracción menor de corriente sostenida.

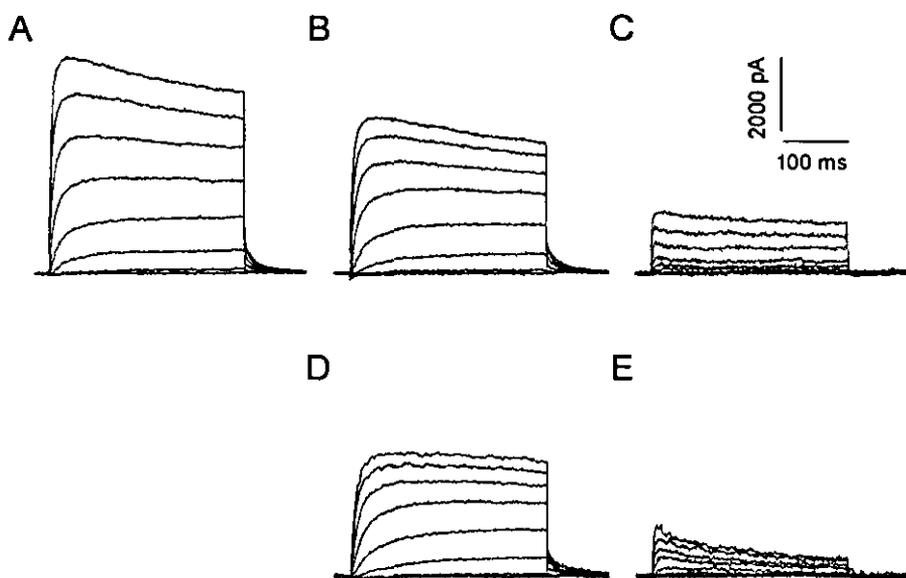
Los efectos del 4-AP en las células del GP, claramente diferentes respecto de los del TEA, hacen suponer que posiblemente el 4-AP elimine, además de las corrientes transportadas por los canales codificados en los transcritos Kv3, a otras corrientes que también se encuentran presentes en estas células y que se activan, si no en el mismo rango de potenciales en alguno cercano. ¿Que tipo de corriente es la eliminada por el 4-AP?. Una posible candidata es la corriente de potasio del tipo "D" (Storm, 1987; Wu et al, 1992; 1994). Esta corriente, de tipo rectificador sostenido, además de su alta sensibilidad al bloqueo por 4-AP ( $IC_{50} = 100 \mu M$ ) y su relativamente alto umbral de activación ( $\sim -50$  o  $-40$  mV), es inhibida selectivamente por la dendrotoxina (DTX) a bajas concentraciones ( $IC_{50} = 1 \mu M$ ).

La figura 31 resume los resultados de un experimento encaminado a examinar la posibilidad de que una parte del componente sostenido encontrado en las neuronas del GP y descrito en el párrafo anterior, sea una corriente de tipo "D". Como puede observarse, el componente sensible a DTX (panel *E*) tiene características cinéticas muy similares a la corriente que se bloquea por 4-AP (Figura 30 panel *E*). Esto sugiere que la concentración de 4-AP capaz de inhibir a las corrientes que probablemente sean producto de genes de la subfamilia Kv3, podría estar también bloqueando a una corriente de potasio altamente sensible a DTX en las células del GP.

El efecto poco selectivo de la 4-AP en éstas células nos llevó a descartarla como un agente farmacológico útil para diseccionar las corrientes de interés de este estudio.

Como se mencionó anteriormente, experimentos previos de hibridización *in situ* e inmunohistoquímica (Rudy et al, 1992; Weiser et al, 1994, 1995) indicaron que las neuronas del GP expresan somáticamente canales de potasio codificados por transcritos Kv3.1 y Kv3.2. De ser así, postulamos que la corriente  $I_{GP,TEA}$

correspondería a la fracción de la corriente de potasio nativa que fluye a través de canales Kv3.1 y/o Kv3.2. Suponiendo que las subunidades nativas forman única o mayoritariamente canales homomultiméricos, cabría esperar que la cinética de activación y desactivación de las corrientes transportadas por canales Kv3.1, Kv3.2 en células CHO y la corriente  $I_{GP,TEA}$  en las neuronas del GP, fuesen muy similares.



**Figura 31.** Efecto del TEA y DTX sobre las corrientes de potasio de una célula de tipo A. Los paneles A, B y C corresponden a la familia de trazos de corriente obtenidos en una célula del GP tipo "A" control, en presencia de 1 mM de TEA y la corriente sensible a TEA obtenida por substracción digital, respectivamente. El panel D representa la familia de trazos de corriente obtenidos en presencia de 1 mM de TEA y 2  $\mu$ M de DTX. En E se muestra la corriente sensible a DTX obtenida mediante substracción digital.

## Comparación de las corrientes Kv3 clonadas con las supuestas nativas en neuronas del GP.

En la figura 32 se comparan las familias de corriente, obtenidas con idénticos protocolos de pulsos, en células CHO transfectadas con transcritos de Kv3.1 y Kv3.2 (paneles **A** y **B**, respectivamente) y la corriente sensible al TEA ( $I_{GP,TEA}$ ), en una neurona del GP tipo A (panel **C**). Aparentemente la velocidad de activación es similar entre ellas. En los paneles **D**, **E**, **F** y **G** se muestran superpuestos y normalizados los primeros 200 ms de los trazos de corriente tomados de los paneles **A**, **B** y **C** correspondientes a los escalones de voltaje que se indican en la parte superior de cada trazo. De esta comparación se desprende que los tres grupos de familias de corrientes tienen cinéticas de activación muy similares entre sí. Una forma de caracterizar la cinética de activación, es determinar, la cantidad de tiempo que requieren estas corrientes para pasar del 10% al 90% de su amplitud máxima ("Rising time" o Tiempo de ascenso). De acuerdo con este criterio, las corrientes son también muy similares ( $Kv3.1 = 25.2 \pm 0.3$  ms;  $Kv3.2 = 28.2 \pm 0.8$  ms;  $I_{GP,TEA} = 37.8 \pm 0.9$  ms a +40 mV ( $n = 4$ )).

En la figura 33 se examina con más detalle la cinética de las colas de corriente que se registran bajo las diferentes condiciones en las neuronas del GP de tipo "A". El panel **A** representa las colas de corriente producto de repolarizar el potencial de membrana de +40 mV a -40 mV extraída de la familia de trazos de corriente mostrados en la figura 32. Dicha cola de corriente se ajusta a una función que es la suma de dos exponenciales ( $f[x] = Ae^{-x/\tau_1} + Be^{-x/\tau_2}$ ). El proceso de deactivación consta de dos componentes con constantes de tiempo rápida ( $t = 1.78 \pm 0.13$  ms) y lenta ( $t = 21.8 \pm 0.48$  ms;  $n = 4$ ), respectivamente. En **B** se muestra la misma cola de corriente luego de exponer a la célula a 1 mM de TEA. En este caso, la deactivación de la corriente resistente al TEA puede ajustarse a una exponencial simple con una constante de tiempo de  $28.8 \pm 0.23$  ms. En **C** se presenta el resultado de restar digitalmente el ajuste exponencial de la corriente

resistente al TEA (línea continua en la figura B) del registro control de la figura A. Mediante este procedimiento se intenta separar ("Peeling Off") del registro original, el componente de corriente que desaparece en presencia del TEA. Al producto de esta resta (línea continua en C) puede ajustársele una exponencial simple con una constante de tiempo de  $2.27 \pm 0.34$  ms ( $n = 4$ ). Se encuentra superpuesta con la resta punto a punto de los trazos experimentales. Este experimento ilustra claramente que el TEA bloquea selectivamente al componente de corriente inicial de la cinética de deactivación rápida ( $I_{GP,TEA}$ ) respetando al componente de deactivación mas lenta (compárense las constantes de deactivación obtenidos aquí con los medidos en la figura 29).

En el panel D se grafica la constante de tiempo de deactivación de la corriente sensible al TEA (obtenida del "peeling off") Vs el potencial alcanzado al repolarizar la membrana. La cinética de deactivación de la corriente  $I_{GP,TEA}$  es fuertemente dependiente del voltaje, tendiendo un valor mínimo cercano a los 0.4 ms para potenciales más negativos que -80 mV.

La comparación directa de la deactivación en las tres familias de trazos de corriente (Kv3.1, Kv3.2 y  $I_{GP,TEA}$ ) se muestra en el panel E. Ahí aparecen, superpuestos y normalizados, los últimos 100 ms de los trazos de corriente obtenidos durante el escalón de voltaje a +40 mV previo a la repolarización al potencial de mantenimiento de -40mV. Aunque la cinética de deactivación de la corriente es superficialmente similar entre los tres registros representativos, un examen más cuidadoso muestra, como ya se había mencionado, que los canales Kv3.1 se desactivan más rápidamente que los Kv3.2. La cola de corriente de  $I_{GP,TEA}$  registrada en las células de tipo A, aunque parecida a la de Kv3.2, posee una constante de tiempo de deactivación intermedia (CHO Kv3.1 =  $1.71 \pm 0.11$  ms; CHO Kv3.2 =  $5.41 \pm 0.34$  ms;  $I_{GP,TEA}$  =  $3.68 \pm 0.26$  ms,  $n = 3$ ).

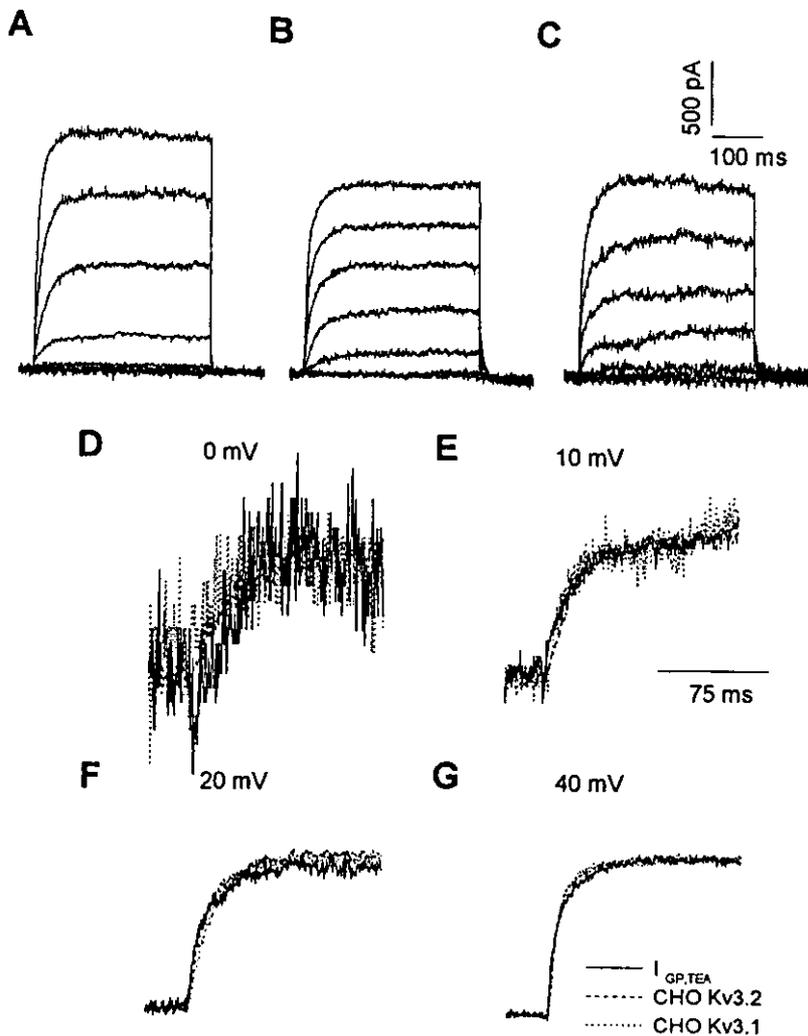
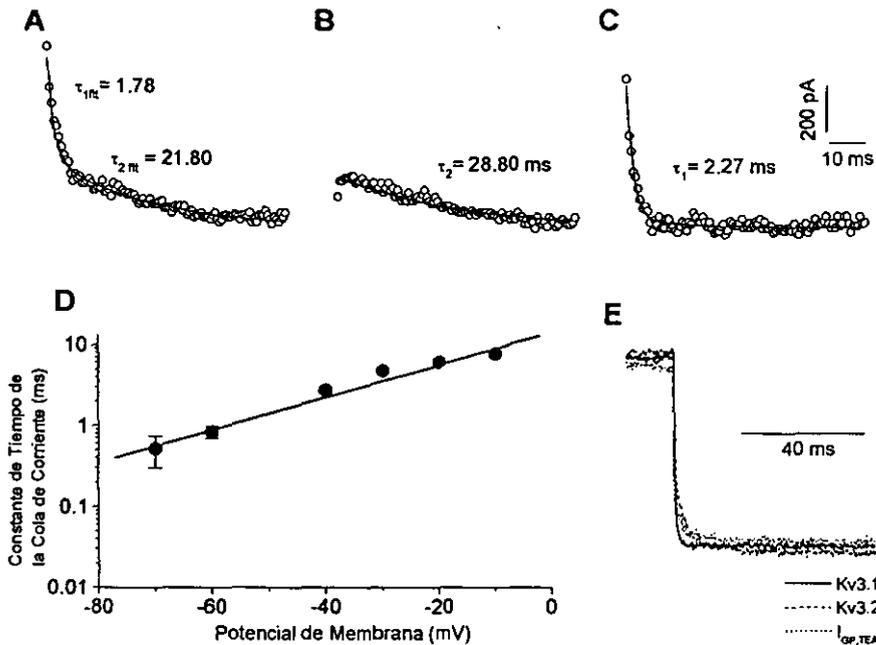


Figura 32. Comparación de las corrientes Kv3 clonadas con las corrientes nativas en neuronas del GP. En los paneles **A**, **B** y **C** se encuentran las familias de corrientes producidas por el mismo protocolo de pulsos despolarizantes (ver metodos) en células CHO transfectadas con transcritos Kv3.1, Kv3.2 y en células del globo pálido tipo A. Observense las aparentes diferencias en la velocidad de deactivación en cada caso. En **D**, **E**, **F** y **G** Se muestran superpuestos y normalizados los primeros 200 ms de los trazos de corriente tomados de los trazos de corriente de los paneles superiores y correspondientes a los escalones de voltaje que se indican en la parte superior de cada trazo. Los valores del tiempo necesario requerido por estas corrientes para pasar del 10% al 90% de su amplitud máxima se encuentran en el texto.



**Figura 33.** Análisis de la cinética de las colas de corriente registradas en las neuronas del GP de tipo "A". Los paneles **A**, **B** y **C** representan las colas de corriente producto de repolarizar el potencial de membrana de +40 mV a -40 mV. **A**, Control; **B**, Resistente a 1 mM de TEA; **C**, Producto de la resta digital del ajuste exponencial de la corriente resistente al TEA (línea continua en la figura **B**) del registro control de la figura **A** (peeling off). En **D**: se grafica la constante de tiempo de deactivación de la corriente sensible al TEA (obtenida del "peeling off") vs el potencial alcanzado al repolarizar la membrana. La comparación directa de la deactivación en las tres familias de trazos de corriente (Kv3.1, Kv3.2 e  $I_{GP,TEA}$ ) se muestra en el panel **E**. Aparecen, superpuestos y normalizados, los últimos 100 ms de los trazos de corriente obtenidos durante el escalón de voltaje a +40 mV previo a la repolarización al potencial de mantenimiento de -40mV. Para detalles ver texto.

Puede concluirse entonces, que las tres corrientes que se compararon son muy similares entre sí son respecto al proceso de activación. En cuanto a la cinética de deactivación, a las tres se les pueden ajustar constantes de tiempo rápidas (<5 ms). De ellas, Kv3.1 es un poco más rápida de Kv3.2, en tanto que la corriente  $I_{GP,TEA}$  presenta un valor intermedio. De esta conclusión se desprende que  $I_{GP,TEA}$  reúne un buen número de propiedades comunes a los canales Kv3.1 y Kv3.2 observadas en las células CHO trasfectadas.

## Corrientes de potasio registradas en las Neuronas del GP de tipo "B".

En este grupo de células, menos abundantes que las tipo "A", caracterizadas por poseer somas grandes, multipolares con 5 o más dendritas (figura 26), el protocolo de pulsos aplicado desde un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV produjo corrientes de potasio de tipo rectificador retardado, como las que se ilustran en el panel A de la figura 34. La cinética de activación de las corrientes registradas en estas células suele ser más rápida que aquella registrada en las células del tipo "A" o en las células CHO transfectadas con transcritos de Kv3.1 o Kv3.2 (Tiempo de ascenso  $t_{on} = 14.0 \pm 1.2$  ms,  $n=3$ . Compárese con las corrientes de tipo A). Asimismo, estas corrientes mostraron una constante de tiempo de deactivación relativamente lenta ( $\tau = 25.86 \pm 1.17$  ms luego de un pulso a  $+40$  mV;  $n = 4$ ). Después de la aplicación de 1 mM de TEA, las corrientes sostenidas se inhibieron aproximadamente en un 15% como se ejemplifica en el panel B a diferencia de lo observado en las células tipo "A" donde la aplicación de TEA inhibió el 50% de la corriente total aproximadamente.

La corriente resistente a TEA presentó una cinética de activación más lenta que la control ( $t_{on} = 22.4 \pm 2.5$  ms,  $n=3$ ) y la constante de tiempo de la deactivación fue también más lenta ( $\tau = 35.38 \pm 1.10$  ms) luego de un pulso a  $+40$  mV ( $n = 4$ ). Sorprendentemente, se encontró que en la mayoría de las células de tipo "B", el componente de corriente sensible a TEA ( $I_{GP,TEA}$ , panel C) obtenido por la substracción digital de los trazos en A y B, estuvo compuesto predominantemente por una corriente que se activa y se inactiva rápidamente ( $t_{on} I_{GP,TEA} = 1.8 \pm 0.4$  ms;  $t_{inac} I_{GP,TEA} = 11.1 \pm 3.0$  ms, como una exponencial simple a  $+60$  mV.  $n = 3$ , respectivamente). Además del componente rápido transitorio, la corriente  $I_{GP,TEA}$  de las células de tipo "B" incluyó también a un componente de tipo rectificador retardado sostenido de amplitud variable.

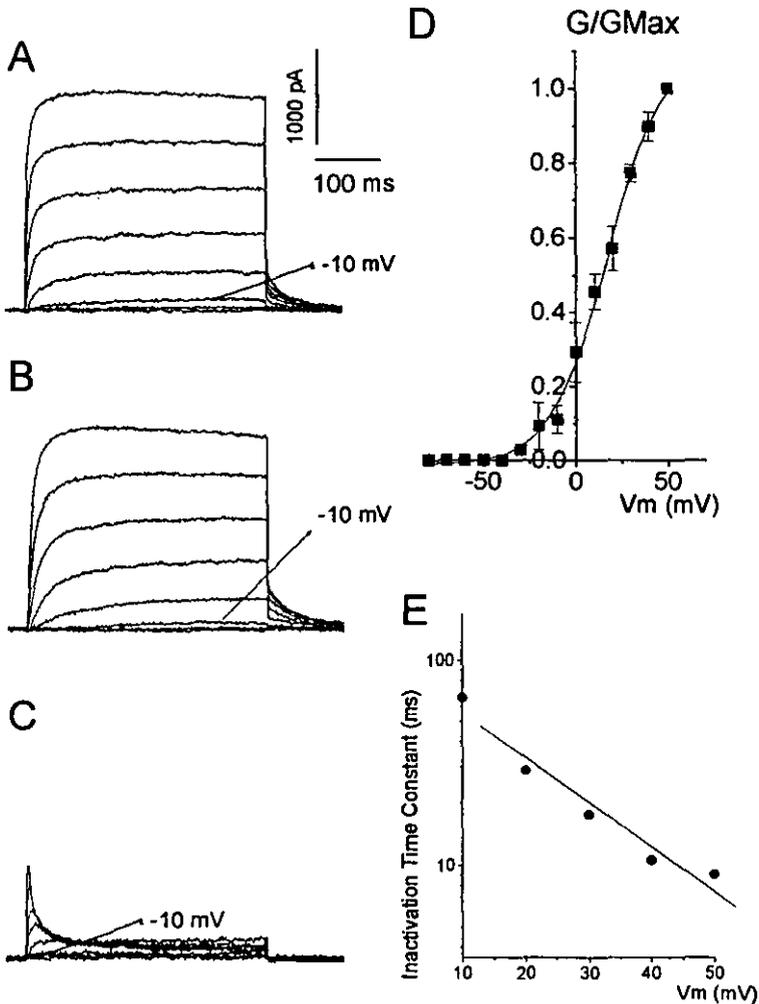
En general, la magnitud del componente sostenido de la corriente  $I_{GP,TEA}$  que se registró en las células de tipo "B" fue siempre menor que el componente inactivante y mucho menor que la corriente sostenida que se registra en las

células de tipo "A". Estas proporciones variaron significativamente de una célula a otra.

Aquí cabe preguntarse: ¿es posible que la corriente inactivante sensible al TEA que se encontró en las neuronas del GP de tipo "B" fuese también un producto de la actividad de canales codificados por transcritos de las subfamilia Kv3?

Una forma de responder a esta pregunta es examinando la dependencia del voltaje y la cinética de este componente de corriente. En el panel *D* se graficó, la conductancia normalizada ( $G/G_{max}$ ) en función del voltaje para la corriente transitoria rápida (medida al pico de corriente). Con línea continua se encuentra el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Boltzmann. Como puede verse, la corriente transitoria sensible al TEA tiene un alto umbral de activación ( $\sim$  20 mV) y los valores de los parámetros  $V_{1/2}$  y  $k$  que resultan del ajuste de la ecuación de Boltzmann ( $15.47 \pm 0.5$  mV y  $14.34 \pm 1.0$  mV, respectivamente;  $n=4$ ), son muy similares a los obtenidos para las corrientes Kv3.1 y Kv3.2 expresadas en células CHO (figura 22 paneles *E* y *F*) o para la corriente  $I_{GP,TEA}$  registrada en las neuronas del GP de tipo "A" (figura 29 panel *D*).

En panel *E* se graficó el valor de la constante de tiempo de la inactivación de esta corriente en función del potencial durante el pulso despolarizante. Claramente, la inactivación es fuertemente dependiente del voltaje, acelerándose a medida que la despolarización aumenta.



**Figura 34.** Características de las corrientes obtenidas en las células tipo B del GP de la rata. Registros típicos de corrientes de potasio obtenidos en una célula de tipo B. **A**, control; **B**, corriente resistente al TEA y **C**, corrientes sensibles a 1mM de TEA. En todos los casos se partió de un potencial de mantenimiento de  $-40$  mV, el primer pulso se aplicó a  $-30$  mV alcanzando un nivel máximo de  $+50$  mV.

En estas células la dosis mencionada de TEA bloqueó una corriente transitoria similar a la expresada por los transcritos Kv3.3 o Kv3.4 en los ovocitos de *Xenopus*. En lo que respecta a la corriente resistente a 1mM de TEA, esta mostró las características de un rectificador sostenido con deactivación lenta que representó aproximadamente el 85 o 90% de la corriente control inicial. La corriente sensible al TEA esta compuesta predominantemente por una corriente que se activa rápidamente y que presenta una marcada inactivación. **D**: Curva de conductancia máxima. Se muestra la curva de activación para  $I_{CP,TEA}$  ( $n=4$ ) medida al pico. El umbral de activación se ubica entre los  $-15$  y  $-10$  mV. Los cuadros representan los valores experimentales, la línea al mejor ajuste a la función de Boltzman. **E**: Se muestra la dependencia del voltaje de la inactivación de la corriente  $I_{CP,TEA}$ . La línea representa el ajuste lineal de los datos experimentales mostrados en círculos llenos.

Un criterio adicional para identificar corrientes mediadas por canales Kv3 es la cinética de deactivación. La pregunta que surge entonces es: ¿La cinética de deactivación de la corriente inactivante rápida presente en las células de tipo B es rápida?

Para estudiar esto, se recurrió a un protocolo que consistió en aplicar un prepulso de voltaje partiendo desde  $-40$  hasta  $+50$  mV (el cual activa eficazmente la corriente inicial) durante 3 ms, tiempo suficiente para que la corriente transitoria alcanzara el pico máximo de la corriente transitoria. Posteriormente se aplicaba un pulso de prueba hiperpolarizando la célula hasta  $-100$  mV y regresando entonces a  $-30$  mV en incrementos de 10 mV cada vez. La duración total del ciclo fué de 50 ms.

Un ejemplo de las corrientes sensibles a TEA en las células tipo "B" obtenidas como en casos anteriores y mediante este protocolo se muestran en la figura 35. Los registros muestran claramente el curso temporal de la activación y parte de la inactivación de la corriente transitoria inicial. Aunque la corriente ya había comenzado a inactivarse cuando terminó el pulso condicionante, aún permanece una fracción de suficiente amplitud para examinar la cinética de las colas de corriente. Nótese que las colas de corriente obtenidas en los trazos control, tienen un curso temporal relativamente lento ( $10.64 \pm 1.7$  ms a  $+40$  mV,  $n=3$ ). Después de la aplicación de 1 mM de TEA, la amplitud de las corrientes registradas se reduce y la cinética de activación se enlentece. Las colas de corriente en estas condiciones también se enlentecen:  $t_{inac} = 14.66 \pm 3.4$  ms a  $+40$  mV ( $n=3$ ). En cambio, los registros de corriente sensible a TEA, obtenidos mediante la resta digital de los trazos en **A** de los trazos en **B**, muestran claramente el curso temporal de la activación y parte de la inactivación de la corriente transitoria inicial. Las colas de corriente resultaron ser bastante más rápidas (panel **C**,  $4.39 \pm 1.4$  ms a  $+40$  mV,  $n=3$ ). En la figura 36 se graficó la dependencia del voltaje de la constante de tiempo de deactivación para la corriente que se registra en condiciones control (cuadros) y para las corrientes sensibles al TEA (círculos). Como puede observarse, la deactivación en

condiciones control tiene una menor dependencia del voltaje que la corriente sensible a TEA. A potenciales muy hiperpolarizados, las constantes de tiempo de deactivación se aproximan a valores cada vez menos dependientes del voltaje.

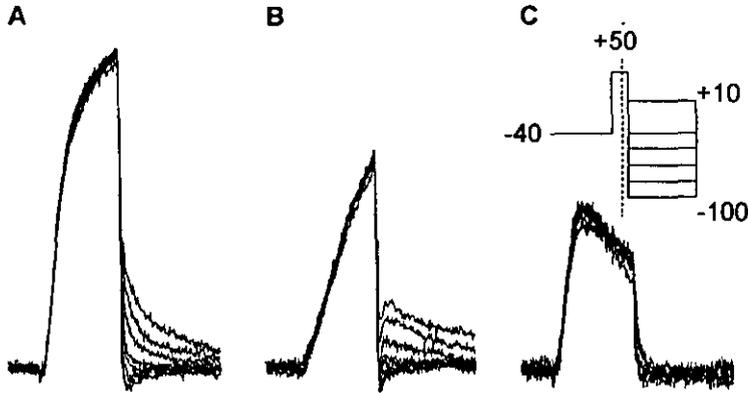


Figura 35. Deactivación de la corriente transitoria. A, control; B, corrientes resistentes a 1mM de TEA y C, corriente sensible a 1mM TEA. En el inserto se muestra el protocolo empleado para determinar los parámetros cinéticos de la inactivación de la corriente transitoria. Los trazos mostrados corresponden a la substracción digital de los protocolos de corriente mostrados en el inserto antes y después de la aplicación de 1mM de TEA. El potencial postpulso varió de  $-100$  a  $+10$ mV durante 20 milisegundos en incrementos de 10 mV muestreados a una velocidad de 200 kHz. Antes del pulso de prueba la velocidad de muestreo fue de 2 kHz. La línea punteada representa el momento en el cual cambió la velocidad de muestreo. La velocidad de deactivación de la corriente transitoria fue muy rápida:  $\tau_{deac}$  a  $+40$  mV =  $4.39 \pm 1.4$  ms,  $n = 3$ .

La corriente transitoria inicial que se registra en las neuronas de tipo "B" tiene al menos tres características comunes con las corrientes expresadas en sistemas heterólogos transfectados con transcritos de la subfamilia Kv3: 1) Se bloquea por TEA a bajas concentraciones, 2) Posee un alto umbral de activación y, 3) Posee colas de corriente rápidas. Basados en estos datos y en las propiedades cinéticas de las corrientes encontradas en estos últimos experimentos, es posible proponer que las células del GP de tipo "B" expresan una corriente de potasio dependiente del voltaje producida por la actividad de canales formados por subunidades codificadas por transcritos Kv3. De confirmarse, este inesperado resultado sería sorprendentemente dado que estudios previos

utilizando hibridación *in situ* revelaron niveles muy bajos de expresión de los RNA's mensajeros para las proteínas Kv3 con características inactivantes (Kv3.3 y Kv3.4) en el sistema nervioso central de la rata. Por otro lado, el GP no parece ser uno de los núcleos que expresan estos transcritos en forma más abundante.

Los resultados de las propiedades biofísicas encontradas en este trabajo para las corrientes Kv3.1 y Kv3.2 expresadas en células CHO así como para sus posibles homólogos nativos en las células del GP se resumen en la tabla 8.

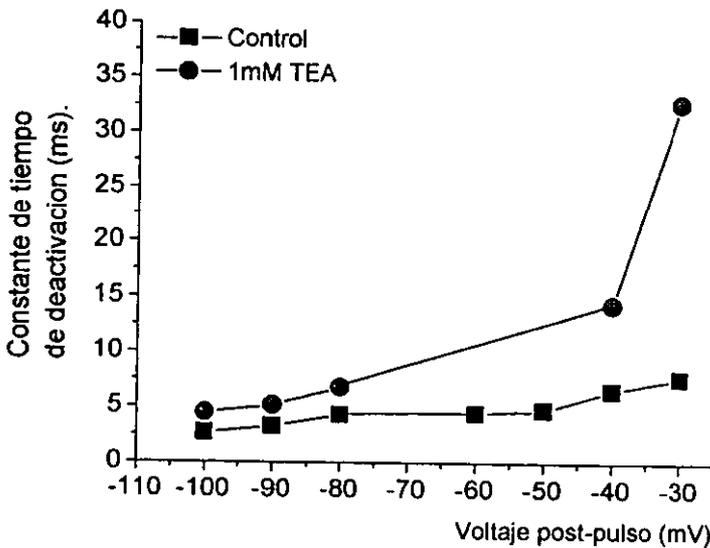


Figura 36. Dependencia del voltaje de la corriente transitoria identificada en las células tipo B del globo pálido. Para detalles ver texto.

Tabla 8.

PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS CORRIENTES KV3 Y  $I_{GP-TEA}$  EN LAS NEURONAS PALIDALES TIPO A Y B.

	Activación					
	$V_{on}$ , mV	$V^{1/2}$ , mV	$k$ , mV	$t_{on}$ , ms	$t_{off}$ , ms	$t_{inactivación}$ , ms
Kv3.1 <sup>1</sup>	-20 a -10	18.1	11.0	3.4	2.5	ND
Kv3.2 <sup>1</sup>	-20 a -10	12.1	8.4	4.0	5.0	ND
Kv3.3 <sup>2</sup>	-20 a -10	15.4	14.3	4.0	ND	11.1
Kv3.4 <sup>2</sup>	-20 a -10	14.0	8.5	4.0	ND	19.9
$I_{GP-TEA}$ (A) <sup>1</sup>	-20 a -10	16.9	10.6	4.2	3.6	ND
$I_{GP-TEA}$ (B) <sup>1</sup>	-20 a -10	15.5	14.3	3.6		15.0

1. Este trabajo

2. Rudy et al, 1999.

Todos los registros fueron realizadas a temperatura ambiente.  $V_{on}$ , voltaje mínimo al cual la activación de la corriente es significativa;  $V^{1/2}$ , potencial de membrana al cual la conductancia es la mitad del máximo;  $k$ , pendiente de la curva  $G/G_{max}$  normalizada, Voltaje necesario para producir un incremento de  $e$  veces en la conductancia;  $t_{on}$ , tiempo necesario para que la corriente se incremente del 10 al 90% de su valor máximo en corrientes de tipo no inactivante. En corrientes inactivantes representa el tiempo al pico, ambos a +40 mV;  $t_{off}$ , constante de tiempo de la deactivación a un voltaje de -40 mV;  $t_{inactivación}$ , constante de tiempo de la inactivación a +40 mV; ND, no determinado.

## Identificación de las corrientes Kv3.1 y Kv3.2.

Con el objeto de obtener más evidencias sobre la posible identidad de las corrientes aisladas en las células dissociadas del GP de la rata, se realizó un grupo de experimentos utilizando AMPc y un éster de forbol (PMA) como criterios de identificación específica para las corrientes Kv3.2 y Kv3.1 respectivamente.

Al respecto, experimentos anteriores (Covarrubias et al, 1992, 1994; Drain et al, 1994; Moreno et al, 1995) han mostrado que todas las proteínas pertenecientes a la familia *Shaker* poseen al menos uno o dos sitios consenso para fosforilación

por proteína-quinasas C (PKC, S/T-X-A/L) y para proteína-quina A (RPSFDAILY), en el conector citoplásmico entre los segmentos S4 y S5 una región constitutiva del poro de permeación (Kemp y Person, 1990; Isacoff et al, 1990; Isacoff et al, 1991; Jan y Jan, 1992; Durrel y Guy, 1992) y en el extremo N terminal respectivamente (Vega-Saenz de Miera, et al, 1994). Estas secuencias están presentes en todos los transcritos Kv3 reportados hasta el momento y en algunos casos, existe evidencia de su posible papel fisiológico: los estéres de forbol, que pueden activar directamente a la PKC, suprimen la actividad de los canales Kv1.3 en ovocitos de *Xenopus* y en células T-Jurkat. Efectos que son eliminados por inhibidores de la PKC (Attali et al, 1992<sup>a</sup>; Payet y Dupuis, 1992; Aiyar et al, 1993b). Resultados similares han sido reportados en canales de tipo Kv3.1 (Critz et al, 1993), Kv1.4 (Fahrig et al, 1992); Kv4.2 (Blair et al, 1992) y en canales Kv3 (Moran et al., 1991; Moreno et al, 1995).

En la figura 37 se muestran los resultados de la exposición a PMA (20 nM) y AMPc (2 mM) en las células CHO trasfectadas con canales Kv3.1 y Kv3.2.

La exposición a AMPc y PMA produjo en las células CHO trasfectadas con los transcritos de los canales Kv3.2 y Kv3.1 una reducción en la corriente máxima de  $43.89 \pm 4.61\%$  ( $n = 3$ ) y de  $47.50 \pm 7.65\%$  ( $n = 3$ ) respectivamente. En ningún caso se observó inhibición alguna de los canales Kv3.1 por la exposición al AMPc como tampoco se observó inhibición de los canales Kv3.2 en presencia de PMA (datos no mostrados).

Los resultados de la aplicación de estas drogas en las células del GP se muestran en la figura 38. El AMPc produjo una reducción de  $35.84 \pm 6.87\%$  ( $n = 3$ ) de la corriente total observada en el control, mientras que en el segundo caso, el PMA redujo en un  $16.00 \pm 4.42\%$  la corriente máxima. La aplicación de ambas drogas, en las concentraciones ya mencionadas, a una misma célula redujo la corriente total en un  $38.14 \pm 9.87\%$  (dato no mostrado).

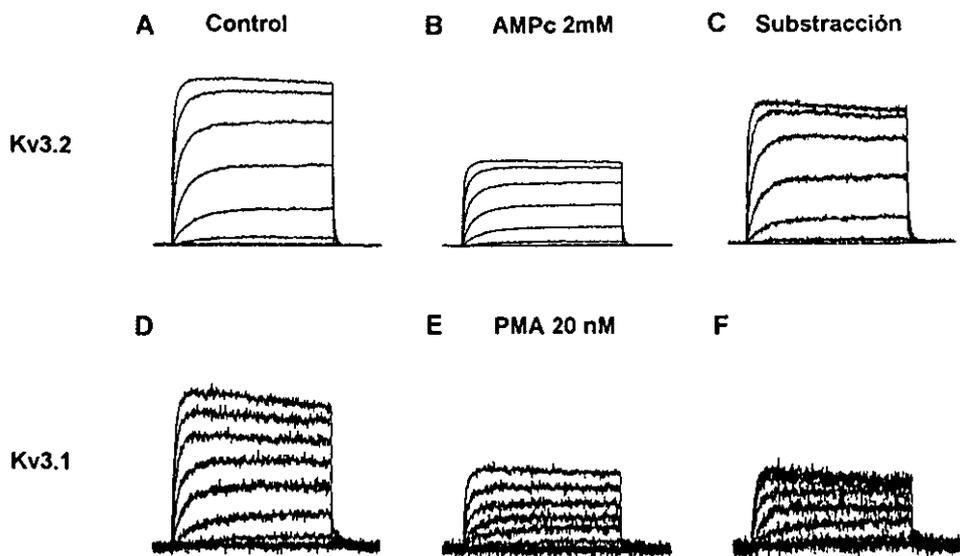


Figura 37. Efecto del AMPc y del PMA en las células CHO transfectadas con los transcritos Kv3.2 y Kv3.1. A y D: Control, Kv3.1 y Kv3.2 respectivamente, B y E: Corrientes resistentes a AMPc (2 mM) y a PMA(20 nM) respectivamente. C y F: Corrientes sensibles. Para detalles ver texto.

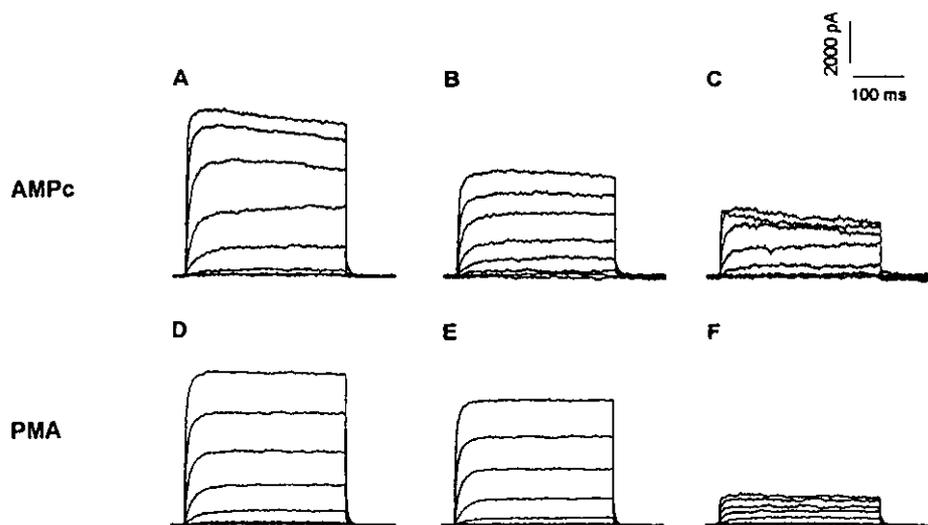


Figura 38. Efecto del AMPc y del PMA en las células del globo pálido de la rata. A y D: Control, B y E: Corrientes resistentes a AMPc (2 mM) y E: hacia PMA(20 nM) respectivamente. C y F: Corrientes sensibles. Para detalles ver texto.

## EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN DE CORRIENTES KV3 POR EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS DOMINANTES NEGATIVOS.

Un segundo acercamiento para intentar la identificación específica de las corrientes aisladas en las células disociadas del GP se realizó mediante la transfección de un constructo dominante negativo unido a la proteína fluorescente verde (GFP, Moreno et al, 1995). La idea principal de esta serie de experimentos radicó en inducir la sobre-expresión de una subunidad Kv3 truncada en la región H5 (figura 39). Los canales resultantes en su forma homomultimérica, serían incapaces de conducir corriente alguna. Debido a la capacidad de esta subfamilia para formar canales heteromultiméricos y con base en las observaciones de McKinnon y colaboradores (revisadas en Pongs, 1995), en las que una sola subunidad basta para modificar las características biofísicas de la proteína funcional tetramérica, se esperaba que la sobreexpresión de este dominante negativo compitiera con las subunidades normales en la formación de los canales iónicos normales y poco a poco fuera capaz de ir formando proteínas "defectuosas" incapaces de conducir corriente, eliminando así cualquier componente de corriente Kv3 en las células del GP de la rata en cultivo.

En la figura 40 se muestran fotografías de neuronas transfectadas con el constructo del dominante negativo mas la proteína fluorescente verde.

Los resultados se resumen en la figura 41.

En los paneles superiores se encuentran las familias de curvas de corriente obtenidas en una célula 36 horas después de haber sido transfectadas con el constructo dominante negativo. En **A** se encuentra el control, en **B** la corriente resistente a 1 mM de TEA y en **C** la corriente sensible a TEA obtenida mediante substracción digital de las dos primeras. El porcentaje aparente de corriente sensible al TEA no es diferente al obtenido en las células no transfectadas (comparar con los registros mostrados en la figura 29). En la gráfica inferior (panel **D**) se muestra en barras con error estándar, la densidad de la corriente sensible a 1 mM de TEA contra las horas postransfección. Los resultados se discuten más adelante.

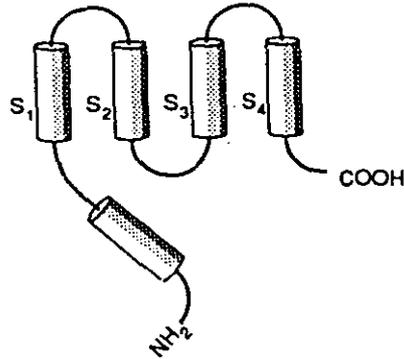


Figura 39. Constructo dominante negativo. En la parte superior se muestra un esquema del constructo dominante negativo empleado en algunas transfecciones realizadas en neuronas del GP de la rata. En todos los casos en donde ésta subunidad fue incorporada a la estructura tetramérica de un canal de potasio, el resultante fue incapaz de conducir corriente alguna.

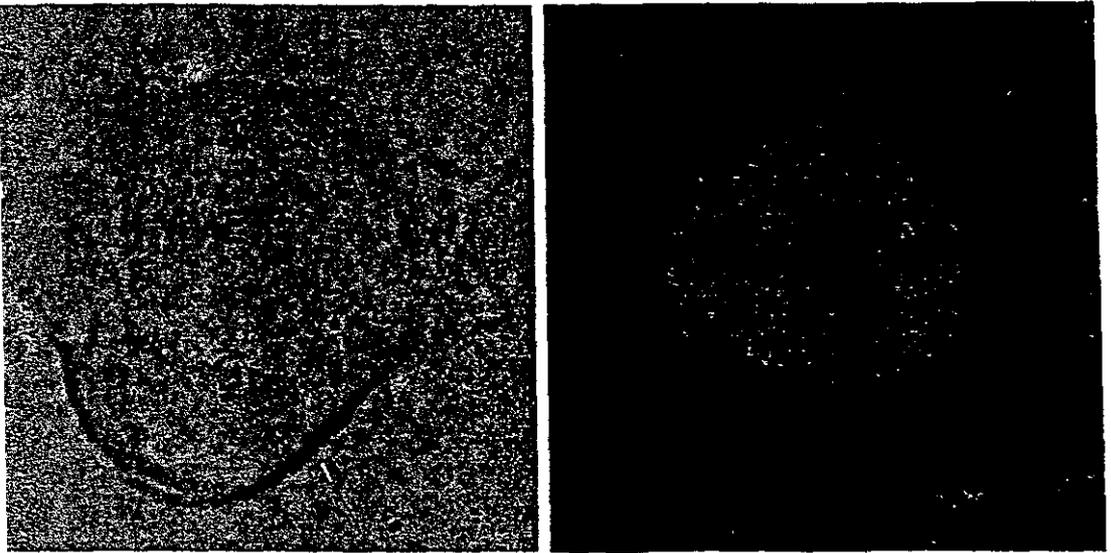


Figura 40. Microfotografías de las células del GP mantenidas en cultivo durante 36 y transfectadas con un constructo dominante negativo y GFP. En la columna A se muestran las mismas células fluorescentes que en B pero bajo microscopía de campo claro. Las células fluorescentes incorporaron eficientemente el constructo y supuestamente expresaron las subunidades truncadas. La barra de calibración equivale a 20 micrómetros.

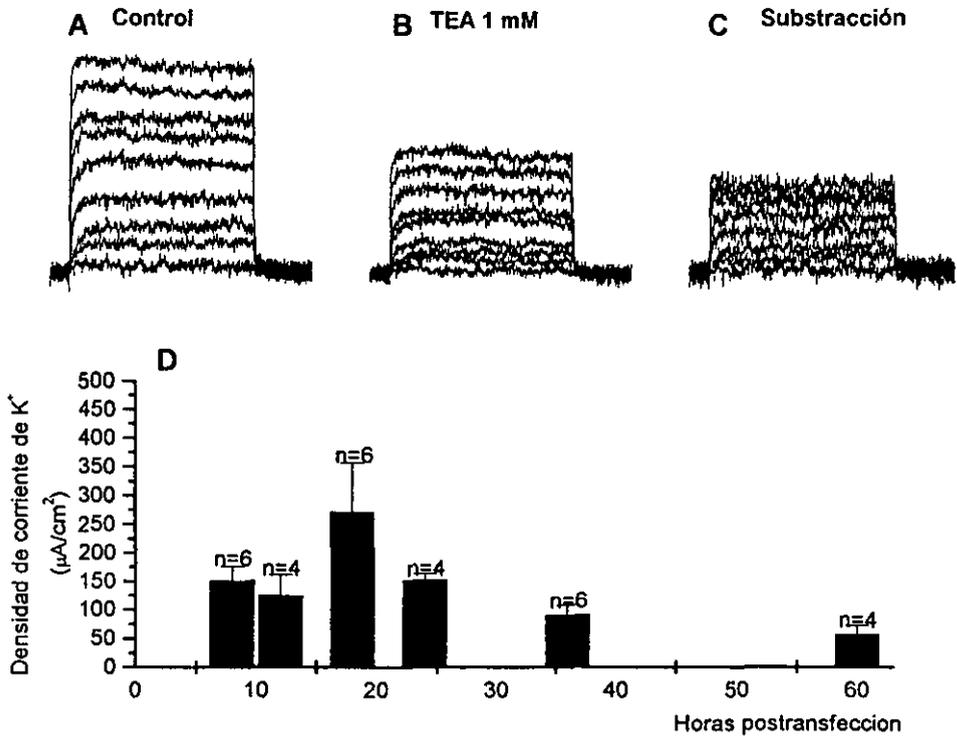


Figura 41. Inhibición por un constructo dominante negativo de las corrientes Kv3 existentes en las células del globo pálido de la rata 36 horas post-transfección. **A:** Control, **B:** Corriente resistente a 1 mM de TEA, **C:** Corriente sensible a TEA obtenida por substracción digital de **A** menos **B**. En el panel **D** se muestra graficado con barras de error estándar la densidad de corriente contra las horas post-transfección.

## Reacción en Cadena con Polimerasa y reverso transcriptasa en Célula Unica.

Debido a la falta de anticuerpos específicos contra las proteínas Kv3.3 y Kv3.4, empleamos RT-PCR para identificar y en su caso confirmar la presencia de estos transcritos además de los generados por los genes Kv3.1 y Kv3.2 en los dos principales tipos celulares del globo pálido de la rata descritos en este trabajo.

En la figura 42 se muestran los resultados de esta serie de experimentos.

Los estudios revelan que los transcritos Kv3.2 son los más abundantes, encontrándoseles en la mayoría de las células tipo A (81%) y en algunas células tipo B (64%). El transcrito Kv3.1 se encuentra principalmente en las células tipo A (85%) al igual que el transcrito Kv3.3. En lo que respecta al transcrito Kv3.4, este se encuentra únicamente en las células tipo B. En ningún caso se observaron bandas accesorias. Para comprobar la identidad de los productos obtenidos, se tomo una banda al azar de cada uno de los transcritos amplificados y se envió a secuenciar al Servicio de Biología Molecular de NYUMC, quien confirmo la especificidad de la reacción (datos no mostrados).

Los resultados de esta serie de experimentos se resumen en la tabla 9 donde la existencia relativa de los transcritos Kv3 se indica mediante asteriscos.

**Tabla 9**

**Reacción en Cadena con Polimerasa en Células Unicas de Globo**

**Pálido**

TIPOS CELULARES	Kv3.1	Kv3.2	Kv3.3	Kv3.4
<b>Bipolares</b>	***	***	***	
<b>Triangulares</b>	***	***	***	
<b>Tipo B</b>		*	*	****

\*\*\*\* Presente en el 100 % de la población celular total examinada.

\*\*\* Presente entre el 65% y el 85% de la población celular total examinada.

\*\* Presente en el 50% de la población celular total examinada.

\* Presente en menos del 25% de la población celular total examinada.

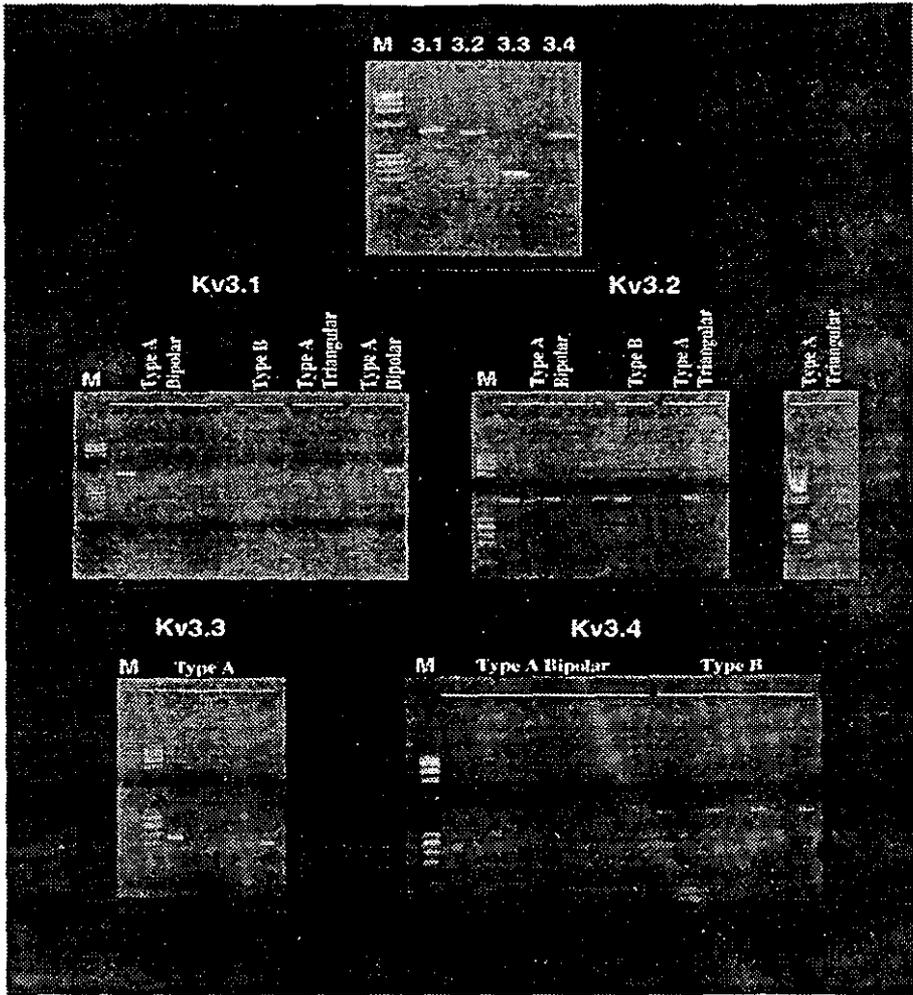


Figura 45. Reverso Transcriptasa y Reacción en Cadena mediada por Polimerasa en células únicas del GP de la rata. Los productos amplificados al utilizar el cDNA específico para cada uno de los cuatro diferentes miembros de la familia Kv3 como templado se muestran en el panel A. En cada caso, en la primer columna (M) se muestra el marcador de peso molecular ( $\phi$ X174 cortado con Hae III, lo que nos da un rango de bandas desde 72 hasta 1,353 pares de bases, Promega Co. Madison, WI). Cada producto tiene un peso molecular particular lo que facilita su identificación cuando son analizados mediante electroforesis en gel (Kv3.1 = 440, Kv3.2 = 447, Kv3.3 = 209 y Kv3.4 = 459). En los paneles B-E se encuentran las bandas amplificadas en varias células tipo A y tipo B para cada uno de los diferentes transcritos. En la parte superior de cada fotografía se indica el transcrito particular (B: Kv3.1, C: Kv3.2, D: Kv3.3 y E: Kv3.4), la barra blanca marcada arriba de los pozos corresponde al total de células de cada tipo empleadas en los experimentos mostrados. Cada carril corresponde a una sola célula.

## DISCUSION.

Los transcritos de los genes Kv3 son un buen punto para empezar a investigar la relación entre los múltiples canales que han sido clonados hasta el momento y los canales nativos, entre otras cosas por sus particulares características electrofisiológicas, farmacológicas y porque la evolución de los genes Kv3 parece haber sido distinta a la evolución de otros miembros de la superfamilia de canales de potasio dependientes de voltaje descritos hasta el momento.

En general, los productos Kv mamíferos son más similares hacia alguno de los cuatro genes similares a Kv en *Drosophila* que entre los productos de las diferentes subfamilias en los mamíferos. Lo anterior indica que el gen precursor de cada subfamilia existía ya previamente a la divergencia entre cordados y artrópodos. Así, las proteínas Kv3 son más similares a los productos del gen *Drosophila Shaw* que a ninguna otra proteína de la misma subfamilia en la mosca o en los mamíferos. Más aún, el porcentaje de identidad entre los aminoácidos entre las proteínas *Shaw* y las Kv3 de los mamíferos (49-56%) es significativamente menor que la observada entre los distintos homólogos de la mosca y los mamíferos (70-80%). Significativamente, mientras que las proteínas Kv3 son parecidas con *Shaw* en algunas regiones, son altamente similares con otros miembros de la subfamilia Kv en el dominio S4 y en las secuencias cercanas a dicho segmento.

Funcionalmente las proteínas Kv3 del mamífero difieren considerablemente de los canales *Shaw*.

Cualesquiera que hayan sido los mecanismos que expliquen la evolución de esta subfamilia de canales de potasio dependientes de voltaje, los canales Kv3 parecen ser de reciente adquisición y específicos en la línea de origen de los mamíferos, lo que sugiere que pueden estar siendo usados en propiedades neuronales específicas a dichos organismos.

## **Corrientes Kv3.1b y Kv3.2a Expresadas en un Sistema de Expresión Heterologa de Mamífero (Células CHO).**

Los cDNA's de los transcritos Kv3.1 y Kv3.2 transfectados en células CHO expresaron corrientes de potasio dependientes de voltaje de tipo rectificador sostenido similares a las expresadas en ovocitos de *Xenopus* por estas mismas proteínas (Vega Saenz de Miera et al, 1994; tabla 5). Hasta el momento de terminar este trabajo, no habia sido posible la expresión de los transcritos Kv3.3 y Kv3.4 de manera aislada en ningún sistema de expresión heterólogo.

Los estudios con células de mamífero tienen muchas ventajas sobre el sistema de expresión que utiliza ovocitos de *Xenopus*. Quizá la más importante es la posibilidad de comparartas con aquellas que se registran utilizando los mismos metodos en células nativas. Asimismo, es mas probable que la proteína sea procesada de igual manera en una célula de mamífero que en un ovocito.

Las células CHO sin trasfectar prácticamente carecen de cualquier tipo de corrientes salientes de potasio detectables con los métodos empleados en este trabajo. La pequeñas variaciones que pudieran ser encontradas cuando las distintas corrientes expresadas en células CHO son comparadas con aquellas expresadas en otros sistemas celulares (P. ej. células HEK-293T) pueden ser atribuibles a diferencias menores en las condiciones de registro (Murakoshi et al, 1997). Cabe resaltar que en nuestros experimentos, la contaminación por otras corrientes de potasio de bajo umbral de activación o activadas por calcio es despreciable, dado que las células carecen de cualquier otro tipo de conductancia endogena y debido también a las diversas maniobras empleadas para eliminarlas (vease métodos).

Las corrientes de interés en este trabajo poseen varias características en común que las diferencian de otros rectificadores sostenidos activados por voltaje

descritos con anterioridad, algunas de las cuales se reportan por primera vez en este trabajo (Rudy et al, 1988 <sup>a,b</sup>; Grissmer et al, 1994; Coetzee et al, 1999):

1) Un rango de voltaje de activación mas positivo que ningún otro canal de potasio activado por voltaje conocido. Los canales de potasio con el umbral mas cercano (Kv2.1-2.2) muestran una activación significativa a 10 o 20 milivoltios mas negativos. Ya que la probabilidad de apertura de los canales Kv3 es significativa a potenciales mas positivos que  $-10$  mV, estos canales estan abiertos a potenciales de  $+30$  o  $+40$  milivoltios, como resultado, los puntos medios de la relación entre corriente y voltaje no son diferentes de otros canales de potasio (Coetzee et al, 1999).

2) El tiempo de ascenso de las corrientes Kv3.1 y Kv3.2 es relativamente rápida. Mas rápida que cualquier otro canal activado por el voltaje. De entre la familia Kv3, los canales Kv3.4 son los rápidos.

3) En contraste con otros rectificadores sostenidos, las corrientes Kv3.1 y Kv3.2 no se inactivan significativamente durante los pulsos de despolarización y no exhiben inactivación acumulada (Coetzee et al, 1999).

4) Estos canales poseen una inusual y muy alta velocidad de deactivacion posterior a la repolarización. Esta propiedad fué descrita por primera vez para las corrientes Kv3.1 expresadas en células NIH-3T3 y en L929 por Grissmer y colaboradores en 1994. Ellos encontraron que las corrientes Kv3.1 se deactivan aproximadamente 10 veces más rápido que ningún otras corriente de potasio clonada y expresada hasta el momento. En contraste, las corrientes Kv3.4 deactivan mas lentamente debido a una incapacidad de cerrarse hasta que la inactivación no haya sido removida. Hasta este trabajo se habian considerado a las corrientes Kv3.1 y Kv3.2 como indistinguibles entre sí. Sin embargo en las células CHO es evidente que las corrientes Kv3.2 se deactivan aproximadamente 5 veces más rápido que las Kv3.1.

5) La conductancia unitaria de los canales Kv3 es la mas alta que para ningún otro canal de potasio (Coetzee et al, 1999).

Cabe mencionar que la deactivación rápida es un requisito en aquellos canales involucrados en la generación de un patrón celular de disparo en altas frecuencias (Hille 1992; Johnston y Miu-Siu, 1995; Robertson 1997).

Farmacológicamente, hasta el momento no han sido descritos bloqueadores específicos para los canales Kv3.1 y Kv3.2. Sin embargo, tanto en ovocitos como en los diferentes sistemas heterólogos probados, todas las proteínas Kv3 son extremadamente sensibles a TEA a a 4-AP. Esta sensibilidad puede ser explotada para discriminar entre diferentes corrientes de potasio. Las corrientes Kv3 pueden ser bloqueadas en un 80% por TEA 1 mM. Esta concentración produce una inhibición significativa solamente en esta subfamilia de canales de potasio (Coetzee et al, 1999) incluyendo los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia pertenecientes a la subfamilia Slo, a los canales Kv1.1 y a los KCNQ2 (Coetzee et al, 1999).

Los canales Kv3 también son muy sensibles hacia el 4-AP, sin embargo, los valores reportados de dosis media para esta toxina varia entre los diversos estudios reportados. Estas variaciones pueden estar reflejando, el menos en parte, una cinética compleja de unión a la proteína en diferentes estados (Coetzee et al, 1999). Nosotros creemos que el TEA es mejor bloqueador que el 4-AP para esta familia de canales de potasio ya que muchos otros canales de potasio son tan sensibles o incluso mas sensibles hacia esta droga que los Kv3, incluida la ubiqa corriente "D" (Coetzee et al, 1999).

### **Canales Kv3.1 y Kv3.2 en Neuronas Palidales del Tipo A.**

En todos los casos, las neuronas bipolares y triangulares, arbitrariamente designadas como de "tipo A", la concentración de TEA empleada en este trabajo para aislar mediante substracción digital punto a punto aquellas conductancias con un alto umbral de activación, reveló la presencia de un componente de potasio del

tipo rectificador sostenido similar a las corrientes producidas por las proteínas Kv3.1 y Kv3.2 en diversos sistemas de expresión heteróloga (células HEK, linfocitos T, ovocitos de *Xenopus* y células CHO; Grissmer et al, 1994; Vega Saenz de Miera et al, 1994).

Se confirmó mediante RT-PCR en células únicas la existencia en estas células de los transcritos Kv3.1 y Kv3.2 y si bien la comparación de los parámetros de activación no mostró ninguna diferencia entre las corrientes Kv3.1, Kv3.2 en células CHO y aquella aislada en las neuronas del GP de la rata ( $I_{GP,TEA}$ ), la constante de deactivación en esta última mostró tener un valor intermedio entre las dos primeras.

Con el objetivo de contar con elementos adicionales de identificación, las neuronas tipo A fueron expuestas a AMPc (2 mM) y PMA (20 nM) ya que como se indicó anteriormente, los canales Kv3.2 y Kv3.1 responden selectivamente hacia estos agentes en virtud de la presencia de secuencias consenso para proteína cinasa A y C respectivamente. Sin embargo, a pesar de que las células CHO transfectadas respondieron positivamente y de manera selectiva hacia dichas sustancias reduciendo la corriente expresada en aproximadamente 50% del total, en las células del GP no pudieron obtenerse resultados concluyentes, ya que el grado de inhibición fue modesto y el porcentaje de la corriente modulada mostró en ambos casos, una constante de deactivación de valor intermedio.

Los resultados obtenidos en conjunto con el equipo del Dr. Bernardo Rudy (ver artículo en el anexo) mediante estudios inmunocitoquímicos y de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra los canales Kv3.1, Kv3.2 y contra parvoalbumina (PV), permiten sugerir que al menos en este tipo neuronal, las tres proteínas coexisten. Y ya que los transcritos Kv3.1 y Kv3.2 coprecipitan, es probable que existan como complejos heteromultiméricos.

Al respecto, existen numerosos datos sobre las propiedades biofísicas que podrían esperarse como resultado de la formación de canales heteromultiméricos (Isacoff et al, 1990; McCormack et al, 1990; Ruppersberg et al, 1990; Covarrubias et al, 1991; Salkoff et al, 1992; Shen et al, 1993; Wang et al, 1994; Weiser et al, 1995). Sin embargo, debido a que se desconocen las características de este tipo de proteínas formadas entre miembros de una misma subfamilia con propiedades tan similares entre si, resulta difícil predecir si la corriente esperada poseería propiedades intermedias o totalmente novedosas. A pesar de lo anterior, la aparente conservación general de los parámetros cinéticos encontrados en esta tesis, permiten concluir que las propiedades de los canales nativos que contienen subunidades Kv3.1 y Kv3.2 no son significativamente afectados por factores tales como subunidades reguladoras adicionales (subunidades  $\beta$ , Pongs, 1995) o por modificaciones postraduccionales (como es el caso de otras subunidades de canales de potasio clonadas), al menos en el tipo de células y bajo las condiciones que fueron utilizadas aquí.

### **Canales Kv3.3 y Kv3.4 en Neuronas Palidales del Tipo B.**

El resultado mas sorprendente en este estudio fue el hallazgo de una corriente transitoria, de alto umbral de activación, sensible a bajas concentraciones de TEA en una subpoblación pequeña de las células disociadas del GP de la rata, clasificadas aquí como "células tipo B" (ver figura 26). En estas células, las corrientes aisladas fueron muy similares a aquellas expresadas por las proteínas Kv3.4 en ovocitos de *Xenopus* (Rudy et al, 1988<sup>a</sup>; Rudy 1991a, b c; Rudy et al, 1992; Vega-Saenz de Miera et al, 1992, 1994). Estos resultados sobresalen en virtud de los estudios previos realizados por Weiser en 1994 (Weiser et al, 1994) donde reportó la presencia de los transcritos Kv3.4 en las células del globo pálido como "muy baja" o apenas "por encima de los niveles de la señal inespecifica". En este estudio, Weiser y colaboradores establecieron que la aparente baja expresión de estos transcritos debería ser interpretado con precaución ya que aún con bajos niveles de expresión, los transcritos Kv3.4

coexpresados con otros transcritos Kv3 pueden ser importantes fisiológicamente, debido principalmente a que las subunidades 3.4 pueden formar complejos heterólogos con otros canales, lo que resultaría en una significativa amplificación de la corriente transitoria o la aparición de corrientes con características cinéticas nuevas (Rudy et al, 1991 <sup>a, b</sup>). Los resultados presentados aquí parecen confirmar esa aseveración.

Los resultados de la amplificación del mRNA de las subunidades Kv3.4 por RT-PCR utilizando sondas específicas, confirmó su presencia exclusivamente en las células tipo B. (ver figura 46).

De acuerdo con los resultados reportados por primera vez aquí, aunque la corriente Kv3.4 contribuye relativamente poco proporcionalmente en la magnitud de la corriente total, ésta sí produce un efecto importante sobre la cinética de activación de la misma. Las familias de corrientes de potasio resistentes al TEA y el control no son significativamente diferentes en la magnitud de la corriente original, pero las primeras son claramente mas lentas despues de haberseles abstraído el componente inactivante de alto umbral de activación sensible al TEA (ver figura 36). Lo anterior permite proponer nuevas hipótesis sobre el papel de las corrientes transitorias del tipo observado en las células de tipo B del globo pálido: Estas corrientes aceleran el tiempo al pico de las corrientes repolarizantes sin incrementar significativamente los niveles de la corriente total en el estado estacionario.

Por otro lado, aunque en los experimentos de RT-PCR se confirmó la presencia del transcrito Kv3.3 (también sugerida su presencia en estas células por Weiser y colaboradores en 1994) no fue posible identificar ninguna corriente con características similares (ver tabla 5) a estas conductancias en las células del GP de la rata.

Se proponen al menos tres posibles explicaciones para lo anterior:

- 1) Es probable que los niveles de expresión para estos canales sean extremadamente bajos lo que ocasionaría que las corrientes producidas

por estas proteínas queden encubiertas por otras de mayor tamaño. Debido a que las propiedades cinéticas son muy similares entre los miembros de esta subfamilia de canales de potasio y a que la velocidad de inactivación presente en esta conductancia es relativamente lenta, su aislamiento es difícil.

- 2) Estas proteínas pueden estar siendo moduladas de diversas maneras en las células nativas (formación de proteínas heteromultiméricas, fosforilación, regulación por expresión de otros canales, subunidades reguladoras, etc.) lo que podría modificar características tales como su sensibilidad a TEA, umbral de activación, cinética de inactivación etc.
- 3) Hasta el momento solo ha sido posible expresar estas proteínas en ovocitos de *Xenopus*, por lo que se desconoce la cinética de estos canales expresados en diferentes sistemas heterólogos particularmente del mamífero. Al respecto existe (escasa) evidencia que permite proponer que estas corrientes expresadas en células HEK expresan corrientes de tipo rectificador sostenido (Vega-Saenz de Miera, comunicación personal).

### **Experimentos de Supresión de Componentes Específicos de Corriente por la Expresión de Transcritos Dominantes Negativos.**

Esta estrategia se intentó con el objeto de inhibir *in vivo* específicamente a los canales de potasio de la subfamilia Kv3.

Desafortunadamente, aunque se consiguió transfectar con bastante éxito un buen número de células del GP en cultivo, los experimentos realizados no arrojaron ninguna diferencia significativa entre las neuronas del GP de la rata trasfectadas con el constructo y las no trasfectadas.

Entre las posibles explicaciones para este resultado tenemos las siguientes:

1) Quizá el tiempo de vida media del canal una vez insertado en la membrana sobrepaso el período durante el cual se condujeron los registros electrofisiológicos, de esta forma no se alcanzó el recambio necesario entre subunidades normales y truncadas para producir un efecto apreciable.

2) Se desconocen las condiciones mínimas para mantener en cultivo a las células del GP, de hecho, éste es el primer reporte del que se tenga idea donde se logra mantenerlas *in vitro* por algunos días. Hay que considerar que la ausencia o presencia de algunos factores tróficos pueden estar favoreciendo la aparición o la desaparición de algunas características particulares. De hecho, existen evidencias tanto de la regulación de la expresión como de la actividad de diversos canales iónicos por factores tróficos (Berger y Takahashi, 1990; Elliot et al, 1998; Guo et al, 1998). Por otro lado, es posible que la interacción con algún otro tipo celular regule el fenotipo en las células del GP, por lo que habría que considerar la posibilidad de cocultivos para este tipo de estudios en neuronas nativas del SNC.

### **Corrientes resistentes a TEA en las células del globo pálido de la rata.**

Resulta interesante tratar de explicar la identidad del componente de corriente saliente que permanece después de la aplicación de 1 mM de TEA en las células del globo pálido de la rata.

La concentración de TEA utilizada en estos experimentos produce una inhibición significativa en muy pocos de los canales de potasio conocidos, incluidos los canales Maxi-K activados por calcio pertenecientes a la familia Sio ( $K_d$  80-330  $\mu$ M) y los Kv1.1 ( $K_d$  ~0.5mM; (Coetzee et al, 1999), por lo que se esperaría que de existir alguna conductancia de este tipo, permaneciera en la fracción de la corriente total insensible a la droga. Por otro lado, es poco probable que alguno de estos canales contribuya de alguna forma en la corriente aislada en las células del GP. En el primer caso, porque la activación de las corrientes

dependientes de calcio fué suprimida completamente adicionando en la solución extracelular cadmio (200  $\mu\text{M}$ ), e intracelularmente, por el empleo de BAPTA (10 mM).

En lo que corresponde a las proteínas Kv1.1, aunque son expresadas de manera exclusiva en el soma de las células del pálido ventral (Wang et al, 1994), estas conductancias son bloqueadas efectivamente por Dendrotoxina ( $K_d \sim 10\text{-}20$  nM, (Coetzee et al, 1999) que en las células palidales, en concentraciones superiores a  $1\mu\text{M}$ , bloquea a un componente inactivante muy pequeño ( $\sim 10\text{-}15\%$  del total de la corriente saliente) que recuerda mas bien al componente de corriente "D" descrito por Storm (1989) y por Wu y Barish (1992) el cual es significativamente inactivado a potenciales de mantenimiento cercanos a  $-40$  mV pero que permanece oculto por otras conductancias (ver figura 32). La Dendrotoxina también bloquea a otros miembros de la subfamilia Kv1 que no son muy sensibles a TEA (Coetzee et al, 1999) y que posiblemente estén participando en las corrientes similares al tipo "D" presentes en el componente insensible a TEA en dichas células. Al respecto, Baranauskas y colaboradores (1999) (Baranauskas 1999) basados en las características cinéticas, farmacológicas y en estudios realizados mediante amplificación del mRNA utilizando RT-PCR, proponen que este componente de umbral de activación relativamente alto y lenta deactivación, es producido por canales pertenecientes a la subfamilia de canales Kv2 o *Shab*.

### **Significado Fisiológico de las corrientes llevadas por canales de la subfamilia Kv3 en las neuronas del GP.**

Las propiedades electrofisiológicas inusuales de los canales Kv3, en particular su voltaje-dependencia y su velocidad de deactivación, hacen que posean efectos únicos sobre la excitabilidad neuronal.

En tanto que los canales Kv3 están abiertos significativamente solo cuando el potencial de membrana está despolarizado por arriba de los  $-10$  mV, se ha sugerido que estos canales están activos durante el pico del potencial de acción, y

cuando están presentes en cantidades suficientes, pueden influenciar su velocidad de repolarización y por lo tanto, regular su duración. Por otro lado, este tipo de canales de potasio, de alto umbral de activación pueden modular las propiedades de disparo de las neuronas en virtud de que no están abiertos sino hasta que la espiga ha sido generada. Lo anterior hace que influyan menos sobre el umbral de activación. Lo anterior contrasta con el papel de los canales de potasio activados en potenciales más negativos (Lenz et al, 1994; Vega Saenz de Miera et al, 1994; Moreno et al, 1995; Weiser et al, 1995; Sekirnjak et al, 1997).

La desactivación rápida de los canales Kv3.1 y Kv3.2 puede ser la clave de su significado funcional ya que puede estar reduciendo significativamente la duración del postpotencial hiperpolarizante, contribuyendo así a la reducción del período refractario absoluto facilitando el disparo en ráfagas. De hecho el tratamiento farmacológico que suprime las corrientes Kv3 impide el disparo en ráfagas en las neuronas corticales en tanto que el bloqueo de otras conductancias de potasio lo incrementa (Erisir et al, 1998). Muchas de las poblaciones neuronales que expresan los canales Kv3.1 y Kv3.2 disparan trenes de potenciales de acción a velocidades altas por ejemplo, las interneuronas de disparo rápido en la corteza cerebral y el hipocampo (Perney et al, 1992; Rudy et al, 1992; Weiser et al, 1994, 1995; Du et al, 1996; Massengill et al, 1997; Martina et al, 1998). La localización predominantemente somato-axonal de las proteínas Kv3.1 y Kv3.2 en las neuronas del SNC (Moreno et al, 1995; Weiser et al, 1995; Sekirnjak et al, 1997) es consistente con lo anterior ya que los bajos niveles de expresión en las dendritas sugiere que estos canales prácticamente no participan en la integración local de las señales postsinápticas en las sinapsis axo-dendríticas.

Las propiedades electrofisiológicas de esta subfamilia de canales de potasio la hacen en principio, fácilmente identificable y ya que una de las más activas y atractivas áreas de investigación con los canales de potasio involucra la localización anatómica y la descripción de su papel fisiológico específico, la

pregunta que salta a la vista es ¿porque no han sido descritos otros componentes similares en las distintas células nativas que expresan los transcritos Kv3?, ¿Cual es su papel en el funcionamiento de las células del gp de la rata?

Un problema en la descripción de estas corrientes es el hecho de se sobrelapan con otras corrientes de potasio existentes en las células. En el caso específico de las neuronas palidales, las corrientes Kv3 permanecen ocultas principalmente bajo el componente rectificador retardado ( $I_K$ ) aislado con 10 mM de TEA por Stefani y colaboradores (Stefani 1992; Stefani 1995). Por otro lado, las características biofísicas tan similares entre los distintos transcritos dificultan su identificación electrofisiológica haciendo necesario el empleo de otras técnicas de identificación más específicas y sensibles, como las que se basan en técnicas de biología molecular.

Con la idea de plantear posibles hipótesis sobre la participación de las conductancias codificadas en la subfamilia génica Kv3, nos pareció importante tratar de correlacionar las conductancias identificadas en este trabajo, con los tipos celulares básicos identificados en diversas especies de primates y roedores mediante inmunocitoquímica y diversas técnicas de impregnación metálica (Fox et al, 1966; Fox et al, 1974; Iwahori y Mizuno, 1981; Difiglia et al, 1982).

Los hallazgos inmunocitoquímicos utilizando a la Descarboxilasa del Acido Glutámico (GAD, una enzima crítica en la vía metabólica del Acido Gama Amino-Butírico, GABA) como indicador, han permitido concluir que el principal neurotransmisor en el GP de los mamíferos es el GABA (Grofova, 1975; DeVito et al, 1980; DeVito et al, 1982; Kita y Kitai, 1991; Hortanilla et al, 1994; Kita, 1994<sup>a, b</sup>; Rajakumar et al, 1994<sup>a, b</sup>; Parent y Hazrati, 1995<sup>a, b</sup>; Riedel et al, 1998). En el roedor, este neurotransmisor ha sido principalmente detectado en las células bipolares y triangulares de tamaño mediano a grande inmunocitoquímicamente negativas hacia calbindina (Hortanilla et al, 1994; Kita 1994<sup>a, b</sup>; Rajakumar et al, 1994<sup>a, b</sup>; Riedel et al, 1998). En tanto, la región peripalidal es rica en células GAD negativas pero Colina Acetil-Transferasa (enzima límite durante la síntesis de la Acetilcolinesterasa -AChE-) positivas (CHAT+, Graybiel y Ragsdale, 1979;

Armstrong et al, 1983; Garcia-Rill, 1986<sup>a,b</sup>). Esta población CHAT+ es también Calbindina positiva (CAL+; Rajakumar, 1997).

En la rata, aproximadamente 2/3 (67%) del total de las células en el GP son inmunocitoquímicamente positivas hacia parvoalbúmina (PV), morfológicamente, esta población es heterogénea, siendo posible encontrar células tanto bipolares como triangulares PV+ distribuidas por todo el GP. De acuerdo con los estudios de inmunolocalización realizados en colaboración con el equipo del Dr. Bernardo Rudy, las proteínas Kv3.1 y Kv3.2 están presentes en la células de proyección GABAérgicas, PV+ (ver anexo 1 figura 2) que corresponden con la morfología de la mayoría de las células disociadas e identificadas como de tipo "A". Las células que mostraron la corriente de tipo Kv3.4 corresponden con aquellas GABA-, CHAT+, CAL+. Los estudios de RT-PCR confirman lo anterior.

Si bien, no hay muchos estudios sobre las propiedades electrofisiológicas de las neuronas palidales, la mayoría está de acuerdo en la existencia básicamente de tres tipos de neuronas desde el punto de vista de sus propiedades electrofisiológicas intrínsecas:

- 1) Neuronas tipo I: (59% del total registrado) con un soma promedio de 40 X 23  $\mu\text{m}$  son silentes en el potencial de membrana ( $-65 \pm 10$  mV), generan ráfagas de espigas con fuerte acomodación. En ellas han sido identificadas una conductancia de calcio de bajo umbral y una corriente transitoria de tipo A. Presenta potenciales postsinápticos inhibitorios.
- 2) Tipo II: (37% del total registrado) estas células poseen un soma de 29 X 17  $\mu\text{m}$ . Disparan espontáneamente en el potencial de reposo ( $-59 \pm 9$  mV). Presentan también disparos repetitivos ( $<200\text{Hz}$ ) con débil acomodación. En estas células ha sido identificada una corriente de calcio de bajo umbral. Presenta potenciales postsinápticos inhibitorios.
- 3) Tipo III: este grupo (4% del total registrado), no presento disparos espontáneos en el potencial de reposo ( $-73 \pm 5$  mV), sin embargo, una vez

despolarizadas, presentan potenciales de acción de larga duración ( $2.3 \pm 0.6$  mV) sin acomodación. Poseen una corriente de tipo A transitoria. El Soma midió en promedio  $18 \times 12 \mu\text{m}$  lo que indica que probablemente sean interneuronas.

Cuando se comparan las propiedades de las células descritas en el mono con las de la rata, se encuentran similitudes entre los grupos I y AFP y entre los grupos II y BFD-R (DeLong, 1971, 1972; Nambu y Llinás, 1997), las diferencias electrofisiológicas pueden deberse mas a diferencias entre sus conexiones sinápticas que entre sus propiedades electrofisiológicas.

El tipo celular I esta caracterizado por poseer cuerpos celulares grandes ( $\sim 40 \times 19 \mu\text{m}$ ) con dendritas delgadas y ramificadas poco frecuentemente. Anatómicamente, se sabe que las células colinérgicas que proyectan hacia la corteza cerebral están distribuidas alrededor de algunas áreas del cerebro anterior incluyendo al globo pálido (Das y Kreutzberg, 1968; Rye et al, 1984; Ingham et al, 1985). La actividad de estas neuronas colinérgicas es muy similar a la observada en este tipo celular: está regulada por corrientes de calcio de bajo umbral (Khateb et al, 1992; Alonso et al, 1996).

Estas observaciones hacen de las células tipo I buenas candidatas para ser las células colinérgicas del globo pálido. Sin embargo, la actividad de las células colinérgicas *en vivo* ha sido caracterizado como básicamente regular con frecuencias de 30 Hz mas bajo que el de las células del GP descritas hasta el momento (DeLong, 1972). Por lo que son necesarios mas estudios para verificar estas observaciones.

En lo que respecta al tipo II, este corresponde morfológicamente con el tipo celular piramidal y bipolar reportado en primates y roedores (Fox et al, 1974; DiFiglia et al, 1982; Francois et al, 1984; Yelnik et al, 1984; Denner y Pfister, 1981; Iwahori y Mizuno, 1981; Park et al, 1982; Millhouse, 1986; Kita y Kitai, 1994; Kita, 1994) sugirió que algunas de la neuronas en este grupo son PV positivas. Dicha observación puede corresponder con el hecho de la existencia de conductancias

de calcio en este tipo celular. La parvoalbúminia puede jugar un papel en la translocación y el amortiguamiento de iones calcio que fluyen hacia en interior celular (Heizmann et al, 1984).

El tipo III por su parte, puede corresponder con las células de la frontera o limítrofes reportadas en los monos despiertos (DeLong, 1971, 1972), basados en la similaridad de su disparo, estas células están localizadas a lo largo del borde de los dos segmentos palidales. Debido a su tamaño se piensa que corresponden con las células pequeñas reportadas previamente como interneuronas. El axón de estas células no sale de los límites del GP (Fox et al, 1974; Difiglia et al, 1982, 1998; Francois et al, 1984; Millhouse, 1986).

Durante la escritura de esta tesis, James Surmeier y su equipo de colaboradores publicaron un artículo donde reportan que las corrientes rectificantes sostenidas que se encuentran en las células del globo pálido pueden ser atribuibles a canales de tipo Kv3.1/3.2 y Kv2.1 (Baranauskas et al, 1999).

Basicamente, empleando las mismas estrategias experimentales que las empleadas en este trabajo, aislan una corriente de bajo umbral de activación que posee una extraordinariamente rápida deactivación insensible a DTX y a Margatoxina (MgTX). La amplificación del mRNA por RT-PCR semicuantitativo confirmó la presencia de los transcritos Kv3.1 y Kv3.2 en similares proporciones. Sugieren que la corriente resistente a TEA cuyas colas de corriente son lentas esta codificada por canales de tipo Kv2.1.

Aunque ellos no distinguen entre los probables tipos celulares obtenidos en sus disociaciones, previamente habian demostrado que la población celular con la que trabajaron era CHAT-, GAD+, PV+ , fenotipo que corresponde con las células que nosotros identificamos como de tipo "A". Electrofisiológicamente, sus resultados confirman los nuestros, las diferencias pueden ser atribuibles a las condiciones de registro.

## CONCLUSIONES.

En resumen, este trabajo muestra que:

1) Los transcritos Kv3.1 y Kv3.2 expresados de manera homomultimérica en un sistema mamífero de expresión heteróloga tienen características biofísicas y farmacológicas similares a las observadas en los ovocitos de *Xenopus* transfectados con dichos transcritos. Sin embargo, en contraste con lo reportado previamente, se encontraron diferencias en las velocidades de deactivación entre ambas proteínas: los transcritos Kv3.1 se deactivan más rápido que los Kv3.2.

2) Las células obtenidas mediante la disociación enzimática del globo pálido pueden ser agrupadas de acuerdo a sus características morfológicas en bipolares y triangulares de tamaño medio (células de tipo "A"), células multipolares grandes (células de tipo "B") y un tercer grupo de células pequeñas que pudieran ser interneuronas (este grupo no fue considerado en este trabajo). Dichos tipos celulares corresponden con aquellos descritos previamente por múltiples autores.

3) Cada uno de los grupos celulares identificados en este trabajo pudieron ser asociados con un grupo particular de corrientes de potasio activadas por el voltaje. Las células tipo "A" expresan principalmente corrientes codificadas por los genes Kv3.1 y Kv3.2, en tanto que las células tipo "B" poseen corrientes de tipo Kv3.4. Ambos tipos fueron identificados biofísicamente y farmacológicamente, así como mediante técnicas de biología molecular (RT-PCR en célula única).

4) Los resultados obtenidos mediante la inmunocitoquímica y la inmunoprecipitación, así como mediante registros electrofisiológicos sugieren la posibilidad de que al menos en estas células, las corrientes Kv3.1 y Kv3.2 coexistan como complejos proteicos heteromultiméricos.

5) Diversos estudios inmunocitoquímicos y electrofisiológicos junto con los realizados aquí, permiten sugerir que las células identificadas previamente como CHAT-, GAD+, PV+ y CAL-, corresponden a las células denominadas por nosotros como tipo "A", en tanto que aquellas CHAT+, GAD-, PV- y CAL+, corresponden a las tipo "B".

## BIBLIOGRAFIA.

Adams, P. R., Galvan, M. (1986). "Voltage-dependent currents of vertebrate neurons and their role in membrane excitability". *Adv. Neurol.* 44:137-170.

Adelman, J. P., Bond, C. T., Pessia, M., Maylie, J. (1995). "Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions." *Neuron* 15(6): 1449-1454.

Albin, R. L., Marcowicz, R. L., Hollingsworth, Z. R., Dure, L. S., Penney, J. B., Young, A. B. (1989). "The functional anatomy of basal ganglia disorders." *Trends in Neurosci.* 12: 366-375.

Alexander, G. E., Crutcher, M. D. (1990). "Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing." *Trends in Neurosci.* 13: 266-271.

Alheid, G. F., Heimer, L., Switzer, R. C. (1990). *Basal Ganglia*. New York, Academic Press.

Alonso, M.T., Mollinedo, F., Barasoain, I., Alvarez, J., Garcia-Sancho, J. J. (1998) "Transient inhibition of capacitance calcium entry in human neutrophils by a monoclonal antibody directed against a 19-kDa antigen". *Leukoc. Biol*;60(3):323-7

Aidley, D. J., Stanfield, P. R. (1996). *Ion Channels. Molecules in action*. Cambridge University Press. NY. New York.

Aiyar, J., Grissmer, S., Chandy, K. G. (1993) "Full-length and truncated Kv1.3 K<sup>+</sup> channels are modulated by 5-HT<sub>1c</sub> receptor activation and independently by PKC". *Am. J. Physiol.* 265(6 Pt 1):C1571-8

Armstrong, D. M., Saper, C. B., Levey, A. I, Wainer, B. H., Terry, R. D. (1983). "Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase." *J. Comp. neurol.* 216: 53-68.

Attali, B., Honore, E., Lesage, F., Lazdunski, M., Barhanin, J. (1992) "Regulation of a major cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channel from human T lymphocytes". 303(2-3):229-32

Auld, V. J., Goldin, A. L., Krafe, D. S., Marshall, J., Dunn, J. M., Catterall, W. A., Lester, H. A., Davidson, N., Dunn, R. J. (1988). "A rat brain Na<sup>+</sup> channel alpha subunit with novel gating properties." *Neuron* 1: 449-461.

Baranauskas, G., Tkatch, T., Surmeier, J. D. (1999). "Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2.1 and Kv3.1/3.2 K<sup>+</sup> channels." *J. Neurosci.* 19(15): 6394-6404.

Barchi, R. L. (1987). "Sodium channel diversity: subtle variations on a complex theme." *TINS* 10: 221-223.

Baumann, A., Kraj-Jentgens, I., Muller, R., Muller-Holtkamp, F., Seidel, R., Kecskemethy, N., Casal, J., Ferrus, A., Pongs, O. (1987). "Molecular organization of the maternal effects region of the *Shaker* complex of *Drosophila*: Characterization of an I<sub>A</sub> channel transcript with homology to vertebrate Na<sup>+</sup> channel". *European Molecular Biology Organization Journal.* 6: 3419-3429.

Baumann, A., Grupe, A., Ackermann, A., Pongs, O. (1988). "Structure of the voltage-dependent potassium channel is highly conserved from *Drosophila* to vertebrate central nervous system". *EMBO* 7: 2457-2463.

Blair, T. A., Roberds, S. L., Tamkun, M. M., Hartshome, R. P. (1991) "Functional Characterization of RK5, a voltage-gated K<sup>+</sup> channel cloned from the rat cardiovascular system". *FEBS Lett.* 295:211-213

Braak, H., Braak, E. (1993). "Anatomy of the human basal ganglia. Inhibitors of monoamine oxidase". B. I. Szelenyi. Ed. Suiza, Verlag Basel: 1-23.

Berger, A. J., Takahashi, T. (1990). "Serotonin enhances a low voltage-activated calcium current in rat spinal motoneurons". *J. Neurosci.* 10(8): 1922-1928.

Butler, A., Wei, A., Baker, K., Salkoff, L. (1989). "A family of K<sup>+</sup> channel genes in *Drosophila*". *Science* 243: 943.

Butler, A., Wei, A., Salkoff, L. (1990). "*Shal*, *Shab* and *Shaw*: three genes encoding potassium channels in *Drosophila*". *Nucl. Acid. Res.* 18: 2173-2174.

Castle, N. A., Strong, P. N. (1986). "Identification of two toxins from scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) venom which block distinct classes of calcium-activated potassium channels". FEBS Lett. **209**: 117-121.

Chandy, K. G., Cahalan, M. D., Grissmer, S. (1990<sup>a</sup>). "Autoimmune diseases linked to abnormal K<sup>+</sup> channel expression in double-negative CD4-CD8-T cells". Eur. J. Immunol **20**(4): 747-751.

Chandy, K. G., Williams, C. B., Spencer, R. H., Aguilar, B. A., Ghanshani, S., Tempel, B. L., Gutman, G. A. (1990<sup>b</sup>). "A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions." Science **247**(4945): 973-975.

Chandy, K. G., Douglass, J., Gutman, G. A., Jan, L., Joho, R., Kaczmarek, L., McKinnon, D., North, R. A., Numa, S., Philipson, L., Ribera, A. B., Rudy, B., Salkoff, L., Swanson, R. A., Steiner, D., Tanouye, M., Temple, B. L. (1991). "A simplified gene nomenclature". Nature **352**: 26.

Chandy, K. G., Gutman, G. A. (1993). "Nomenclature for mammalian potassium channel genes". Trends Pharmacol. Sci. **14**(12): 434.

Chesselet, M. F., Delfs, J. M. (1996). "Basal ganglia and movement disorders: an update". Trends Neuroscience **19**: 417-422.

Coetzee, W., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B. (1999). "Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels". Ann. Rev. NY. Acad. Sci **868**: 233-285.

Covarrubias, M., Wei, A. A., Salkoff, L. (1991). "*Shaker*, *Shal*, *Shab*, and *Shaw* express independent K<sup>+</sup> current systems". Neuron **7**: 763-773.

Covarrubias, M., Pak, M., Sorensen, R. (1992). "Protein Kinase C activators enhance a mammalian A-type current expressed in *Xenopus* oocytes". Society for Neuroscience Abstracts **18**: 922.

Covarrubias, M., Wei, A. A., Salkoff, L., Vyas, T. B. (1994). "Elimination of rapid potassium channel inactivation by phosphorylation of the inactivation gate". Neuron **13**: 1403-1412.

Critz, S. D., Wible, B. A., Lopez, H. S., Brown, A. M. (1993) "Stable expression and regulation of a rat brain K<sup>+</sup> channel". J. Neurochem **60**(3):1175-8

Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., Keating, M. T. (1995). "A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome". *Cell* **80**(5): 795-803.

Darnell, J. E., Lodish, H., Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*. New York, Scientific American Books.

DeLong, M. R. (1971). "Activity of Pallidal neurons during movement." *J. of Neurophysiology* **34**: 414-427.

DeLong, M. R. (1972). "Activity of basal ganglia neurons during movement." *Brain Res.* **40**(1): 127-135.

Denny-Brown, D., Yanagisawa, N. (1976). "The role of the basal ganglia in the initiation of movement". *The basal ganglia*. M. Yahr. Ed. New York, Raven Press.

DeVito, J. L., Anderson, M. E., Walsh, K. E. (1980). "A horseradish peroxidase study of efferent of the globus pallidus in *macaca mulatta*." *Exp. Brain Res.* **33**: 65-75.

DeVito, J. L., Anderson, M. E. (1982). "An autoradiographic study of efferent connections of the globus pallidus in *macaca mulatta*." *Exp. Brain Res* **46**: 107-117.

Difiglia, M., Pasik, P., Pasik, T. (1982). "A Golgi and ultrastructural study of the monkey globus pallidus." *J. of Comp. Neurol.* **215**: 53-75.

Difiglia, M., Rafols, J. A. (1998). "Synaptic Organization of the globus pallidus." *J. Electron Microsc. Tech.* **10**(3): 247-263.

Drain, P., Dubin, A. E., Aldrich, R. W. (1994). "Regulation of *Shaker* K<sup>+</sup> channel inactivation gating by the cAMP-dependent protein kinase." *Neuron* **12**(5): 1097-1109.

Drewe, J., Verma, S., French, G., Joho, R. (1992). "Distinct spatial and temporal expression patterns of K<sup>+</sup> channel mRNA's from different subfamilies." *J. Neurosci.* **12**: 538-548.

Dreyer, F. (1990). "Peptide Toxins and potassium channels." *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **115**: 94-130.

Du, J., Zhang, L., Weiser, M., Rudy, B., McBain, C. J. (1996). "Developmental expression and functional characterization of the potassium-channel subunit Kb3.1b in PV-containing interneurons of the rat hippocampus." *J. Neurosci.* 16:506-518.

Durrel, S. R., Guy, H. R. (1992). "Atomic scale structure and functional modes of voltage-dependent potassium channels". *Biophys. J.* 62:238-247.

Erisir, A., Lau, D. H. P., Rudy, B., Leonard, C. S. (1998). "Low TEA concentration disrupts high frequency firing of fast cells in mouse somatosensory cortex." *Soc. Neurosci. Abst.* 24: 632-653.

Elliot, P., Wallis, D. I., Foster, G. A., Stringer, B. M. (1999). "Ionic mechanisms underlying excitatory effects of serotonin on embryonic rat motoneurons in long-term culture." *Neuroscience* 90(4): 1311-1323.

Evarts, E. V. T., H., Calne, D. B. (1981). "Reaction time in Parkinson's disease." *Brain* 104: 167-186.

Falls, W. M., Park, M. R., Kital, S. T. (1983). "An intracellular HRP study of the rat globus pallidus. II: Fine structural characteristics and synaptic connections of medially located large GP neurons." *J. of Comp. Neurol* 220: 229-245.

Flowers, K. A. (1976). "Visual Closed-Loop and Open Loop characteristics of voluntary movement in patients with Parkinsonism and intention tremor." *Brain* 99: 269-310.

Fox, C. A., Hillman, D. E., Siegesmund, K. A., Sether, L. A., Ed. (1966). "The primate globus pallidus and its feline and avian homologues: a golgi study and electron microscopy study. Evolution of the forebrain. Phylogensis and Ontogenesis of the forebrain. Stuttgart, Georg Thieme.

Fox, C. A., Andrade, A. N., LuQui, L. J., Rafols, J. A. (1974). "The primate globus pallidus: a Golgi and electron microscopic study." *J. Hirnforsch.* 15: 75-93.

Francois, C., Percheron, G., Yelnik, J., Heyner, S. (1984). "A golgi analysis of the primate globus pallidus. I. Inconstant processes of large neurons, other neuronal types, and afferents axons." *J. of Comp. Neurol.* 227: 182-199.

Gahwiler, B. H., Llano, I. (1989). "Sodium and potassium conductances in somatic membranes of rat Purkinje cells from organotypic cerebellar cultures." *J Physiol (Lond)* 417: 105-122.

Ganetzky, B., Wu, C. F. (1983). "Neurogenetic analysis of potassium currents in *Drosophila*: synergistic effects on neuromuscular transmission in double mutants." *J Neurogenet* 1(1): 17-28.

Garcia-Rill, E. (1986a). "The basal ganglia and the locomotor regions." *Brain Res Rev.* 11: 47-63.

Garcia-Rill, E. (1986b). "The basal ganglia and the locomotor regions." *Brain Res Rev.* 11: 47-63.

Ghanshani, S., Pak, M., McPherson, J. D., Strong, M., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., Salkoff, L., Gutman, G. A., Chandy, G. (1992). "Genomic organization, nucleotide sequence, and cellular distribution of a *Shaw*-related potassium channel gene, Kv3.3, and mapping of Kv3.3 and Kv3.4 to human chromosomes 19 and 1." *Genomics* 12(2): 196-196.

Graybiel, A. M., Ragsdale, C. W. (1979). "Fiber connections of the basal ganglia." *Prog. Brain Res.* 51: 349-351.

Grissmer, S., Cahalan, M. D., Chandy, K. G. (1988). "Abundant expression of type I K<sup>+</sup> channels. A marker for lymphoproliferative diseases?" *J. Immunol.* 141(4): 1137-1142.

Grissmer, S., Hanson, D. C., Natoli, E. J., Cahalan, M. D., Chandy, K. G. (1990<sup>a</sup>). "CD4-CD8-T cells from mice with collagen arthritis display aberrant expression of type I K<sup>+</sup> channels." *J. Immunol* 145(7): 2105-2109.

Grissmer, S., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., Goldin, A. L., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Chandy, K. G. (1990<sup>b</sup>). "Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K<sup>+</sup> channel gene." *PNAS USA* 87(23): 9411-9415.

Grissmer, S., Ghanshani, S., Dethlefs, B., McPherson, J. D., Wasmuth, J. J., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Chandy, K. G. (1992). "The *shaw*-related potassium channel gene Kv3.1 on human chromosome 11, encodes the type 1 K<sup>+</sup> channels in T cells." *J. Biol. Chem.* 267(29): 20971-20979.

Grissmer, S., Nguyen, A. N., Aiyar, J., Hanson, D. C., Mather, R. J., Gutman, G. A., Kamilowics, M. J., Auperin, D. D., Chandy, K. G. (1994). "Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, type Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines." *Mol. Pharmacol.* **45**(6): 1227-1234.

Grofova, I. (1975). "The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by mean of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase." *Brain Res* **91**: 288-291.

Gautron, S., Dos Santos, G., Pinto-Henrique, D., Koulakoff, A., Gross, F., Berwal, D., Netter, V. (1992). "The glial voltage-gated sodium channel: cell-and tissue-specific mRNA expression". *PNAS USA* **89**: 7272-76

Gou, W., Kamiya, K., Hojo, M., Kodama, I., Toyama, J. (1998). "Regulation of Kv4.2 and Kv1.4 K<sup>+</sup> channel expression by myocardial hipertrophic factors in cultured newborn rat ventricular cells." *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**(7): 1449-1459.

Grover, G. J. (1994<sup>b</sup>) "Protective effects of ATP sensitive potassium channel openers in models of myocardial ischaemia". *Cardiovasc Res*; **28**(6):778-82

Grover, G. J. (1994<sup>b</sup>) "Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia". *Cardiovasc Pharmacol* ;**24** Suppl 4:S18-27

Hagiwara, S., Yoshii, M. (1979). "Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification of the starfish egg as examined by internal perfusion." *J. Physiol. (Lond)* **292**: 251-265.

Hallet, M., Khoshbin, S. (1980). "A physiological mechanism of bradykinesia." *Brain* **101**: 35-52.

Hauber, W. (19998). "Involvement of basal ganglia transmitters systems in movement initiation." *Progress in Neurobiology* **56**: 507-540.

Heimer, L., Switzer, R. C., Van Hoesen, G. W. (1982). "Ventral Striatum and Ventral Pallidum. Components of the motor system?" *Trend Neurosci.* **5**: 83-87.

Heimer, L., Zahm, D. S., Alheid, G. F. (1995). *Basal Ganglia. The rat nervous system.* G. Paxinos. New York, Academic Press: 579-628.

Heizmann, C. W. (1984) "Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells". *Experientia* 1984;40(9):910-21

Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, Mass.

Hortanilla, B., Parent, A., Gimenez-Amaya, J. M. (1994). "Compartmental distribution of parvalbumin and calbindin D-28k in rat globus pallidus." *Neuroreport* 5: 2269-2272.

Tanouye, M. A., Kamb, C. A., Iverson, L. E., Salkoff, L. (1986) "Genetics and molecular biology of ionic channels in *Drosophila*". *Annu Rev Neurosci* 9:255-76

Isacoff, E. F., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1990a). "Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes." *Nature* 345(6275): 530-534.

Isacoff, E. F., Papazian, D., Timpe, L., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1990b). "Molecular studies of voltage-gated potassium channels". *Cold spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55 9-17.

Isacoff, E. F., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1991). "Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K<sup>+</sup> channel". *Nature* 353 88-90.

Isom, L. L., De Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A. L., Catterall, W. A. (1992). "Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel." *Science* 256(5058): 839-842.

Ingham, C. A., Bolam, J. P., Wainer, B. H., Smith, A. D. (1985) "A correlated light and electron microscopic study of identified cholinergic basal forebrain neurons that project to the cortex in the rat". *J. Comp. Neurol.*;239(2):176-92

Iverson, L. E., Tanouye, M. A., Lester, H. A., Davidson, N., Rudy, B. (1988). "A-Type potassium channels expressed from *Shaker* locus cDNA." *PNAS USA* 85: 5723-5727.

Iwahori, N., Mizuno, N. (1981). "A Golgi study on the globus pallidus of the mouse." *J. of Comp. Neurol.* 197: 29-43.

Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1989). "Voltage-Sensitive Ion Channels." *Cell* 56: 13-25.

Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1992). "Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions." *Ann. Rev. Physiol.* 54: 537-555.

Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1997<sup>a</sup>). "Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes." *Annu. Rev. Neurosci.* **20**: 91-123.

Jan, Y. N., Jan, L. Y., Dennis, M. (1997<sup>b</sup>). "Two mutations of synaptic transmission in *Drosophila*." *Proc. of the Royal Soc. of Sci. London series B* **198**: 87.

Jaraman, A. (1983). "Topographic organization and morphology of Peripallidal and Pallidal cells projecting to the striatum in cats." *Brain Research* **275**: 279-286.

Johnston, D., Miao-Sin, W. S. (1995). *Foundations of Cellular Neurophysiology*. London, England. The MIT Press.

Khateb, A., Muhlethaler, M., Alonso, A., Serafin, M., Mainville, L., Jones, B. E. (1992) "Cholinergic nucleus basalis neurons display the capacity for rhythmic bursting activity mediated by low-threshold calcium spikes". *Neuroscience* **51**(3):489-94

Kamb, A., Tseng-Crank, J., Tanouye, M. A. (1988<sup>a</sup>). "Multiple products of the *Drosophila Shaker* gene may contribute to potassium channel diversity." *Neuron* **1**: 421-430.

Kamb, A., Iverson, L. Et., Tanouye, M. A. (1988<sup>b</sup>). "Molecular characterization of *shaker*, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel" *Cell* **50**:405-413.

Kaplan, W. D., Trout, W. E. (1969). "The behaviour of four neurological mutants of *Drosophila*." *Genetics* **61**: 339-409.

Katz, A. M. (1993). "Metabolism of the failing heart." *Cardioscience* **4**(4): 199-203.

Katz, B., Miledi, R. (1972). "The Statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components." *J. Physiol (Lond)* **224**: 665-699.

Kayano, T., Noda, M., Flockerzi, V., Takahashi, H., Numa, S. (1988). "Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence." *FEBS Lett* **228**: 187-194.

Kita, H., Kitai, S. T. (1991). "Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and response to neostriatal subthalamic and nigral stimulation." *Brain Res.* **564**(2): 296-305.

Kita, H., Kitai, S. T. (1994). "The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study." *Brain Research* **636**: 308-319

Kita, H. (1994). "Parvalbumin-immunopositive neurons in the rat globus pallidus: a light and electron microscopy study." *Brain Research* **657**: 31-41.

Kimura, M. (1995). "Role of basal ganglia in behavioural learning". *Neurosci.* **22**: 553-558.

Latorre, R., Miller, C. (1983). "Conduction and selectivity in potassium channels." *J. Membr. Biol* **71**: 11-30.

Lavin, A., Grace, A. A. (1996). "Physiological properties of rat ventral pallidal neurons recorded intracellularly in vivo." *J. Neurophysiol.* **75**:1432-1443.

Lenz, S. P., T. M., Qin, Y., Robbins, E., Chesselet, M. F. (1994). "GABA-ergic interneurons of the striatum express the *Shaw*-like potassium channel Kv3.1." *Synapse* **18**(1): 55-66.

Leonard, R. J., Garcia, M. L., Slaughter, R. S., Reuben, J. P. (1992) "Selective blockers of voltage-gated K<sup>+</sup> channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin". *PNAS USA*;89(21):10094-8

Lidsky, T. I., Manetto, C., Schneider, J. S. (1985). "A consideration of sensory factors involved in motor functions of the basal ganglia." *Brain Research Reviews* **9**: 133-146.

Li, G.R., Feng, J., Shrier, A., Nattel, S. J. (1995) "Contribution of ATP-sensitive potassium channels to the electrophysiological effects of adenosine in guinea-pig atrial cells". *Physiol (Lond)* **484**: 629-42

Linsdell, P., Moody, W. J. (1994) "Na<sup>+</sup> channel mis-expression accelerates K<sup>+</sup> channel development in embryonic *Xenopus laevis* skeletal muscle". *J Physiol (Lond)* 1994;480 ( Pt 3):405-10

Lopez-Barneo, J., Lopez-Lopez, J. R., Urena, J., Gonzalez, C. (1988). "Chemotransduction in the carotid body: K<sup>+</sup> current modulated by PO<sub>2</sub> in type I chemoreceptor cells." *Science* **241**(4885): 580-582.

Lopez-Lopez, J., Gonzalez, C., Urena, J., Lopez-Barneo, J. (1989). "Low pO<sub>2</sub> selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body." *J. Gen. Physiol* **93**(5): 1001-1015.

Luneau, C., Wiedmann, R., Smith, J. S., Williams, J. B. (1991). "Shaw-like rat brain potassium channel cDNA's with divergent 3' ends." FEBS Lett 288: 163-167.

Lopatin, A. N., Nichols, C. G. (1993). "Block of delayed rectifier (DRK1) K<sup>+</sup> channels by internal 2,3 butanedione monoxime in *Xenopus* oocytes." Receptors Channels 1(11): 279-286.

Lynch, J.J Jr., Sanguinetti, M. C., Kimura, S., Bassett, A. L. L. (1992) "Therapeutic potential of modulating potassium currents in the diseased myocardium". FASEB J Aug;6(11):2952-60

McKeown, M. (1992) "Alternative mRNA splicing". Ann Rev Cell Biol 1992;8:133-55

Mandel, G. (1993). "Sodium channel regulation in the nervous system: how the action potential keeps in shape." Current Opinion In Neurobiology. 3: 278-282.

Marchand, R., Lajoie, L., Blanchet, C. (1986a). "Histogenesis at the level of Basal Forebrain: The entopeduncular nucleus." Neuroscience 17(3): 591-607.

Marchand, R., Lajoie, L. (1986b). "Histogenesis of the striopallidal systems in the rat. Neurogenesis of its neurons." Neuroscience 17(3): 573-590.

Marsden, C. D., Obeso, J. A. (1994). "The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease." Brain 117: 877-897.

Martina, M., Schultz, J. H., Ehmke, H., Monyer, H., Jonas, P. (1998). "Functional and molecular differences between voltage-gated K<sup>+</sup> channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus". J. Neurosci. 18:8111-8125.

Massengill, J. L., Smith, M. A., Son, D. I., O'Dowd, D. K. (1997). "Differential expression of K4-ap currents and Kv3.1 potassium channel transcripts an cortical neurons that develop distinct firing phenotypes". J. Neurosci. 17: 3138-3147.

McCormack, K., Lin, J. W., Iverson, L. E., Rudy, B. (1990). "Shaker K<sup>+</sup> channel subunits from heteromultimeric channels with novel functional properties." Biochem. Biophys. Res. Commun. 171(3): 1361-1371.

McCormack, T., Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B. (1991). "Molecular cloning of a member of a third class of Shaker family K<sup>+</sup> channel genes in mammals." PNAS USA 88(9): 4060-4065.

Mc Geer, P. L., McGeer, E. G. (1993). "Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia." *Adv. Neurol.* 60: 93-101.

Melefors, O., Hentze, M. W. (1993). "Iron regulatory factor-the conductor of cellular iron regulation." *Blood Rev* 7(4): 251-258.

Migeon, M. B., Street, V. A., Demas, V. P., Tempel, B. L. (1992). "Cloning, sequence and chromosomal localization of MK6, a murine potassium channel gene." *Epilepsy Res Suppl* 9: 173-181.

Millhouse, O. E. (1986). "Pallidal neurons in the rat." *J. of Comp. Neurol.* 254: 209-227.

Mink, J. W. (1996). "The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs." *Prog. Neurobiol.* 50: 381-425.

Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindstrom, J., Takahashi, T., Kuno, M., Numa, S. (1984). "Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs." *Nature* 307: 604-608.

Moran, O., Dascal, N., Lotan, I. (1991) "Modulation of a *Shaker* potassium A-channel by protein kinase C activation". *FEBS Lett*;279(2):256-60

Moreno, H., Kentros, C., Bueno, E., Weiser, M., Hernandez-Cruz, A., Vega-Saenz de Miera, E., Ponce, A., Thmhill, W., Rudy, B. (1995). "Thalamocortical projections have a K<sup>+</sup> channel that is phosphorylated and modulated by cAMP-dependent protein kinase." *J. Neurosci.* 15(8): 5488-5501.

Murakoshi, H., Shi, G., Scannevin, R. H., Trimmer, J. S. (1997). "Phosphorylation of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel alters voltage-dependent activation." *Mol. Pharmacol.* 52: 821-828.

Nakanishi, H., Kita, H., Kitai, S. T. (1990). "Intracellular study of rat entopeduncular nucleus neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties." *B. Research* 527:81-88.

Nambu, A., Llinas, R. (1994). "Electrophysiology of globus pallidus." *J. Neurophysiol* 72(3): 1127-1139.

Nambu, A., Llinas, R. (1997). "Morphology of globus pallidus neurons: its correlation with electrophysiology in guinea pig brain slices." *J. Comp. Neurol.* 377(1): 85-94.

Neher, E., Sakmann, B. (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres" *Nature* **260**: 799-802.

Neher, E., Sakmann, B. (1976). "Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres". *J. Physiol (Lond)*. **258**(3): 705-729.

Nieuwenhuys, R., Ten Donkelaar, H. J., Notholm, C. (1998). *The Central Nervous System of Vertebrates*. Heidelberg, Berlin., Springer-Verlag.

Noda M, S. S., Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al (1984). "Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence." *Nature* **312**(5990): 121-127.

Noda, M., Ikeda, T., Kayano, T., Suzuki, H., Takeshina, H., Kurasaki, M., Takahashi, H., Numa, S. (1986). "Existence of distinct sodium channel messenger RNA's in rat brain." *Nature* **320**:188-192.

Papazian, D. M., Schwartz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1987). "Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*." *Science* **237**: 749-753.

Pardo, L. A., Heinemann, S. H., Terlau, H., Ludewig, U., Lorra, C., Pongs, O., Stuhmer, W. (1992). "Extracellular K<sup>+</sup> specifically modulates a rat brain K<sup>+</sup> channel." *PNAS USA* **89**(6): 2466-2470.

Parent, A. (1979). "Identification of the Pallidal and Peripallidal cells projection to the Habenula in monkey." .

Parent, A. H., L. N. (1995<sup>a</sup>). "Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop." *Brain Research Reviews* **20**: 91-127.

Parent, A., Hazrati, L-N. (1995<sup>b</sup>). "Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry." *Brain Res Rev.* **20**: 169-173.

Park, M. R., Falls, W. M. , Kitai, S. T. (1982). "An intracellular HRP study of the rat globus pallidus. I. responses and light microscopic analysis." *J. of Comp. Neurol* **211**: 281-294.

Patil, N., Cox, D. R., Bhat, D., Faham, M., Myers, R. M., Peterson, A. S. (1995). "A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation." *Nat Genet* 11(2): 126-129.

Paxinos, G., Watson, C. (1982). "The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, NY.

Payet, M. D., Dupuis, G. J. (1992). "Dual regulation of the n type K<sup>+</sup> channel in Jurkat T lymphocytes by protein kinases A and C". *Biol Chem*; 267(26):18270-3

Pemey, T. M., Kaczmarek, L. K. (1991). "The molecular biology of K<sup>+</sup> channels." *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3(4): 663-670.

Pemey, T. M., Marshall, J., Martin, K. A., Hockfield, S., Kaczmarek, L. K. (1992). "Expression of the mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain." *J. Neurophysiol.* 68(3): 756-766.

Petersen, O. H., Findlay, I. (1987). "Electrophysiology of the pancreas." *Physiol Rev* 67(3): 1054-1116.

Pongs, O., Kecskethy, N., Muler, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H. H., Canal, I., Llamazares, S., Ferrus, A. (1988). "*Shaker* encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*." *EMBO* 7: 1087-1096.

Pongs, O. (1992). "Molecular biology of voltage-dependent potassium channels." *Physiol. Rev.* 72: s69-s88.

Pongs, O. (1995). "Regulation of the activity of voltage-gated potassium channels by  $\beta$  subunits." *Seminars in the neurosciences.* 7: 137-146.

Quast, U., Baumlin, Y., Loffler, C. (1995) "Ba<sup>2+</sup> differentially inhibits the Rb<sup>+</sup> efflux promoting and the vasorelaxant effects of levromakalim and minoxidil sulfate in rat isolated aorta". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353(1):86-93

Ramaswani, M., Tanouye, M. A. (1989). "Two sodium-channel genes in *Drosophila*: implications for channel diversity" *PNAS USA* 86(6) 2079-2082

Rajakumar, N., Rushlow, C. C., Naus, G., Elisevich, K., Flumerbelt, B. A. (1994<sup>b</sup>). "Neurochemical compartmentalization of the globus pallidus in the rat: an immunocytochemical study of calcium-binding proteins." *J. of Comp. Neurol.* **346**: 337-348.

Rajakumar, N., Elisevich, K., Flumerbelt, B. A. (1994<sup>b</sup>). "Parvalbumin-containing GABAergic neurons in the basal ganglia output system of the rat." *J. of Comp. Neurol.* **350**: 324-336.

Ranganathan, R. (1994). "Evolutionary origins of ion channels." *PNAS USA* **91**(9): 3484-3486.

Reiner, A., Krause, J. E., Keyser, K. T., Eldred, W. D., McKelvy, J. F. (1984). "The distribution of substance P in turtles: A radioimmunoassay and immunohistochemical study." *J. Comp. Neurol.* **226**: 50-73.

Reiner, A. (1987). "A LANT6-like substance that is distinct from neuromedin N is present in pallidal and striatal neurons in monkeys." *Brain Res.* **422**: 186-191.

Reiner, A., Anderson, K. D. (1993). "co-occurrence of GABA, parvalbumin and the neurotensin-related neuropeptide LANT6 in Pallidal, Nigral and Striatal neurons in pigeons and monkeys." *Brain Research* **624**: 317-325.

Rettig, J., Wunder, F., Stocker, L., Lichtinghagen, R., Mastiaux, F., Beckh, S., Pedarzani, P., Schote, K. H., Ruppertsberg, J. P., Veh, R., Pongs, O. (1992). "Characterization of *Shaw*-related potassium channel family in rat brain". *EMBO. J.* **11**: 2473-2486.

Rettig, J., Heinemann, S. H., Wunder, F., Iorra, C., Percej, D. N., Dolly, J. D., Pongs, O. (1994). "Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by the presence of  $\beta$  subunits". *Nature* **369**: 289-294.

Ried, T., Rudy, B., Vega-Saenz de Miera, E., Lau, D., Ward, D. C., Sen, K. (1993). "Localization of a highly conserved human potassium channel gene (NGK2-KV4; KCNC1) to chromosome 11p15. *Genomics* **15**(2): 405-411.

Riedel, A., Hartig, W., Fritschy, J. M., Bruckner, G., Seifert, U., Brauer, K. (1998). "Comparison of the rat dorsal and ventral striatopallidal system. A study using the GABA(A)-receptor  $\alpha$ 1-subunit and parvalbumin immunolabeling." *Exp. Brain Res.* **121**(2): 215-221.

Robertson, B. (1997). "The real life of voltage-gated K<sup>+</sup> channels: more than model behaviour." *TIPS* 18: 474-483.

Rogart, R. B., Cribbs, L. L., Muglia, L. K., Kephart, D. D., Kaiser, M. W. (1989). "Molecular cloning of a putative tetrodotoxin resistant rat heart sodium channel isoform." *PNAS USA* 86(20): 8170-8174.

Rudel, R., Lehmann-Horn, F. (1985). "Membrane changes in cells from myotonia patients." *Physiol Rev* 65(2): 310-356.

Rudy, B., Hoyer, J. H., Lester, H. A., Davidson, N. (1988<sup>a</sup>). "At least two mRNA species contribute to the properties of rat brain A-type potassium channels expressed in *Xenopus oocytes*." *Neuron* 1: 649-658.

Rudy, B., Hoyer, J. H., Lester, H. A. (1988<sup>b</sup>). "At least two mRNA species contribute to the properties of rat brain A-type potassium channels expressed in *Xenopus Oocytes*." *Neuron* 1: 649-658.

Rudy, B. (1988<sup>c</sup>). "Diversity and ubiquity of K channels." *Neuroscience* 25: 729-749.

Rudy, B., Sen, K., Vega-Saenz de Miera, E., Lau, D., Ried, T., Ward, D. C. (1991<sup>d</sup>). "Cloning of a human cDNA expressing a high voltage activating, TEA sensitive, type A K<sup>+</sup> Channel which maps to chromosome 1 band p21." *J. Neurosci Res.* 29: 401-412.

Rudy, B., Kentros, C., Vega-Saenz de Miera, E. (1991<sup>e</sup>). "Families of K<sup>+</sup> channel genes in mammals: toward an understanding of the molecular basis of K channel diversity." *Mol. Cell. Neurosci.* 2: 89-102.

Rudy, B., Kentros, C., Weiser, M., Fruhling, D., Serodio, P., Vega-Saenz de Miera, E., Ellisman, M., Pollock, J. A., Baker, H. (1992). "Region-specific expression of a K<sup>+</sup> channel gene in brain." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4603-4607.

Ruppertsberg, J. P., Schroter, K. H., Sakman, B., Stocker, M., Sewing, S., Pongs, O. (1990). "Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins." *Nature* 345(6275): 535-537.

Saini, K. S., Summerhayes, I. C., Thomas, P. (1990). "Molecular events regulating messenger RNA-stability in eucaryotes." *Mol. Cell. Biochem.* 96: 15-23.

Salinas, M., de Weille, J., Guillemare, E., Lazdunski, M., Hugnot, J. P. (1997<sup>a</sup>). "Modes of regulation of *Shab* K<sup>+</sup> channel activity by the Kv 8.1 subunit." *J. Biol. Chem.* **272**(13): 8774-8780.

Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J. P., Lazdunski, M. (1997<sup>b</sup>). "New modulatory  $\alpha$  subunits for mammalian *Shab* K<sup>+</sup> channels." *J. Biol. Chem.* **272**(39): 24371-24379.

Salkoff, L. (1983). "Genetic and voltage-clamp analysis of a *Drosophila* potassium channel." *Clod Spring Harbor Symposium on Molecular Biology* **48**: 221-231.

Salkoff, L., Baker, K., Butler, A., Covarubias, M., Pak, M. D., Wei, A. (1992). "An essential "set" of K<sup>+</sup> channels conserved in flies, mice and humans." *Trends Neurosci.* **15**: 161-166.

Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., Keating, M. T. (1995). "A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel." *Cell* **81**(2): 299-307.

Schroter, K. H., Rupersberg, J. P., Wunder, F., Retting, J., Stocker, M., Pongs, O. (1991). "Cloning and functional expression of a TEA-sensitive A-type potassium channel from rat brain." *FEBS Lett.* **278**(2): 211-216.

Schwab, R. S., Chafetz, M. E., Walker, S. (1954). "Control of two simultaneous voluntary motor acts in normal and Parkinsonisms." *Arch. Neurol.* **72**: 591-598.

Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Papazian, D. M., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1988). "Multiple potassium-channels components are produced by alternative splicing at the *Shaker* locus in *Drosophila*." *Nature* **331**: 137-142.

Sekirnjak, C., Martone, M. E., Weiser, M., Deerinck, T., Bueno, E., Rudy, B., Ellisman, M. (1997). "Subcellular localization of the K<sup>+</sup> channel subunit Kv3.1b in selected rat CNS neurons." *Brain Res.* **766**(1-2): 173-187.

Serodio, P., Kentros, C., Rudy, B. (1994). "Identification of molecular components of A channels activating at subthreshold potential." *J. Neurophysiol* **72**: 1516-1529.

Shammah-Lagnado, S. J., Alheid, G. F., Heimer, L. (1996). "Efferent connections of the caudal-part of the globus pallidus in the rat." *J. Comp. Neurol.* **367**: 489-507.

Shen, N. V., Chen, X., Boyer, M. M., Pfaffinger, P. J. (1993). "Deletion analysis of K<sup>+</sup> channel assembly." *Neuron* 11: 67-76.

Shuster, M. J., Camardo, J. S., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. (1986). "Modulation of the 'S' K<sup>+</sup> channel by cAMP-dependent protein phosphorylation in cell-free membrane patches." *Prog Brain Res* 69: 119-132.

Snutch, T. P., Tomlinson, W. J., Leonard, J. P., Gilbert, M. M. (1991). "Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS." *Neuron* 7:45-57

Snutch, T. P., Reiner, P. B. (1992). "Ca<sup>2+</sup> channels: diversity of form and function." *Curr Opin Neurobiol* 2: 247-253.

Stansfeld, C. E., Marsh, S. J., Parcej, D. N., Dolly, J. O., Brown, D. A. (1987). "Mast cell degranulating peptide and dendrotoxin selectively inhibit a fast-activating potassium current and bind to common neuronal proteins." *Neuroscience* 23:893-902

Stefani, A., Calabresi, P., Mercuri, N. B., Bernardi, G. (1992). "A-current in rat globus pallidus: a whole-cell voltage clamp study on acutely dissociated neurons." *Neurosci. Lett* 144(1-2): 4-8.

Stefani, A., Pisani, A., Bonci, A., Stratta, F., Bernardi, G. (1995). "Outward potassium currents activated by depolarization in rat globus pallidus." *Synapse* 20(2): 131-136.

Steriade, M., Datta, S., Pare, D., Oakson, G., Curro-Dossi, R. C. J. (1990) "Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems". *Neurosci* 1990 (8):2541-59

Stom, J. F. (1987). "Action potential repolarization and a fast afterhyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells." *J. Physiol.* 385: 733-759.

Stuhmer, W., Stocker, M., Sakmann, B., Seeburg, P., Baumann, A., Grupe, A., Pongs, O. (1988). "Potassium channels expressed from rat brain cDNA have delayed rectifier properties." *FEBS Lett.* 242: 199-206.

Steward, O., Banker, G. A. (1992). "Getting the messenger from the gene to the synapse: sorting and intracellular transport of RNA in neurons." *TINS* 15(5): 180-186.

Tang L., Kallen R. G., Horn R. J. (1994) "Role of an S4-S5 linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and a peptide blocker". *Gen. Physiol.* 108(2):89-104

Tanouye, M. A., Ferrus, A., Fujita, S. (1981). "Abnormal action potentials associated with the *Shaker* complex locus of *Drosophila*." *PNAS USA* 78: 6548-6552.

Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwartz, T. L., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1987). "Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*." *Science* 237: 770-775.

Tempel, B. L., Yan, Y. N., Jan, L. Y. (1988). "Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain." *Nature* 332: 837-839.

Thomsen, W. J., Catterall, W. A. (1989). "Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology." *PNAS USA* 86(24): 10161-10165.

Timpe, L. C., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1988<sup>b</sup>). "Four cDNA clones from the *Shaker* locus of *Drosophila* induce kinetically distinct type A potassium currents in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 1(8): 659-667.

Timpe, L. C., Schwartz, T. L., Tempel, B. L., Papazian, D. M., Jan, Y. N., Jan, L. Y. (1988<sup>b</sup>). "Expression of functional potassium channels from shaker cDNA in *Xenopus*. *Nature* 331(6152) 143-145.

Trimmer, J. S., Cooperman, S. S., Tomiko, S. A., Zhou, J. Y., Crean, S. N., Boyle, M. B., Kallen, R. G., Zheng, Z. H., Barchi, R. L. (1989) "Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel." *Neuron* 3(1): 33-49.

Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R., Fox, A. P. (1988). "Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation." *Trends Neurosci* 11(10): 431-438.

Urena, J., Lopez-Lopez, J., Gonzalez, C., Lopez-Bameo, J. (1989). "Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body." *J Gen Physiol* 93(5): 979-999.

Vega-Saenz de Miera, E., Lin, J. W. (1992<sup>a</sup>). "Cloning of ion channel gene families using the polymerase chain reaction." *Methods Enzymol* 207: 613-619.

Vega-Saenz de Miera, E., Moreno, H., Fruhling, D., Kentros, C., Rudy, B. (1992<sup>b</sup>). "Cloning of *Shlll* (*Shaw*-like) cDNAs encoding a novel high-voltage-activating, TEA-sensitive, type-A K<sup>+</sup> channel." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **248**(1321): 9-18.

Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B. (1992<sup>c</sup>). "Modulation of K<sup>+</sup> channels by hydrogen peroxide." *Biochem Biophys Res Commun* **186**(3): 1681-1687.

Vega Saenz de Miera, E., Weiser, M., Kentros, C., Lau, D., Moreno, H., Serodio, P., Rudy, B. (1994). *Shaw*-related K<sup>+</sup> channels in mammals. *Handbook of membrane channels*. C. Peracchia. New York, NY, Academic press: 41-78.

Wang, H., Kunkel, D. D., Schwartzroin, P. A., Tempel, B. L. (1994). "Localization of Kv1.1 and Kv 1.2, two K<sup>+</sup> channel proteins to synaptic terminalssomata and dendrites in the mouse brain." *J. Neurosci* **509**: 183-194.

Watson, S., Abbot, A. (1992). "Receptor Nomenclature." *J. Pharmacol. Sciences* **13**: S1-S36.

Wej, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M., Salkoff, L. (1990). "K<sup>+</sup> current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse." *Science* **248**: 599-603.

Weiser, M., Vega-Saenz de Miera, E., Kentros, C., Moreno, H., Franzen, L., Hillman, D., Bajer, H., Rudy, B. (1994). "Differential expression of *Shaw*-related K<sup>+</sup> channels in the rat central nervous system." *J. Neurosci.* **14**(3 pt 1): 949-972.

Weiser, M., Bueno, E., Sekimak, C., Martone, M. E., Baker, H., Hillman, D., Chen, S., Thomhill, W., Ellisman, M., Rudy, B. (1995). "The potassium channel subunit Kv3.1b is localized to somatic and axonal membranes of specific populations of CNS neurons." *J. Neurosci.* **15**(6): 4298-4314.

Welsh, M. J., Fick, R. B. (1987). "Cystic fibrosis." *J Clin Invest* **80**(6): 1523-1526.

Wu, C. F., Ganetzky, B., Haugland, F. N., Liu, A. X. (1983). "Potassium currents in *Drosophila*: different components affected by mutations of two genes." *Science* **220**(4601): 1076-1078.

Wu, R. L. Barish., M.E. (1992). "Two pharmacologically and kinetically distinct transient potassium currents in cultured embryonic mouse hippocampal neurons." *J. Neurosci.* **12**(6): 2235-2246.

Yelnik, J., Percheron, G., Francois, G. (1984). "A Golgi analysis of the primate Globus Pallidus. II. Quantitative morphology and spatial orientation of dendritic arborizations." *J. of Comp. Neurol.* **227**: 200-213.

Yokoyama, S., Imoto, K., Kawamura, T., Higashida, H., Iwabe, N., Miyata, T., Numa, S. (1989). "Potassium channels from NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. Primary structure and functional expression from cDNAs." *FEBS Lett* **259**: 37-42.

# Kv3.1–Kv3.2 Channels Underlie a High-Voltage-Activating Component of the Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current in Projecting Neurons From the Globus Pallidus

R. HERNÁNDEZ-PINEDA,<sup>1,2</sup> A. CHOW,<sup>1</sup> Y. AMARILLO,<sup>1</sup> H. MORENO,<sup>1</sup> M. SAGANICH,<sup>1</sup> E. VEGA-SAENZ DE MIERA,<sup>1</sup> A. HERNÁNDEZ-CRUZ,<sup>2</sup> AND B. RUDY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Neuroscience and Department of Biochemistry, New York University School of Medicine, New York City, New York 10016; and <sup>2</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

Hernández-Pineda, R., A. Chow, Y. Amarillo, H. Moreno, M. Saganich, E. Vega-Saenz de Miera, A. Hernández-Cruz, and B. Rudy. Kv3.1–Kv3.2 channels underlie a high-voltage-activating component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in projecting neurons from the globus pallidus. *J. Neurophysiol.* 82: 1512–1528, 1999. The globus pallidus plays central roles in the basal ganglia circuitry involved in movement control as well as in cognitive and emotional functions. There is therefore great interest in the anatomic and electrophysiological characterization of this nucleus. Most pallidal neurons are GABAergic projecting cells, a large fraction of which express the calcium binding protein parvalbumin (PV). Here we show that PV-containing pallidal neurons coexpress Kv3.1 and Kv3.2 K<sup>+</sup> channel proteins and that both Kv3.1 and Kv3.2 antibodies coprecipitate both channel proteins from pallidal membrane extracts solubilized with nondenaturing detergents, suggesting that the two channel subunits are forming heteromeric channels. Kv3.1 and Kv3.2 channels have several unusual electrophysiological properties when expressed in heterologous expression systems and are thought to play special roles in neuronal excitability including facilitating sustained high-frequency firing in fast-spiking neurons such as interneurons in the cortex and the hippocampus. Electrophysiological analysis of freshly dissociated pallidal neurons demonstrates that these cells have a current that is nearly identical to the currents expressed by Kv3.1 and Kv3.2 proteins in heterologous expression systems, including activation at very depolarized membrane potentials (more positive than -10 mV) and very fast deactivation rates. These results suggest that the electrophysiological properties of native channels containing Kv3.1 and Kv3.2 proteins in pallidal neurons are not significantly affected by factors such as associated subunits or posttranslational modifications that result in channels having different properties in heterologous expression systems and native neurons. Most neurons in the globus pallidus have been reported to fire sustained trains of action potentials at high-frequency. Kv3.1–Kv3.2 voltage-gated K<sup>+</sup> channels may play a role in helping maintain sustained high-frequency repetitive firing as they probably do in other neurons.

## INTRODUCTION

A large number of subunits of mammalian K<sup>+</sup> channels expressed in the CNS have been identified after the cloning of the *Shaker* gene in *Drosophila* in 1987 (reviewed in Chandy and Guzman 1995; Coetzee et al. 1999; Jan and Jan 1997;

Pongs 1992; Rudy et al. 1991a). This work has revealed the existence of an extraordinary diversity of molecular components of voltage-gated K<sup>+</sup> channels, predicting a functional diversity well beyond that expected from prior functional studies (Rudy 1988). The cloning studies have allowed enormous progress in the understanding of the molecular mechanisms of channel function, including the recent crystallization and high resolution structural analysis of a K<sup>+</sup> channel (Doyle et al. 1998). Less progress has been obtained in understanding the physiological significance of the molecular diversity. A major task of future research is to identify physiological roles of the cloned proteins, starting with the identification of native channels containing specific types of cloned subunits.

Among the cloned subunits are the members of the Kv and KCNQ (or KQT) families of K<sup>+</sup> channel proteins, which are pore-forming components of voltage-gated K<sup>+</sup> channels (Chandy and Guzman 1995; Coetzee et al. 1999; Jan and Jan 1997; Pongs 1992; Rudy et al. 1991a). The Kv family is divided into several subfamilies based on sequence similarities. Nearly 30 Kv proteins classified in eight subfamilies (Kv1–Kv6 and Kv8–Kv9) are known to date (Coetzee et al. 1999).

The goal of this study was to identify the currents mediated by channels containing proteins of the Kv3 subfamily in neurons. There are four known Kv3 genes (Kv3.1–Kv3.4). In heterologous expression systems, Kv3.1 and Kv3.2 proteins express tetraethylammonium (TEA)-sensitive delayed rectifier type currents, whereas Kv3.3 and Kv3.4 proteins form transient, TEA-sensitive, A-type K<sup>+</sup> channels (reviewed in Vega-Saenz de Miera et al. 1994). However, native channels may differ from those formed by a given Kv subunit in heterologous expression systems. Kv proteins can form heteromeric channels with novel properties with other members of the same subfamily (Christie et al. 1990; Covarrubias et al. 1991; Isacoff et al. 1990; K. McCormack et al. 1990; Ruppersberg et al. 1990; Weiser et al. 1994). Moreover the functional characteristics of K<sup>+</sup> channels, including those of the Kv family, also can be modified by accessory subunits and posttranslational modifications (Barhanin et al. 1996; Coetzee et al. 1999; Covarrubias et al. 1994; Heinemann et al. 1996; McDonald et al. 1997; Sanguinetti et al. 1996; Serodio et al. 1994, 1996).

We have shown previously in a study combining immunohistochemical and electrophysiological analysis in slice preparations that drugs that block Kv3.1 currents in heterologous

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

expression systems blocked a fraction of the  $K^+$  current from hippocampal interneurons expressing Kv3.1b proteins that resembles Kv3.1 currents in activation and deactivation properties (Du et al. 1996). However, limitations associated with voltage clamping intact neurons in slices prevented a detailed comparison of the properties of the putative Kv3.1-mediated currents in these cells with the properties of Kv3.1 currents in heterologous expression systems. Both Kv3.1 and Kv3.2 proteins are strongly expressed in neurons of the globus pallidus (GP), suggesting that these cells might be a good system to study the properties of native Kv3.1-Kv3.2 channels using voltage-clamp methods (Moreno et al. 1995; Weiser et al. 1994, 1995). Moreover, methods to dissociate these neurons from rat brain have been developed (Stefani et al. 1992, 1995; Surmeier et al. 1994). Freshly dissociated and short term cultured cells are a good system for this kind of study, allowing improved conditions for space clamp and pharmacological analysis.

We have used whole cell patch-clamp methods to analyze the voltage-dependent  $K^+$  currents of freshly dissociated rat GP neurons to determine whether they contain currents with properties similar to those carried by Kv3.1-Kv3.2 channels. Because of its central roles in movement control and perhaps also cognitive functions, there is great interest in the anatomic and physiological characterization of the GP (Chang et al. 1987; Chudler and Dong 1995; DeLong 1971, 1972; DiFiglia and Rafols 1988; Graybiel and Ragsdale 1979; Hauber et al. 1998; Kita 1992, 1994; Kita and Kitai 1991, 1994; Moritsumi and Hattori 1992; Nambu and Llinas 1994, 1997; Parent and Hazrat 1995a,b; Park et al. 1982; Schneider et al. 1985; Stefani et al. 1992; Surmeier et al. 1994). The present studies contribute novel information on the classification and cellular properties of pallidal neurons.

Previous electrophysiological analysis of the  $K^+$  currents of pallidal neurons, in the same species, revealed a low voltage-activating fast inactivating current ( $I_{A1}$ ), a component with slower inactivation and slow recovery from inactivation that is blocked by micromolar concentrations of 4-AP ( $I_{A2}$ ), and two maintained components one blocked ( $I_{K1}$ ) and one not blocked by 10 mM TEA (Stefani et al. 1992, 1995). None of these components resembles Kv3 currents. These observations do not necessarily indicate that Kv3 currents are either absent in pallidal neurons or have properties different from those of Kv3 currents in heterologous expression systems because the methods that are used in a given study to isolate individual components of the total  $K^+$  current are tailored to the goals of the particular investigation. Therefore electrophysiological experiments specifically designed to search for native currents with properties similar to those of Kv3.1-Kv3.2 currents *in vitro* are required before we can conclude whether or not native Kv3.1-Kv3.2 channels in pallidal neurons have properties similar to those in heterologous expression systems.

In this study, we first analyzed the expression of Kv3.1 and Kv3.2 proteins in the rat GP with specific antibodies. We also determined the developmental expression of these proteins, allowing us to select tissue at developmental stages in which the proteins are robustly expressed in pallidal neurons. We used pharmacological and electrophysiological protocols on freshly dissociated neurons appropriate for the isolation of Kv3-like currents and compared these currents to those recorded under identical conditions from mammalian cells trans-

fectured with Kv3.1 and Kv3.2 cDNAs. The expression of Kv3 transcripts in the same cells was confirmed by single cell RT-PCR. The studies described here have been previously presented in abstract form (Hernández-Pineda et al. 1996; Pineda et al. 1998).

## METHODS

### Antibodies to Kv3.1 and Kv3.2 proteins

Site-specific antibodies against Kv3.1b proteins were prepared by injecting into rabbits the peptide CKESPVIKYMPTAEVRVT coupled via the cysteine to keyhole limpet hemocyanin (KLH). The peptide corresponds to the carboxyl terminal sequence of the Kv3.1b protein (residues 567-585) (Weiser et al. 1995). The characterization of this antibody was described previously (Weiser et al. 1995). To raise antibodies against Kv3.2 proteins, rabbits were injected with the peptides: CTPDLIGGDPGDDDELGGKR and CTPDLIGGDPGDDDELAAKR coupled via the cysteine to KLH (Chow et al. 1999). The peptides correspond to a sequence present in the constant region of the rat and mouse Kv3.2 proteins, respectively (residues 171-189 plus an N-terminal cysteine added to facilitate coupling), before the first membrane-spanning domain in an area not conserved among different  $K^+$  channel proteins (Vega-Saenz de Miera et al. 1994; see T. McCormack et al. 1990 for the rat sequence). The mouse sequence has not been published, but it is identical to that in rat except for the substitution of glycines (186-187 by alanines). For affinity purification, the respective peptides were coupled to Sulfolink Sepharose resin (Pierce, Rockford, IL) via the cysteine residue and the sera purified following supplier's protocols.

### Immunofluorescence labeling

Male Sprague-Dawley rats (2-3 wk old) or male C57Bl6 mice (6-8 wk old), as well as Kv3.1 -/- (Ho et al. 1997) or Kv3.2 -/- (Lau et al. 1999) mice, were anesthetized with an injection of pentobarbital sodium (120 mg/kg ip) and perfused transcardially with 10-20 ml Heparin (1 U/ml) in phosphate-buffered saline (PBS: 0.06 M sodium phosphate buffer, 0.85% sodium chloride, pH 7.35) at room temperature followed by 100-200 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4. The brain was dissected out and blocked coronally into ~5 mm portions, postfixed for 30 min in the same fixative at room temperature and placed in 30% sucrose in PBS for 12-24 h at 4°C. When the tissue had sunk in the sucrose solution, 50- $\mu$ m sections were produced using a freezing microtome and collected in PBS. The sections were washed twice for 15 min in PBS and incubated in a blocking solution containing 10% normal goat serum (Jackson Immuno Research), 1% bovine serum albumin (Jackson Immuno Research), 0.2% cold water fish gelatin (Sigma Chemicals), and 0.2% Triton X-100 (Sigma Chemicals) in PBS for 1 h to minimize nonspecific binding. The sections then were incubated with primary antibody at the appropriate dilution in a working buffer (0.1 $\times$  blocking solution in PBS) for 12-24 h at 4°C. For double-labeled sections, a primary rabbit antibody, anti-Kv3.1b or anti-Kv3.2, and a primary mouse antibody, anti-parvalbumin (Sigma Immunochemicals) were added simultaneously. After three 15 min washes in PBS, secondary antibodies diluted in working buffer were applied for 15 min at room temperature. The following secondary antibodies were used, Cy2-conjugated goat anti-mouse IgG and Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research). After two 15 min washes in PBS, the sections were mounted onto glass slides and coverslipped with elvanol.

The following primary antibody concentrations were used: antibodies against Kv3.1b (Weiser et al. 1995) at 1:50, Kv3.2 (Chow et al. 1999) at 1:50, parvalbumin (Sigma Immunochemicals) at 1:400. Secondary fluorescent antibodies were used at 1:500. The atlas by Paxinos and Watson (1986) and the book edited by Paxinos (1995) were

used as guides to identify CNS neuronal populations and axonal projections.

Images were taken either with a Zeiss Axiophot fluorescent microscope or an Axiovert 35 M confocal microscope, with a  $\times 40$  (NA 1.3) or  $\times 63$  (NA 1.4) objective lenses. Fluorescent images were recorded using a scanning laser attachment (MRC-600 and MRC-1000, Bio-Rad Laboratories) and a krypton/argon mixed gas laser. Images were collected digitally and transferred to a graphics program (Adobe Photoshop 4.0). After brightness and contrast adjustments, the image files were printed on a Tektronix printer (Phaser 440).

#### Immunoblots

Rat brain membrane extracts were prepared from a P3 fraction of tissue homogenate (Hartshorne and Catterall 1984) solubilized for 1 h in a 2% Triton X-100 solution containing (in mM) 50 potassium phosphate buffer, pH 7.4; 50 KCl; 2 EDTA; 1 pepstatin A, 1 1,10-phenanthroline, 0.2 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 1 iodoacetamide to inhibit proteases. The suspension was spun at 100,000 g to remove nonsolubilized material, and the top two-thirds of the supernatant used for further experiments. To prepare membrane extracts from the GP, the nucleus was dissected from slices prepared as described for the preparation of dissociated neurons (see following text) and proteins solubilized as described in the preceding text.

To prepare immunoblots, 50  $\mu$ g of membrane protein was mixed 1:1 with a sample buffer [10% (vol) glycerol, 5% (vol)  $\beta$ -mercaptoethanol, 60 mM Tris-HCl pH 6.8; 0.001% (weight) bromophenol blue and 3% SDS], heated for 3 min at 80°C, and electrophoresed in a 8% SDS polyacrylamide gel (Harlow and Lane 1988). The electrophoresed proteins were transferred onto a nitrocellulose filter (Bio Rad). Blots were incubated with either Kv3.2 antibodies at a 1:100 dilution or Kv3.1b antibodies at 1:2000, followed by incubation with horseradish peroxidase-linked anti-rabbit secondary antibodies (Promega). Bound antibodies were detected using chemiluminescence (Pierce).

#### Immunoprecipitation

Before immunoprecipitation, 300  $\mu$ l of solubilized membranes (~400  $\mu$ g protein) in 1% Triton X-100 in (in mM) 50 Tris, 150 NaCl, 1 EDTA, and 1 EGTA, pH 7.4, were precleared for 30 min at 4°C with protein A-Sepharose beads (Sigma Chemicals). After removing the beads, the extracts were incubated for 4 h at 4°C with Kv3.2 antibodies at a 1:10 dilution or Kv3.1b antibodies at 1:50 dilution. At the end of the incubation period, fresh protein A-Sepharose beads were added, and the suspension was incubated for 2–3 h at 4°C with shaking. The complexed beads were collected and washed three times in 1% Triton X-100 in (in mM) 50 Tris, 150 NaCl, 1 EDTA, and 1 EGTA, pH 7.4. Proteins then were extracted by adding an equal volume of sample buffer, heated for 3 min at 80°C and processed for immunoblotting as described in the preceding text.

#### Culture of chinese hamster ovary (CHO) cells

CHO cells were cultured in  $\alpha$ -MEM (pH 7.4, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL) in the presence of penicillin and streptomycin at 37°C in a 95% O<sub>2</sub> with 5% of CO<sub>2</sub> atmosphere in 100-mm-diam culture dishes (Costar, Cambridge, MA). When the cells were confluent, the monolayer was incubated with trypsin-EDTA (GIBCO BRL) for  $\leq 1$  min, and the cells resuspended in  $\alpha$ -MEM containing 10% of FBS and plated at a 1/5 dilution in new 100 mm dishes. The medium was changed every 2 days, and the cells passed every 4 days.

#### Functional expression of Kv3.1 and Kv3.2 potassium channels in CHO cells

To study Kv3.2 currents, we used the Kv3.2a stably transfected cell line previously described (Moreno et al. 1995). To study Kv3.1

currents, wild-type CHO cells were transiently transfected with Kv3.1b cDNA. After reaching 90% confluence in 100 mm dishes, CHO cells were trypsinized and resuspended in 2 ml of  $\alpha$ -MEM with 10% FBS. One milliliter of the cell suspension was diluted and plated in 30 mm dishes at 40% confluence. Two to 4 h later, when the cells had attached to the bottom of the dish, they were washed two times with  $\alpha$ -MEM without serum and transfected with Lipofectamine (Life Technologies, Gaithersburg, MD) following the manufacturer's protocols. To identify transfected cells, they were cotransfected with a second plasmid containing the cDNA encoding the reporter protein Green Fluorescent Protein (GFP, Life Technologies, Gaithersburg, MD). Transfected cells were detected by the emission of green fluorescence (520 nm) under epifluorescence with 488 nm excitation light. Typically, electrophysiological recordings were carried out 1–2 days after transfection.

#### Dissociation of neurons from the GP

Young Sprague-Dawley rats 10–16 days of age were used. The brain was quickly removed and submerged in ice-cold normal extracellular solution (NES) containing (in mM) 130 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub>, and 5 glucose, pH 7.4. The solution was gassed with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> for 15 min before starting the dissociation and then continuously during the procedure. Once the cerebellum had been removed, the brain hemispheres were separated along the midline and cut in the parasagittal plane with a vibratome (Campden Instruments, London, UK) in 400  $\mu$ m slices. The slices were collected and maintained in ice-cold NES solution. The GP was identified by visual inspection under a stereomicroscope (see Fig. 7). The GP from four to seven slices was dissected out and subjected to enzymatic digestion for 25–35 min (depending on the age of the animal) at 37°C in NES with Pronase (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). The tissue then was washed three times in NES without calcium and triturated mechanically by means of glass Pasteur pipettes with tips of decreasing diameters in a final volume of 2 ml. An aliquot (~500  $\mu$ l) of the cell suspension was seeded in a recording chamber (RC-13, Warner Instruments, Hamden, CT) and mounted on the plate of an inverted microscope for electrophysiological recording. The cells were perfused continuously (~1 ml/min) with NES at room temperature.

#### Electrophysiological analysis

Electrophysiological recordings used voltage clamp under the whole cell configuration of the patch-clamp technique (Hamill et al. 1981). The same extracellular and intracellular solutions were used for recordings with CHO cells and pallid neurons. Extracellular solution (NES) was supplemented with 1  $\mu$ M tetrodotoxin (TTX; Alomone, Jerusalem, Israel) and 200  $\mu$ M of CdCl<sub>2</sub> (Sigma Chemical) to block voltage-dependent sodium and calcium currents, respectively. By inhibiting calcium influx, CdCl<sub>2</sub> also limited the activation of calcium-activated potassium currents. Potassium channel blockers (TEA, Sigma; 4-AP, Aldrich; charybdotoxin and dendrotoxin, Alomone) were dissolved in NES with TTX and CdCl<sub>2</sub>. All the experiments were carried out at room temperature (21–23°C).

The recording patch electrodes were made with borosilicate glass capillary tubes (GC120F-10, Warner Instrument) filled with an intracellular solution containing (in mM) 106 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-K, 10 BAPTA-K (Molecular Probes, Eugene, OR), 2 ATP-Mg, and 0.5 GTP (Sigma Chemicals); pH 7.35 with NaOH. The use of a high concentration of the fast calcium chelator bis-(*o*-aminophenoxy)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA) was aimed at further limiting the activation of calcium-activated membrane conductances. The typical resistances of the electrodes when filled with this solution varied between 2.5 and 3.0 M $\Omega$ . The patch pipette Ag-CI wire was connected to the input of an Axopatch-1D or Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). To generate voltage clamp

protocols and for data acquisition and analysis, we used the pClamp software (Axon Instruments). Large neurons with short processes ( $<40 \mu\text{m}$ ) were selected for recording. Series resistance was estimated from the time constant of the capacity transient and ranged between 5 and 10 M $\Omega$  in the cells used for analysis. The series resistance was compensated (70–80%) and monitored throughout the course of the experiment. If the series resistance could not be compensated or if it changed by  $>20\%$ , the cell was discarded. Input capacitance of the cells included in this study ranged between 15 and 33 pF and the time constant of the capacity current transient between 0.18 and 0.31 ms. Drugs were applied locally by means of a puffer pipette with a relatively wide tip (10  $\mu\text{m}$ ), made of a pulled borosilicate glass capillary and placed with a second micromanipulator to a distance of 100–200  $\mu\text{m}$  of the cell. The application was made either by gravity or pressure pulses (10 psi) controlled with a picospritzer device (General Valve).

#### Single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction (single-cell RT-PCR)

The presence of Kv3s mRNAs in dissociated GP cells was determined by single-cell RT-PCR. This was performed as described by Vega-Saenz de Miera et al. (1997) with the following modifications: the solutions were prepared in double-distilled RNase-free water from Sigma. The content of individual cells was collected from the recording chamber using gentle suction with a wide tip glass micropipette filled with 3  $\mu\text{l}$  of a solution containing 150 mM KCl, 30 mM Tris-HCl, pH 8.3, and 10 U of Promega RNase inhibitor. The tip of the pipette was broken inside a 500- $\mu\text{l}$  Eppendorf tube, and its contents emptied. The tubes were placed in dry ice-ethanol bath to freeze the contents and then stored at  $-70^\circ\text{C}$  until use.

For reverse transcription, 17  $\mu\text{l}$  of a solution containing 1.18 mM dNTP, 3.82 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 U of Moloney Murine Leukemia Virus RNase H minus reverse transcriptase (Gibco-BRL), 4.4  $\mu\text{M}$  random hexamer primer (Pharmacia), 20 U/ml of RNase inhibitor, 30 mM KCl, and 6 mM Tris-HCl, pH 8.3, were added to the Eppendorf tube containing the neuron's contents. Mineral oil (50  $\mu\text{l}$ ) were laid on top of the aqueous solution and the tubes incubated successively at 25°C for 5 min, 37°C for 15 min, and 42°C for 15 min. The tubes then were heated at 94°C for 5 min and then cooled to 0°C until used for PCR amplification.

For PCR amplification, 75  $\mu\text{l}$  of a solution containing 50 mM KCl, 0.85 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.7  $\mu\text{M}$  of the sense and antisense external primers, and 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 were added to the tubes containing the reverse-transcribed DNA. The tubes were heated for 5 min at 94°C. While the tubes were at 94°C, 5  $\mu\text{l}$  of a solution containing 2.5 units of Perkin Elmer Taq polymerase, 50 mM KCl, and 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 were introduced through the oil. The tubes then were subjected to 35 cycles of denaturalization at 94°C for 1 min, annealing at 48°C for 1 min, and extension at 72°C, for 1 min followed by one final incubation at 72°C for 7 min. One microliter of a 1:1 dilution of the previous reaction was used as template for the second PCR reaction in a new PCR tube. 94  $\mu\text{l}$  of a solution containing 2.63 mM MgCl<sub>2</sub>, 210  $\mu\text{M}$  dNTPs, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, and 160 nM of the specific primers were added to these tubes. Oil (50  $\mu\text{l}$ ) was laid on top and the tubes heated and Taq polymerase added as described in the preceding text. The tubes were subjected to 35 cycles of PCR amplification (1 min each of denaturalization, annealing and extension at 94, 55, and 72°C, respectively) followed by a fast extension period at 72°C for 7 min. The PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels.

The external degenerate primers, designed to amplify all Kv3 sequences, from *Drosophila* to man, used in the first PCR reaction, had the following sequences: sense primer, CTC GAA TTC TTT(C/T) TG(C/T) (C/T)TN (A/G)(A/G) ACN CA; antisense primer, CTC-GAATTC GGA (A/G)TA (A/G)TA CAT N(C/G)C (G/A)AA (G/A)TT. The sequence for the specific primers was: Kv3.1, sense

primer: CGC TTC AAC CCC ATC GTG AAC (position 1801–1821 in Accession No. M68880); antisense primer: GTG TGT GTG TTC GCT GGC GCT (2290–2310). The size of the expected product is 532bp. Kv3.2, sense primer CC AGC GCT GTT CTC CAG TAT (882–901 in No. M34052); antisense primer: C AAT GGG GAT GTT TTT GAA CTG (1358–1337). The size of the expected product is 477 bp. Kv3.4, sense primer: CCT GAT ACG TTT GAC TTT GTC (1312–1333 in No. X62841), antisense primer: ATT GCC CCG TGG GTC AGA T (1629–1647). The size of the expected product is 336 bp.

## RESULTS

### Expression of Kv3.1 and Kv3.2 proteins in the rat GP

Kv3 mRNAs are not expressed at significant levels before birth (Goldman-Wohl et al. 1994; Perney et al. 1992; Vega-Saenz de Miera et al. 1994; reviewed in Rudy et al. 1999). Immunoblots using antibodies against Kv3.1 (Weiser et al. 1995) and Kv3.2 (Chow et al. 1999) were used to study the postnatal developmental expression of Kv3.1 and Kv3.2 proteins in membrane extracts from the GP (Fig. 1B). Membranes were prepared from GP dissected in the same fashion as the tissue used to prepare dissociated neurons (Fig. 7D). The levels of both proteins increased significantly after postnatal days 6–8, although it appears that the expression of Kv3.1 develops somewhat faster than the expression of Kv3.2. Maximum levels of Kv3.1 protein were seen around p15 (Fig. 1B, lanes 1–4), whereas for Kv3.2, maximum levels were not achieved until p20 (Fig. 1B, lanes 5–7). Both proteins were not detectable earlier than p6–7. Similar results were obtained in three separate experiments with each antibody.

The bands observed with Kv3.1 or Kv3.2 antibodies are not seen when the immunoblots are reacted with antibodies preincubated with an excess of the Kv3.1 (Weiser et al. 1995) or Kv3.2 peptides (Fig. 1A, lane 2) used to prepare the antisera. Also, no bands are detected in immunoblots treated with the preimmune sera derived from the rabbit used to raise the Kv3.2 antibodies (Fig. 1A, lane 3). Moreover, the Kv3.2 protein is absent in membranes derived from Kv3.2  $-/-$  mice (Fig. 1A, lane 5) but is present in membranes from Kv3.1  $-/-$  mice (Fig. 1A, lane 4), whereas the reverse is seen with Kv3.1 antibodies (Fig. 1A, lanes 6 and 7).

Immunohistochemistry was used to study the cellular and subcellular localization of Kv3.1 and Kv3.2 proteins in the rat GP (Fig. 2). Antibodies against Kv3.1 produced strong staining of the somatic membrane and the cytoplasm immediately beneath the membrane of neurons located throughout the GP (Fig. 2A). Fewer stained cells were seen in the most lateral border of the nucleus. The same section shown in Fig. 2A was stained with antibodies against parvalbumin (Fig. 2B). Most neurons positive for Kv3.1 also are stained for parvalbumin and vice versa. As in other neurons expressing Kv3.1, there is little staining of the dendrites of pallidal neurons. There was a faint staining of the pallidal neuropile (Fig. 2A). Higher magnification images from another experiment confirmed that Kv3.1b proteins and parvalbumin are expressed in the same pallidal neurons (Fig. 2, C–E), although parvalbumin staining tends to occupy most of the cytoplasm, whereas Kv3.1b staining is stronger in the proximity of the membrane. Antibodies against Kv3.2 also were expressed in parvalbumin-containing neurons (Fig. 2, F–H), although Kv3.2 antibodies produced a



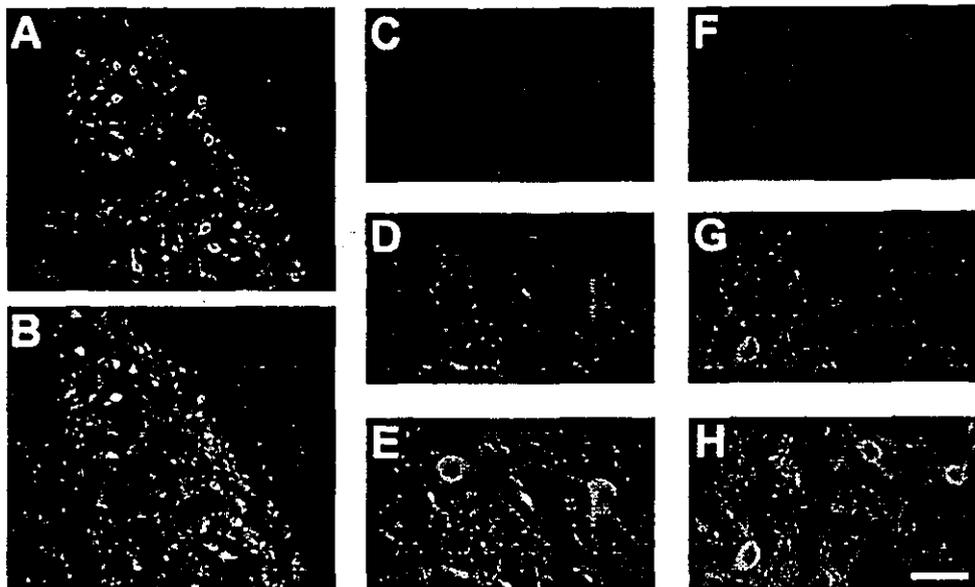


FIG. 2. Immunolocalization of Kv3.1 and Kv3.2 proteins in the GP of 2-wk-old rats. *A* and *B*: panoramic view of a rat GP double labeled with antibodies against Kv3.1 and parvalbumin. Kv3.1 immunofluorescence is shown in *A* and parvalbumin immunofluorescence in *B*. *C-E*: pallidal neurons double labeled with antibodies against Kv3.1 and parvalbumin. Kv3.1 immunofluorescence is shown in *C* and parvalbumin immunofluorescence in *D*. *E*: superimposition of the immunofluorescence produced by Kv3.1b and parvalbumin. *F-H*: pallidal neurons double labeled with antibodies against Kv3.2 and parvalbumin. Kv3.2 immunofluorescence is shown in *F* and parvalbumin immunofluorescence in *G*. *H*: superimposition of the immunofluorescence produced by Kv3.2 and parvalbumin. Note that the channel proteins and parvalbumin are in the same cells but do not have identical subcellular distributions, producing a red to yellow to green gradient in the superimposed images. Scale bar: 100  $\mu$ m for *A* and *B* and 25  $\mu$ m for *C-H*.

of both types of channel proteins exist in pallidal membranes. Taken together the data suggest that parvalbumin-containing projecting pallidal neurons have heteromeric channels containing both Kv3.1 and Kv3.2 subunits.

#### Kv3.1 and Kv3.2 currents in transfected CHO cells

To compare the properties of the currents recorded from CHO cells transfected with Kv3.1 or Kv3.2 cDNAs with putative Kv3 currents in freshly dissociated pallidal neurons, all cells were recorded with identical intra- and extracellular solutions. CHO cells transfected with cDNAs encoding Kv3.2a or Kv3.1b proteins had large delayed rectifier-type voltage-dependent  $K^+$  currents (Fig. 4) that resembled the currents observed in *Xenopus* oocytes injected with Kv3.2a or Kv3.1b cRNAs (reviewed in Vega-Saenz de Miera et al. 1994). Both Kv3.2a or Kv3.1b currents (see Fig. 4, *A* and *C*, respectively) start activating when the membrane is depolarized to potentials more positive than  $-10$  mV and rise relatively fast (as compared with other voltage-gated  $K^+$  channels) (see Coetzee et al. 1999), with a similar time course, to a maximum level that is maintained for the duration of the pulses used in this experiment. A slow inactivation becomes evident with pulses of longer duration (data not shown). Untransfected CHO cells had

negligible outward currents under the same pulse protocols ( $<100$  pA for the largest depolarizations).

Preliminary studies with pallidal neurons showed that a large proportion of the outward current in these cells could be suppressed by holding the membrane at depolarized potentials. This could be a useful strategy to eliminate a fraction of the potassium currents if Kv3 currents are not affected by such treatment. We therefore tested the effect of varying the holding potential on Kv3.1 and Kv3.2 currents expressed in isolation. Figure 4 compares the currents produced by a series of voltage steps applied from a holding potential of  $-80$  or  $-40$  mV in the Kv3.1- and Kv3.2-transfected CHO cells. As seen in these representative examples, the currents generated by the depolarizing test pulses are very similar in magnitude and kinetics whether the cell is held at  $-80$  or  $-40$  mV. Changing the holding potential to  $-40$  mV suppressed Kv3.1 and Kv3.2 currents by only  $9.3 \pm 0.1\%$  (mean  $\pm$  SE;  $n = 4$ ) and  $9.8 \pm 0.6\%$  ( $n = 4$ ), respectively, with no effect on current kinetics.

Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells also have a similar voltage dependence, as observed in *Xenopus* oocytes (reviewed in Vega-Saenz de Miera et al. 1994). Figure 4, *E* and *F*, shows the normalized conductance ( $G/G_{max}$ ) as a function of voltage, obtained from several cells expressing Kv3.2 or Kv3.1 currents, respectively. The data were fitted to Boltzmann functions

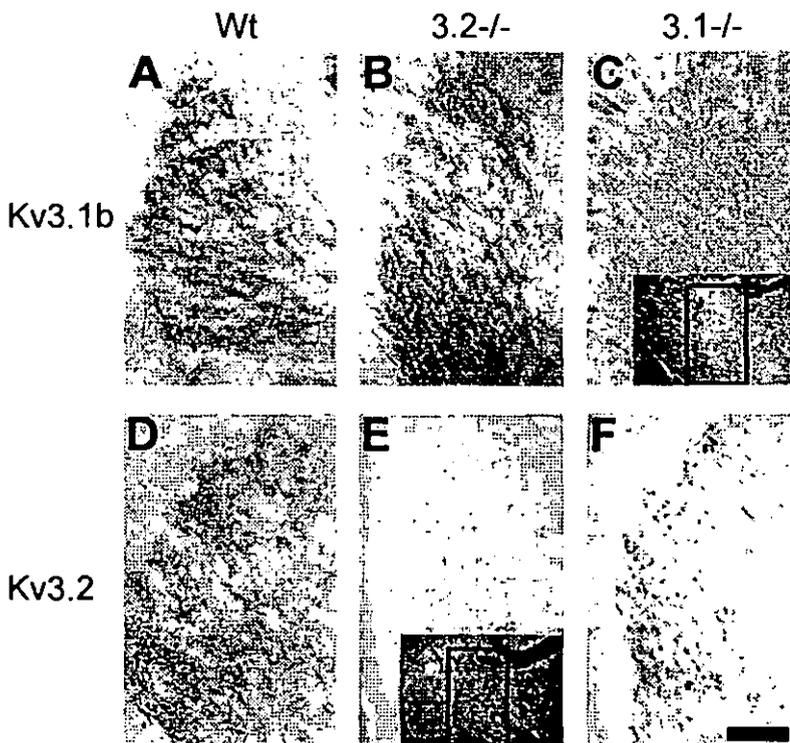


FIG. 3. Immunolocalization of Kv3.1 and Kv3.2 proteins in mouse GP. Sections through the GP obtained from wild-type (A and D), Kv3.2 knockout (B and E), and Kv3.1 knockout (C and F) mice were immunostained with Kv3.1b (A–C) and Kv3.2 (D–F) antibodies. Insets: dark field images of the area shown in the main panels. Scale: 150  $\mu$ m.

of the form  $G/G_{max} = 1/[1 - \exp(V_m - V_{1/2})/k]$ . From these fits, we derived a midpoint of activation of  $V_{1/2} = 12.1 \pm 1.26$  mV ( $n = 6$ ) for Kv3.2 currents and  $18.1 \pm 1.01$  mV ( $n = 6$ ) for Kv3.1 and a steepness parameter  $k$  of  $8.4 \pm 0.25$  mV for Kv3.2 and  $11.0 \pm 0.2$  mV for Kv3.1. Kv3 currents are unusual in requiring very depolarized potentials to start activating. However, the midpoints of the conductance-voltage relationships of Kv3 channels are not that different from those of other voltage-dependent  $K^+$  currents, reflecting a steep voltage dependence. This distinguishes mammalian Kv3 currents from the currents expressed by the *Drosophila* Shaw protein, which also starts activating at high voltages but has a very weak voltage dependence, producing a midpoint of activation above +70 mV (Johnstone et al. 1997; Smith-Maxwell et al. 1998).

Another unusual feature of Kv3 currents is the fast rate of deactivation on repolarization, first described for Kv3.1 currents expressed in NIH-3T3 and L929 cells by Grissmer et al. (1994). These authors found that Kv3.1 currents deactivated  $\sim 10$  times faster than several other cloned mammalian voltage-gated  $K^+$  channels when compared at the same membrane potentials. Since then, many new voltage-gated channels have

been identified in mammals; however, only one of them, Kv1.7, a nonneuronal member of the Kv1 family, deactivates fast (closing rates are  $\sim 3$  times the deactivation rates of Kv3.1 channels) (Coetzee et al. 1999). Kv3.1 currents also deactivate extremely fast in CHO cells under our recording conditions (Fig. 5). Kv3.2 currents deactivate at rates somewhat slower than Kv3.1 but still significantly faster than  $K^+$  currents from channels of other subfamilies (Fig. 5).

At present there are no specific blockers for Kv3.1 and Kv3.2 channels. However, in *Xenopus* oocytes all Kv3 currents are blocked by low concentrations of TEA or 4-aminopyridine (4-AP) (reviewed in Vega-Saenz de Miera et al. 1994). Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells, under our recording conditions, were also very sensitive to these channel blockers. TEA dose-response curves for Kv3.1 and Kv3.2 currents are shown in Fig. 6. From these curves, we derived  $IC_{50}$ s of 0.28 mM ( $n = 4$ ) for Kv3.2 and 0.38 mM ( $n = 4$ ) for Kv3.1 currents. We also have confirmed that as in other experimental systems (Grissmer et al. 1994; Vega-Saenz de Miera et al. 1994), Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells are not affected by dendrotoxin or charybdotoxin at concentrations of  $\leq 1 \mu$ M (data not

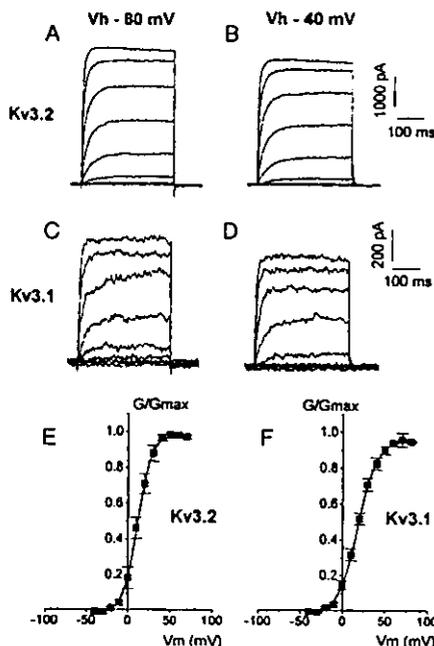


FIG. 4. Kv3.1 and Kv3.2 currents in transfected chinese hamster ovary (CHO) cells. *A* and *C*: families of  $K^+$  currents recorded from a holding potential of  $-80$  mV in a Kv3.2 (*A*)- and a Kv3.1-transfected (*C*) cell. *B* and *D*:  $K^+$  currents recorded from the same cells from a holding potential of  $-40$  mV. In all cases, depolarizing pulses were applied from  $-30$  to  $+40$  mV in  $10$ -mV increments. *E* and *F*: plots of normalized conductance ( $G/G_{max}$ ) as a function of voltage obtained from current records from several Kv3.2 (*E*)- and Kv3.1-transfected (*F*) cells. ( $n = 4$ ). Conductance ( $G = I/V - V_K$ ) values were computed from current data using a potassium equilibrium potential ( $V_K$ ) of  $-80$  mV, which was the average reversal potential in these cells and is close to the expected  $K^+$  equilibrium potential of  $\sim -90$  mV.

shown). The effects of 4-AP on these currents were not examined in detail. Preliminary experiments discarded 4-AP as a useful tool to distinguish native currents carried by channels of the Kv3 subfamily in pallidal neurons because the drug blocks, also at low concentrations, a component of the outward current that also is blocked by dendrotoxin.

The currents obtained when both Kv3.1 and Kv3.2 proteins are co-expressed in *Xenopus* oocytes (Vega-Saenz de Miera et al. 1994; Weiser et al. 1994) or CHO cells (data not shown) are similar to those obtained in cells expressing only one of the two subunits. This is not surprising given the similarities between Kv3.1 and Kv3.2 currents and is consistent with the observation that heteromultimeric Kv channels have properties intermediate between those of the corresponding homomultimeric channels (Christie et al. 1990; Isacoff et al. 1990; K. McCormack et al. 1990; Ruppersberg et al. 1990; Weiser et al. 1994). The properties of Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells are summarized in Table 1.

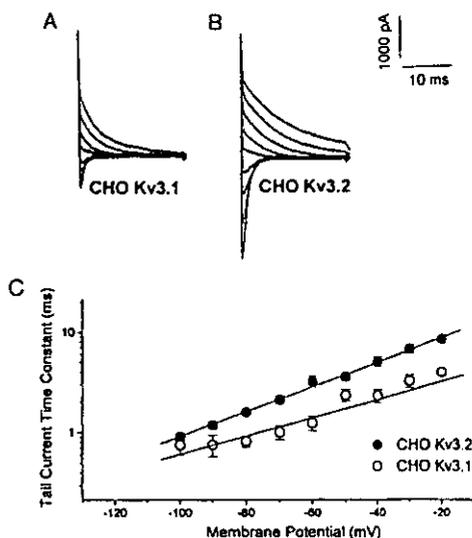


FIG. 5. Deactivation kinetics of Kv3.1 and Kv3.2 channels in transfected CHO cells. *A* and *B*: records of tail currents obtained by repolarizing the cell to a series of membrane potentials from  $-110$  to  $-30$  mV in  $10$ -mV increments after a  $220$ -ms depolarization to  $+40$  mV. *C*: time constants of deactivation as a function of voltage from several Kv3.1 ( $\circ$ ) or Kv3.2 ( $\bullet$ ) transfected CHO cells obtained from single exponential fits to the tail currents.

#### $K^+$ currents in acutely dissociated neurons from the rat GP

As a product of the enzymatic dissociation of the GP, we typically found two morphological subtypes of neurons (Fig. 7), similar to those observed in previous studies of dissociated pallidal neurons (Stefani et al. 1992, 1995; Surmeier et al. 1994). We also found astrocytes and a population of small cells (data not shown). All our records were obtained from the two

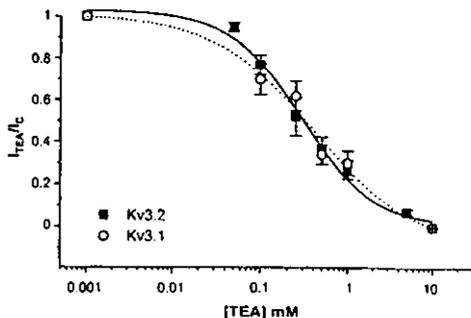


FIG. 6. TEA dose-response curve of Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells transfected with Kv3.1 and Kv3.2 transcripts. Plotted is the fraction of the currents remaining ( $I_{TEA}/I_C$ ) at  $+40$  mV as a function of the concentration of TEA in the bath.  $IC_{50}$  obtained by fitting the experimental data to the Sigmoid Logistic Function [ $I/I_C = \exp(-x) / (1 + \exp(-x))$ ] for Kv3.1 and Kv3.2 currents was  $0.18$  ( $-$ ) and  $0.28$  mM ( $-$ ), respectively ( $n = 4$ ).

TABLE 1. Electrophysiological properties of  $Kv3$  currents and  $I_{GP-TEA}$  in type A and type B pallidal neurons

	Activation					Inactivation $\tau$ (ms)	Reference
	$V_{min}$ , mV	$V_{1/2}$ , mV	$k$ , mV	$t_{max}$ , ms	$\tau_{off}$ , ms		
Kv3.1	-20 to -10	18.1	11	3.4	2.5	NA	1
Kv3.2	-20 to -10	12.1	8.4	4	5	NA	1
Kv3.4	-20 to -10	14	8.5	4	—	19.9	2
$I_{GP-TEA}$ (A)	-20 to -10	16.9	10.6	4.2	3.6	NA	1
$I_{GP-TEA}$ (B)	-20 to -10	15.5	14.3	3.6	—	15	1

All measurements are reported at room temperature. References: 1, this work; 2, Rudy et al. (1999).  $V_{min}$ , minimum voltage at which there is significant activation of the current;  $V_{1/2}$ , membrane potential at which the conductance is half maximal;  $k$ , slope of normalized  $G-V$  curve;  $t_{max}$ , time for the current to rise from 10 to 90% of its final value for noninactivating currents and time to peak for inactivating currents, both at +40 mV;  $\tau_{off}$ , time constant of deactivation at -40 mV; Inactivation  $\tau$ , time constant of inactivation at +40 mV; NA, not applicable.

main types shown in Fig. 7. Most neurons (type A, Fig. 7, A and B) had bipolar-fusiform or triangular shape and were similar in size and morphological appearance to pallidal GABAergic projecting neurons (Park et al. 1982; Surmeier et al. 1994). The second type, much less frequently encountered (type B, Fig. 7C), consisted of multipolar cells that were distinguished mainly by having somas significantly larger than those of type A cells. These cells may correspond to the large cholinergic neurons that lie along the medial border of the GP

(Surmeier et al. 1994), but no evidence of this was obtained in this study.

It was also possible to group the dissociated GP neurons according to the amount and kinetics of the transient currents observed when the cells were depolarized from a holding potential of -80 mV. Figure 8 shows records from three different neurons at two holding potentials. The cell shown in A has very little low-voltage activating A-type current, whereas this current is large in the cells shown in C and E. In addition,

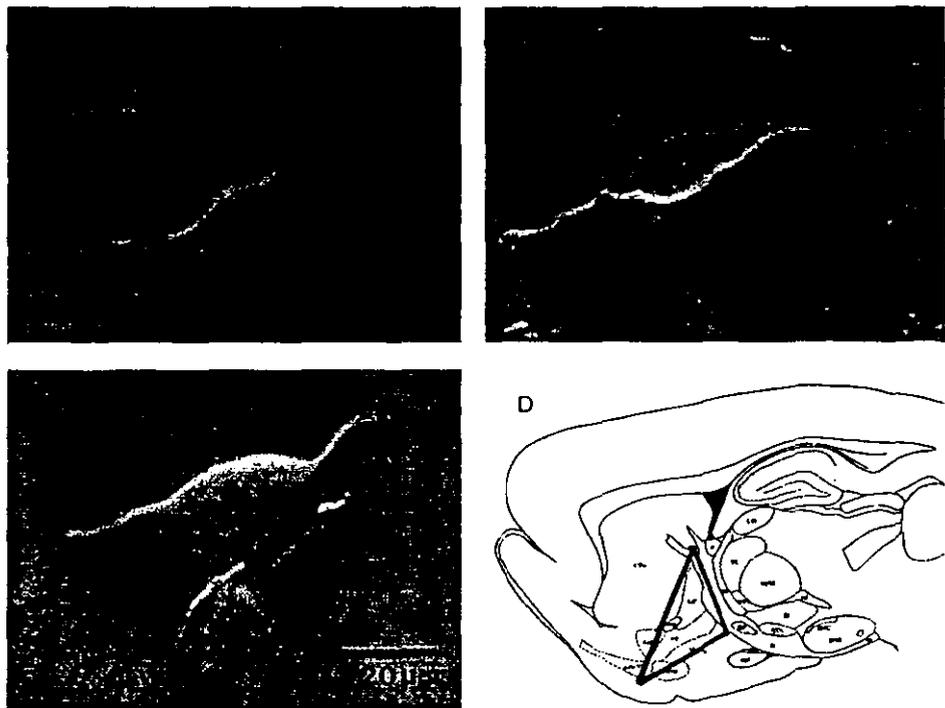


FIG. 7. Freshly dissociated pallidal neurons. A-C: images of 3 typical neurons from acutely dissociated rat GP obtained under Nomarski optics. Two A-type cells are shown in A and B and B-type cell in C. D: diagram illustrating the section (black triangle) of brain slices used for dissociation.

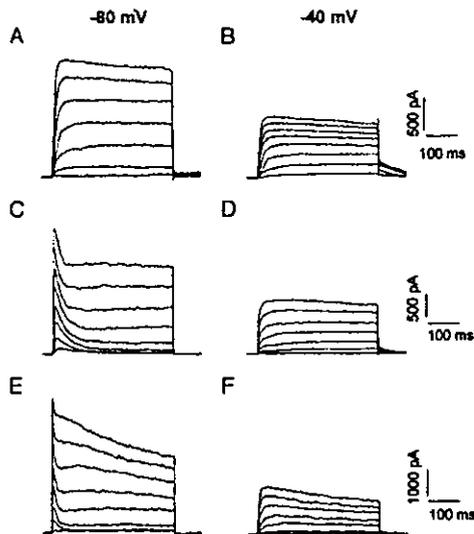


FIG. 8. Outward currents from acutely dissociated pallidal neurons. *A, C*, and *E*: currents in 3 representative GP neurons expressing different proportions of low-voltage-activating transient, A-type currents. Depolarizing pulses from  $-30$  to  $+40$  mV were applied from a holding potential of  $-80$  mV in  $10$ -mV increments. *B, D*, and *F*: records obtained from the same cells (*A, C*, and *E*, respectively) when depolarized to the same voltages from a holding potential of  $-40$  mV. Note that in addition to the transient current, a fraction of the sustained current is also inactivated by holding the membrane at  $-40$  mV.

the cell shown in *E* has a substantial amount of a slowly inactivating A-type current similar to the  $I_{A_s}$  described in pallidal neurons by Stefani et al. (1995). The records in Fig. 8 also show that a holding potential of  $-40$  mV (Fig. 8, *B, D*, and *F*) inactivates not only the transient currents but also a substantial portion of the sustained current. We did not observe a clear correlation between the phenotype of the currents at a holding potential of  $-80$  mV and the cell's morphology.

The experiments described next, aimed at searching for Kv3.1- and Kv3.2-like currents in dissociated pallidal neurons, asked whether in these cells there is a component of the potassium current whose kinetics, voltage dependence, and pharmacology resembles those of the currents recorded under the same experimental conditions in CHO cells expressing Kv3.1 or Kv3.2 proteins. The results will be presented in two parts each comprising results obtained from one of two distinct subpopulations of GP neurons, distinguishable by their morphology and electrophysiological characteristics: type A and type B cells. As indicated in METHODS, identical intra- and extracellular solutions to those used to record currents in CHO cells were used in pallidal neuron recordings.

#### Type A GP neurons

This group was composed of cells with fusiform/bipolar and triangular/multipolar somata (such as those shown in Fig. 7, *A* and *B*). Typical records obtained from a cell with these mor-

phological characteristics are shown in Fig. 9. Figure 9*A* shows a family of currents obtained during depolarizing pulses from a holding potential of  $-40$  mV, and Fig. 9*B* illustrates the currents obtained in the same cell after the application of  $1$  mM TEA to the external solution. The studies with Kv3.1 and Kv3.2 currents in heterologous expression systems indicate that such a concentration of TEA should eliminate an important fraction ( $\sim 80\%$ ) of the current generated by Kv3 channels. A holding potential of  $-40$  mV was used to reduce the components of the total  $K^+$  current and facilitate the isolation of Kv3-like currents, which are not significantly affected by holding the membrane at this potential (see Fig. 4).

The currents recorded under control conditions ( $I_{GP}$ ) begin to activate at about  $-20$  mV and have characteristics of delayed rectifying currents. The TEA-resistant current component ( $I_{GP,R}$ ) also possesses characteristics of a sustained current of the delayed rectifier-type, although its activation kinetics is slower than that of  $I_{GP}$ . Figure 9*C* shows the current component sensitive to TEA ( $I_{GP,TEA}$ ), obtained by digital subtraction of the current traces shown in *B* from the corresponding traces in *A*. In type A cells,  $I_{GP,TEA}$  is also a sustained current of the delayed rectifier type that represents in this cell  $\sim 50\%$  of the total current from a holding potential ( $V_H$ ) of  $-40$  mV. Typically the activation kinetics of  $I_{GP,TEA}$  was faster

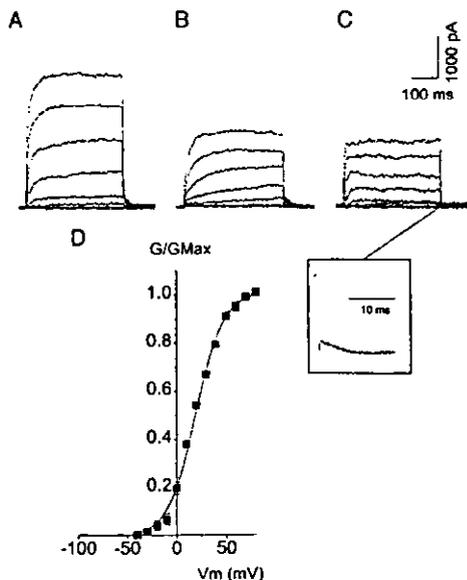


FIG. 9. Voltage-dependent  $K^+$  currents obtained from a typical type A pallidal neuron. *A-C*: currents obtained from a GP neuron held at  $-40$  mV during depolarizing pulses from  $-30$  to  $+40$  mV in  $10$ -mV increments, before (*A*) and after (*B*) the application of  $1$  mM TEA. Traces in *C* show the TEA-sensitive component obtained by digital subtraction of the traces in *B* from those in *A*. Inset: transition from  $+40$  to  $-40$  mV with the tail current sampled at  $30 \mu\text{s/point}$ . *D*: plot of relative conductance ( $G/G_{max}$ ) of the TEA-sensitive current from several type-A pallidal neurons ( $n = 6$ ). —, fit to a Boltzmann function.

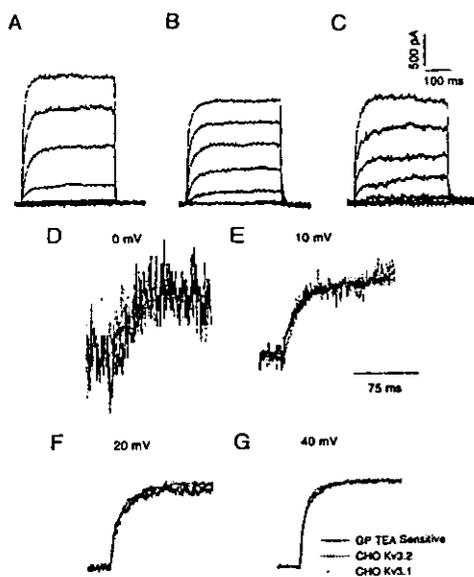


FIG. 10. Comparison of the activation kinetics of Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells, and the TEA-sensitive current in type A pallidal neurons. Currents obtained from a CHO cell transfected with Kv3.1 (A) or Kv3.2 (B) cDNAs, and the TEA-sensitive current from a type A pallidal neuron (C) obtained during voltage steps from  $-30$  to  $+30$  mV, applied from a holding potential of  $-40$  mV in  $10$ -mV increments. D-G: 1st  $150$  ms of the current records obtained at the indicated membrane potential from the cells shown in A-C have been scaled and are shown superimposed for comparison.

than that of  $I_{GP,R}$  (compare Fig. 9, B and C). It is also apparent from the records shown in Fig. 9, B and C, that the TEA-resistant and -sensitive components of the current in this cell also differ in their rate of deactivation at  $-40$  mV. The deactivation of  $I_{GP,R}$  is slow as compared with the rate of deactivation of  $I_{GP,TEA}$  ( $\tau_{deact} = 25.64 \pm 3.38$  ms ( $n = 9$ ) for  $I_{GP,R}$  and  $2.72 \pm 0.24$  ms ( $n = 6$ ) for  $I_{GP,TEA}$ ). While the proportion of  $I_{GP,R}$  and  $I_{GP,TEA}$  varied among type A cells ( $I_{GP,TEA}$  ranged between 30 and 85% of total current at a  $V_H$  of  $-40$  mV, with a mean of 54%), the kinetic features illustrated here were reproducibly observed.

Figure 9D shows the normalized conductance ( $G/G_{max}$ ) for  $I_{GP,TEA}$ . This component of the current starts activating between  $-10$  and  $-20$  mV. The continuous line represents the fit of the data to a Boltzmann equation with a  $V_{1/2}$  and  $k$  of  $16.94$  mV and  $10.59$  mV $^{-1}$ , respectively ( $n = 6$ ). These data show that the component of the outward current from type A cells that is blocked by  $1$  mM TEA resembles in voltage dependence as well as in activation and deactivation kinetics the currents carried by Kv3.1 and Kv3.2 channels.

To explore this conclusion further, we compared more closely the kinetics of activation and deactivation of  $I_{GP,TEA}$  with the kinetics of Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells. Figure 10 shows current records obtained with identical pulse protocols in CHO cells transfected with Kv3.1 and Kv3.2

cDNAs (A and B, respectively) and  $I_{GP,TEA}$  in a type A GP neuron (C). In D-G, we have scaled and superimposed the first  $150$  ms of the current traces in A-C, at four different voltages. It is clear from this comparison that the TEA-sensitive component of the  $K^+$  current in type A GP neurons has activation kinetics that closely resembles the activation kinetics of Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells.

$I_{GP,TEA}$  also resembles Kv3.1 and Kv3.2 currents in deactivation kinetics. Figure 11 examines the kinetics of the tail current recorded under control conditions in a type A GP neuron. The tail current that results from repolarizing the membrane potential from  $+40$  to  $-40$  mV (Fig. 11A) was best fitted by the sum of two exponentials, suggesting that the deactivation process of this current includes two components with fast and slow time constants ( $\tau_1 = 1.78$  ms and  $\tau_2 = 21.8$  ms, respectively). In contrast, the tail current of the TEA-insensitive component (Fig. 11B) and the TEA-sensitive component (Fig. 11C) can be fitted to a single exponential with time constants of  $28.8$  and  $2.27$  ms, respectively. These two values resemble the time constants of the two components seen in the total current. The time constant of deactivation of the TEA-sensitive current from a number of experiments ( $n = 4$ ) is plotted against the repolarizing membrane potential in Fig. 11D.  $I_{GP,TEA}$  deactivates very fast, at rates similar (and roughly intermediary) to those of Kv3.1 and Kv3.2 currents in CHO cells. A summary of the comparison of the properties of  $I_{GP,TEA}$  in type A GP neurons with the properties of Kv3.1 and Kv3.2 currents is shown in Table 1.

#### Type B GP neurons

The characteristics of the currents obtained from GP neurons described earlier were typical of the majority of the cells studied. However, we found that in a small group of cells,  $1$  mM TEA blocked a fast inactivating current. Many of these cells (type B) had a distinct morphology characterized by large multipolar somas with about four to five dendrites (such as the cell illustrated in Fig. 7C). Typical records from one of these cells are shown in Fig. 12. Depolarizing pulses from a holding potential of  $-40$  mV produced currents of the delayed rectifier type similar to those seen in type A cells (Fig. 12A), although the kinetics of activation of these currents was faster than that of the currents recorded in type A GP neurons (rise time between  $10$  and  $90\%$  at  $+40$  mV of  $14.0 \pm 1.2$  ms,  $n = 3$  for type B cells and  $25 \pm 5$  ms,  $n = 6$  for type A cells). The predominant time constant of deactivation of the currents in these cells is slow ( $\tau = 25.86 \pm 1.17$  ms after a pulse to  $+40$  mV;  $n = 4$ ). Application of  $1$  mM TEA inhibited  $\sim 10$ – $15\%$  of the current (Fig. 12B). The TEA-resistant current had slower activation kinetics than the control ( $10$ – $90\%$  rise time:  $22.4 \pm 2.5$  ms,  $n = 3$ ). The TEA-sensitive component ( $I_{GP,TEA}$ ), obtained by digital subtraction (Fig. 12C), was composed predominantly of a current that activates very rapidly starting at voltages more positive than  $-10$  mV (time to peak at  $+40$  mV of  $3.6 \pm 0.7$  ms,  $n = 4$ ) and presented marked and fast inactivation that could be fitted to a single exponential function. Figure 12E plots the time constant of inactivation of the transient current versus the potential during the pulse for this cell. Clearly the rate of inactivation is dependent on the voltage, becoming faster as the depolarization increases.

The TEA-sensitive component in these cells also includes a

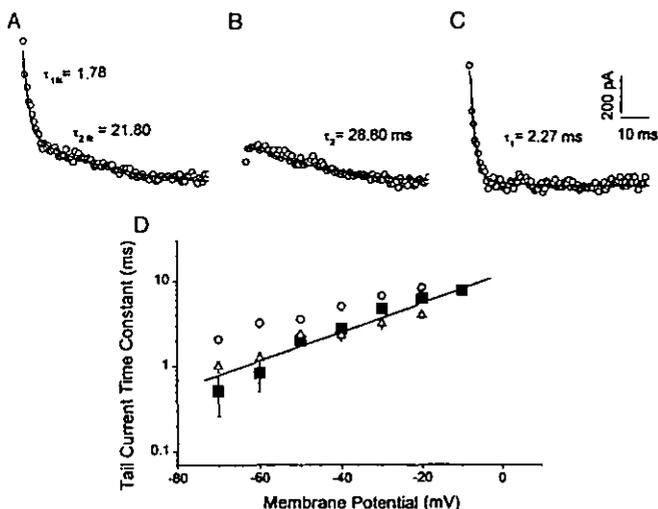


FIG. 11. Deactivation kinetics of  $K^+$  currents recorded from a type A GP neuron. A: tail current obtained from a type A pallidum neuron during repolarization to  $-40$  mV after a voltage step to  $+40$  mV from a holding potential of  $-40$  mV. Deactivation can be fitted by the sum of 2 exponential functions. B: tail current obtained from the same cell and during the same voltage protocol as in A after application of 1 mM TEA. In this case, the tail current can be fitted to a single exponential function. C: tail current of the TEA-sensitive component obtained by subtraction of the current record obtained with TEA from the current record obtained before TEA application. Tail current is also well fitted by a single exponential function. —, curves fitted to the experimental points ( $\circ$ ; sampling rate 60  $\mu$ s/point). D: voltage dependence of the time constants of deactivation of the TEA-sensitive current in several type A GP neurons ( $n = 4$ ). Deactivation time constants for Kv3.1 ( $\Delta$ ) and Kv3.2 ( $\circ$ ) currents obtained in CHO cells shown in Fig. 5 have been replotted here to facilitate comparison with the deactivation of the TEA-sensitive currents in type A GP neurons.

sustained component. The ratio of sustained to transient component varied from cell to cell. It is small in the cell illustrated in Fig. 12 but represented up to  $\sim 40\%$  of the current in some type B neurons. The TEA-sensitive current in these cells started to activate at very depolarized potentials ( $\sim -10$  mV) as was the case of the  $I_{GP, TEA}$  in type A cells and Kv3.1 and Kv3.2 in CHO cells. The normalized peak conductance ( $G/G_{max}$ ) as a function of voltage for the fast transient component of several type B neurons is shown in Fig. 12D. The experimental data were fit to a Boltzmann function with a  $V_{1/2}$  and  $k$  of  $15.47$  mV  $\pm$   $0.5$  and  $14.34$   $\pm$   $1.0$  mV $^{-1}$ , respectively;  $n = 4$ ).

The transient currents recorded from type B neurons of the GP resemble the currents expressed by Kv3.4 proteins (Table 1). These are proteins of the Kv3 subfamily that express fast activating and inactivating currents resembling Kv3.1 and Kv3.2 in voltage dependence and pharmacology (Rudy et al. 1991b, 1999; Schroter et al. 1991; Vega-Saenz de Miera et al. 1994). This result was surprising at first because *in situ* hybridization studies reported that Kv3.4 was only expressed at very low levels in a scattered pattern in the GP (Weiser et al. 1994).

Because there are no antibodies available against Kv3.4 proteins, we used single-cell RT-PCR to investigate whether type B cells in the GP contain Kv3.4 transcripts. Single-stranded cDNA synthesized from the mRNA obtained from the cytoplasm of several freshly dissociated type A and type B GP neurons was used as template for two rounds of PCR amplification. In the first round, we used a pair of primers designed to amplify the products of all Kv3 genes. This was followed by amplification using internal primers designed to amplify specifically the products of Kv3.1, Kv3.2, and Kv3.4 genes (see details in METHODS). The amplified products obtained when cDNA for each Kv3 gene was used as template are shown in Fig. 13A. Each product has a different molecular weight fac-

ilitating the identification of the transcript. Figure 13, B-D, shows the amplified bands obtained with several type A and type B cells. These studies showed that Kv3.2 transcripts are found in most type A (81%;  $n = 17$ ) and some type B cells (64%;  $n = 8$ ), Kv3.1 is found mainly in type A cells (85%), and Kv3.4 only in type B cells.

## DISCUSSION

### Key properties of Kv3.1 and Kv3.2 currents expressed in mammalian cell lines

Both Kv3.1 and Kv3.2 cDNAs result in the expression of similar currents in CHO cells that resemble the currents expressed in *Xenopus* oocytes (reviewed in Vega-Saenz de Miera et al. 1994). These currents have several properties (see Table 1) that distinguish them from those of other delayed rectifier  $K^+$  channels known (Coetzee et al. 1999). One property is an activation voltage range that is more positive than that of other heterologously expressed voltage-gated  $K^+$  channels, besides those of the Kv3 subfamily. The channels with the nearest activation voltage (Kv2.1 and Kv2.2) start activating at 10–20 mV more negative potentials. Although Kv3 channel opening starts at high potentials (more positive than  $-10$  mV), the probability of channel opening increases steeply with voltage, and  $>80\%$  of the channels are opened at  $+30$  mV. The currents deactivate very fast, at rates that are  $\geq 7$ –10 times faster (when compared at the same voltage) than those of other known mammalian voltage-gated  $K^+$  channels, except for Kv1.7 a nonneuronal member of the Kv1 subfamily (deactivation rates are 2–3 times slower than Kv3.1 or Kv3.2) (Coetzee et al. 1999; Grissmer et al. 1994). The rate of rise of the currents is relatively fast; faster than many other voltage-gated  $K^+$  channels (e.g., Kv2.x; Kv1.2) but slower than that of other voltage-gated  $K^+$  channels such as several Kv1 channels like Kv1.1 and Kv1.5 (Coetzee et al. 1999). In contrast to other

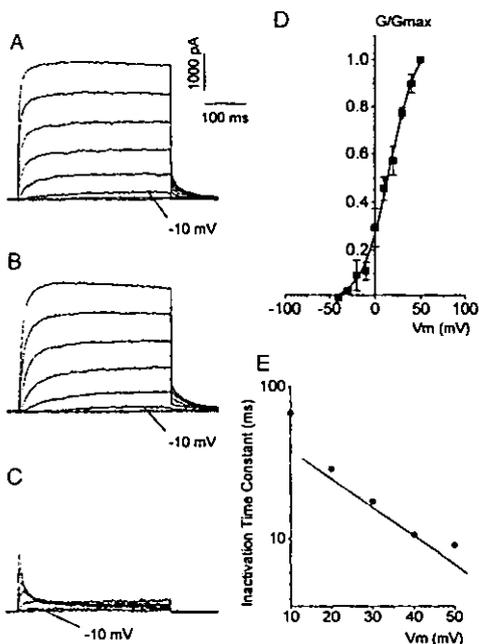


FIG. 12. Voltage-dependent  $K^+$  currents in type B pallidal neurons. *A*: families of  $K^+$  currents obtained from a type B cell held at  $-40$  mV and stepped from  $-30$  to  $+40$  mV in 10-mV increments. *B*: currents in the same cell and during the same pulse protocols as in *A* in the presence of 1 mM TEA. *C*: TEA-sensitive currents obtained by digital subtraction of records shown in *B* from those in *A*. *D*: normalized peak conductance voltage relationship for the TEA-sensitive component obtained from several type B cells ( $n = 4$ ). —, fit to a Boltzmann function. *E*: voltage dependence of the time constant of inactivation of the transient component of the TEA-sensitive component obtained from fits to a single exponential function.

delayed rectifiers, Kv3.1 and Kv3.2 currents are not significantly inactivated by depolarizing prepulses (see Fig. 4) and do not show cumulative inactivation (Grissmer et al. 1994; unpublished observations). These distinctive properties are likely to endow neurons with special electrophysiological properties (see following text).

#### Kv3.1–Kv3.2 channels in pallidal neurons

The studies described here provide strong evidence that in pallidal neurons, Kv3.1–Kv3.2 proteins in heteromultimeric complexes form  $K^+$  channels mediating a high-voltage-activating component of the delayed rectifier current that closely resembles the currents expressed by these proteins in heterologous expression systems. The immunohistochemical studies demonstrated that there is expression of both Kv3.1 and Kv3.2 proteins in the GP and that both proteins are colocalized in the same cell type, the triangular and bipolar parvalbumin-containing (PV+) neurons, which constitute the major neuronal population in the rodent GP (see following text). Moreover, anti-

bodies against Kv3.1 or Kv3.2 proteins coprecipitate both subunits, strongly suggesting that the proteins exist in heteromultimeric complexes. It remains to be shown, however, that the functional channels are heteromultimeric. This will be a difficult task unless major, not yet detected, differences between homomultimeric and heteromultimeric channels are discovered. We also have demonstrated that in acutely dissociated pallidal neurons having triangular or bipolar shapes (type A), shown to express Kv3.1 and Kv3.2 transcripts by single cell RT-PCR, a component of the current not inactivated when the cell is held at  $-40$  mV and blocked by 1 mM TEA, has properties that closely resemble those of Kv3.1 and Kv3.2 channels in CHO cells (see Table 1).

The concentration of TEA used to isolate the current in pallidal neurons (1 mM) blocks >80% of Kv3.1 and Kv3.2 currents in heterologous expression systems. This concentration of TEA produces significant inhibition of only a few other known  $K^+$  channels. These include the large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels containing proteins of the slo family ( $K_d$  80–330  $\mu$ M) and Kv1.1 channels ( $K_d \sim 0.5$  mM) (Coetzee et al. 1999). These channel types are unlikely to contribute to the current isolated from the pallidal neurons in these studies. In our experiments, the activation of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels was suppressed by using BAPTA in the extracellular solution and by using BAPTA in the intracellular solution. In the pallidal area Kv1.1 proteins apparently are expressed somatically only in the ventral pallidum (Wang et al. 1994). Moreover, Kv1.1 channels also are blocked by dendro-

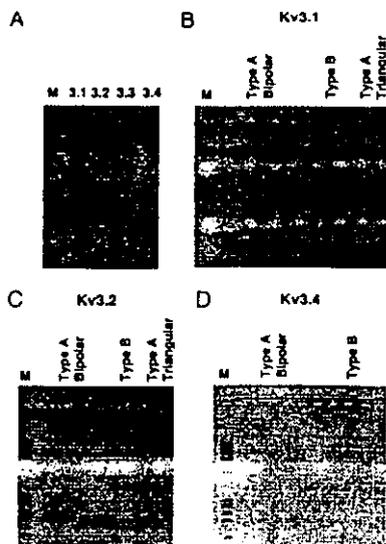


FIG. 13. Single-cell RT-PCR to identify Kv3 transcripts in pallidal neurons. *A*: amplified products obtained when cDNA for each of the 4 Kv3 genes was used as template. Amplified products were run in an agarose gel stained with ethidium bromide. *B–D*: amplified products obtained from several pallidal neurons of the indicated type using Kv3.1 (*B*), Kv3.2 (*C*), and Kv3.4-specific primers (*D*). Molecular weight standards (M) are  $\phi$ X174 markers from Biolabs.

toxin ( $K_d \sim 10$ – $20$  nM) (Coetzee et al. 1999). In pallidal neurons, this toxin blocked a small inactivating current component ( $\sim 10$ – $15\%$  of total outward current) resembling a D current (Wu and Barish 1992), which was suppressed significantly by holding the cell at  $-40$  mV. Dendrotoxin also blocks other channels of the Kv1 subfamily that are not highly sensitive to TEA (Coetzee et al. 1999) and may mediate the D-like current in pallidal neurons.

This study confirms and extends the observations of Du et al. (1996), who showed that hippocampal interneurons expressing Kv3.1 proteins had a current that showed resemblance to Kv3.1 currents in heterologous expression systems. Also the I-type current in T lymphocytes was shown to be very similar to Kv3.1 currents in *Xenopus* oocytes when recordings in the two preparations were obtained with the same solutions (Grissmer et al. 1992). Kv3.1-like currents also have been described in auditory neurons (Wang et al. 1998).

It appears from these results that the properties of native channels containing Kv3.1 and Kv3.2 proteins are not significantly affected by factors such as associated subunits or post-translational modifications as might be the case for other cloned subunits, at least in the cells studied until now. It is therefore valid to ask why were Kv3.1- and Kv3.2-like currents not described in the many neuronal populations expressing these proteins prior to the cloning studies? Most likely the Kv3 channel-mediated current was buried in other components of the  $K^+$  current. This emphasizes the suggestion made in the introduction that experimental conditions and methods to isolate individual components of the  $K^+$  current tailored to search for specific current components are required before it is possible to determine whether native currents resemble those in heterologous expression systems. In the specific case of pallidal neurons, the Kv3.1-Kv3.2 current isolated in our study was most likely buried in the delayed rectifier component ( $I_h$ ) isolated with 10 mM TEA by Steffani et al. (1992, 1995).

#### Physiological significance

The GP in rodents consist of a main neuronal mass homologous to the external segment of the GP in primates and often is referred to simply as the GP. A smaller nuclear group situated at a certain distance and embedded among the fiber bundles of the internal capsule usually called entopeduncular nucleus (not included in most of our dissociations) is thought to correspond to the internal segment of the GP in primates (Heimer et al. 1995). The GP proper contains several neuronal populations, the majority of which are medium to large neurons (20–40  $\mu$ m in length along their longer axis) with a fusiform (bipolar) or triangular shape. There are also small neurons (12–16  $\mu$ m in length), which may correspond to the small dissociated cells that were excluded from the present study, and a few scattered large multipolar cells located mainly in the medial border in rat, which may correspond to cholinergic neurons (Difiglia et al. 1982; Fox et al. 1974; Heimer et al. 1995; Iawhori and Mizuno 1981; Kita 1992, 1994; Kita and Kitai 1994; Millhouse 1986; Morizumi and Hattori 1992; Park et al. 1982; Tkatch et al. 1998). Most pallidal neurons, including the triangular and fusiform cells, are GABAergic. Many of these cells stain for parvalbumin, which labels about two-thirds of projecting pallidal neurons (Hontanilla et al. 1994; Kita 1994; Rajakumar et al. 1994a,b; Riedel et al. 1998). According

to our immunohistochemical studies, Kv3.1 and Kv3.2 are present in the PV+ neurons (Fig. 2). Furthermore the morphology of the majority of the dissociated cells identified as type A in this study corresponds to the morphology of the PV+ cells in situ. Together with the results from the single cell RT-PCR, this suggests that the neurons expressing Kv3.1- and Kv3.2-like currents correspond to the projecting GABAergic, PV+, neurons. The ventral pallidum, which may have contaminated some of our dissociations, contains similar GABAergic and cholinergic neurons (Heimer et al. 1995).

The Kv3.1-Kv3.2 component of the delayed rectifier current in pallidal neurons represents a significant component of the total  $K^+$  current ( $\sim 50\%$  of the current when the cell was depolarized from a holding potential of  $-40$  mV) and is therefore likely to contribute to the firing properties of these cells. Because Kv3.1-Kv3.2 channels are not opened until the membrane potential is depolarized beyond  $-10$  mV, it has been suggested that these channels are activated late in the action potential and, when present in sufficient amounts, influence action potential repolarization. Thus Kv3.1-Kv3.2 channels would help dictate action potential duration without competing much with the  $Na^+$  current in generating the rising phase of an action potential and influencing firing threshold, in contrast to  $K^+$  channels that are activated earlier during a spike (Lenz et al. 1994; Moreno et al. 1995; Rudy et al. 1999; Sekirnjack et al. 1997; Vega-Saenz de Miera et al. 1994; Wang et al. 1998; Weiser et al. 1995). These arguments, supported by computer modeling (A. Erisir, D. Lau, B. Rudy, and C. S. Leonard, unpublished data), suggest that high-voltage-activating  $K^+$  channels would modulate firing properties more selectively than  $K^+$  channels that activate at more negative voltages.

Many of the neuronal populations expressing Kv3.1 and Kv3.2 channels fire trains of brief action potentials at high rates (Erisir et al. 1998; Martina et al. 1998; Messingill et al. 1997; Perney et al. 1992; Rudy et al. 1992; Sekirnjack et al. 1997; Wang et al. 1998; Weiser et al. 1994, 1995), such as fast-spiking interneurons in the cortex and the hippocampus. Kv3.1-Kv3.2 channels may help maintain high firing rates by keeping action potentials short, reducing  $Na^+$  channel inactivation, and facilitating fast recovery of  $Na^+$  channels from inactivation by hyperpolarizing the cell following the spike. Their fast deactivation on repolarization will quickly eliminate the increase in  $K^+$  conductance, and therefore these channels will contribute little to increasing the refractory period.  $K^+$  channels that are open at lower potentials or do not deactivate as fast could repolarize the spike but at the same time also limit firing frequency by contributing to the refractory period. In fact pharmacological treatments that suppress Kv3 currents impair fast spiking in neocortical neurons, but blockade of other  $K^+$  currents actually increases firing frequency (Erisir et al. 1998).

Although there has not been a study combining immunohistochemistry and electrophysiology of pallidal neurons, it is likely that the PV+ pallidal neurons correspond to the repetitive firing group of cells recorded in an in vivo intracellular study in rats by Kita and Kitai (1991) because they both represent the largest cell population and they have similar morphologies (Kita 1994; Kita and Kitai 1991, 1994). These cells, which probably correspond to the type II neurons observed in intracellular recordings from guinea pig slices (Nambu and Llinas 1994, 1997), show fast repetitive firing ( $\leq 200$  Hz) with weak accommodation when depolarized.

It is possible that the role of Kv3.1–Kv3.2 channels in PV+ pallidal neurons is similar to their proposed role in cortical interneurons to facilitate sustained high firing rates. The firing frequency of the repetitive firing cells in the GP is not as high or sustained as that of fast-spiking cortical neurons. Analysis of the currents in the latter cells shows that they have a significantly higher proportion of Kv3-like currents than pallidal neurons and lack subthreshold-activating A-type currents (A. Erisir, D. Lau, B. Rudy, C. S. Leonard, unpublished data). These differences in channel composition may explain the differences in spike frequency adaptation of the two cell types. The resting potential of pallidal neurons will change the contribution of Kv3 currents to the total current, it is therefore also possible that the firing frequency or adaptation of PV+ pallidal neurons will depend on the resting potential.

#### Expression and role of channels containing Kv3.4 proteins in a small subpopulation of pallidal neurons

The most surprising result of this study was the finding of fast, transient, high-voltage-activating, TEA-sensitive currents in a small subpopulation of the dissociated cells. The currents resemble those expressed by Kv3.4 subunits in heterologous expression systems (Table 1) (see also Vega-Saenz de Miera et al. 1994). The hypothesis that these transient currents in GP neurons are mediated by channels containing Kv3.4 proteins is supported by the findings from single-cell RT-PCR, which showed that Kv3.4 transcripts are present only in the cells having the high-voltage activating transient current. We did not expect to find Kv3.4 channels in pallidal neurons because Weiser et al. (1994) reported very weak expression of Kv3.4 transcripts in the GP (in situ hybridization signals for these mRNAs were reported as "weakly above background"). However, Weiser et al. (1994) cautioned in their paper that low expression of Kv3.4 transcripts in neurons expressing other Kv3 proteins could be of physiological significance because Kv3.4 subunits can form heteromultimeric channels with other Kv3 proteins resulting in a large amplification of the transient current. Type B pallidal neurons might be an example of the situation predicted in this paper.

Nevertheless relative to the other outward currents, the Kv3.4-like current in type B pallidal neurons contributes such a small proportion of the total current that one could be tempted to suggest it could play little role in the excitability of these cells. However, although the Kv3.4-like current contributes little current, it produces a large effect on the rise time of the total current. The currents remaining after 1 mM TEA are not very different in magnitude from the original current; however, they are clearly much slower (see Fig. 12). This suggests a new role for Kv3.4-like currents: to accelerate the rate of rise of the repolarizing currents. Further studies of type B pallidal neurons or other cells expressing Kv3.4 channels will allow future tests of this hypothesis.

This research was supported by National Institute of Neurological Disorder and Stroke Grants NS-30989 and NS-35215 and National Science Foundation Grant IBN 9209523 to B. Rudy. A. Hernández-Cruz was awarded Grant 23661N from the National Council for Science and Technology (CONACYT). R. Hernández-Pineda was awarded a Fundación UNAM fellowship, a Ph.D. fellowship from CONACYT, and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.

Address for reprint requests: B. Rudy, Dept. of Physiology and Neuro-

science, New York University School of Medicine, 550 First Ave., New York City, NY 10016.

Received 19 October 1998; accepted in final form 29 March 1999.

#### REFERENCES

- BARHAMIN, J., LESAGE, F., GUILLEMARE, E., FINK, M., LAZDUNSKI, M., AND ROMÉY, G. K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384: 78–80, 1996.
- CHANDY, K. G. AND GUTMAN, G. A. Voltage gated potassium channels. In: *Handbook of Receptors and Channels: Ligand-Gated and Voltage-Gated Ion Channels*, edited by R. A. North, Boca Raton, FL: CRC, 1995, p. 1–71.
- CHANG, H. T., PENNY, G. R., AND KRITAI, S. T. Enkephalergic-cholinergic interaction in the rat globus pallidus: a pre-embedding double-labeling immunocytochemistry study. *Brain Res.* 426: 197–203, 1987.
- CHOW, A., ERISIR, A., FARR, C., LAU, D.H.P., AND RUDY, B. Kv3.1 and Kv3.2 proteins distinguish three subpopulations of GABA-ergic interneurons in the mouse cortex. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24: 622.11, 1998.
- CHOW, A., ERISIR, A., FARR, C., LAU, D.H.P., AND RUDY, B. (1999). K+ channel expression distinguishes subpopulations of parvalbumin- and somatostatin-containing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* In press.
- CHRISTIE, M. J., NORTH, R. A., OSBORNE, P. B., DOUGLASS, J., AND ADELMAN, J. P. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from a cloned subunit. *Neuron* 4: 405–411, 1990.
- CHUDLER, E. H. AND DONG, W. K. The role of the basal ganglia in nociception and pain. *Pain* 60: 3–38, 1995.
- COETZEE, W., AMARILLO, Y., CHIU, J., CHOW, A., LAU, D., MCCORMACK, T., MORENO, T., NADAL, M., OZAITA, A., POINDNEY, D., SAGANICH, M., VEGA-SAEZ DE MIERA, E., AND RUDY, B. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann. NY Acad. Sci.* 868: 233–285, 1999.
- COVARRUBIAS, M., WEI, A., AND SALKOFF, L. Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* 7: 763–773, 1991.
- COVARRUBIAS, M., WEI, A., SALKOFF, L., AND VYAS, T. B. Elimination of rapid potassium channel inactivation by phosphorylation of the inactivation gate. *Neuron* 13: 1403–1412, 1994.
- DELONG, M. R. Activity of pallidal neurons during movement. *J. Neurophysiol.* 34: 414–427, 1971.
- DELONG, M. R. Activity of basal ganglia neurons during movement. *Brain Res.* 40: 127–135, 1972.
- DIFIGLIA, M., PASTK, P., AND PASTK, T. A Golgi and ultrastructural study of the monkey globus pallidus. *J. Comp. Neurol.* 215: 53–75, 1982.
- DIFIGLIA, M. AND RAPOLS, J. A. Synaptic organization of the globus pallidus. *J. Electron Microscop. Tech.* 10: 247–263, 1988.
- DOYLE, D. A., CABRAL, J. M., PFLEITZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T., AND MACKINNON, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280: 69–77, 1998.
- DU, J., ZHANG, L., WEISER, M., RUDY, B., AND MCBAIN, C. J. Developmental expression and functional characterization of the potassium-channel subunit Kv3.1b in parvalbumin-containing interneurons of the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 16: 506–518, 1996.
- ERISIR, A., LAU, D.H.P., RUDY, B., AND LEONARD, C. S. Low TEA concentration disrupts high frequency firing of fast spiking cells in mouse somatosensory cortex. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24: p. 632, 1998.
- FOX, C. A., ANDRADE, A. N., LU, QIU, J. J., AND RAPOLS, J. A. The primate globus pallidus: a Golgi and electron microscopic study. *J. Histochem.* 15: 75–93, 1974.
- GOLDMAN-WOHL, D. S., CHAN, E., BARD, D., AND HEINTZ, N. Kv3.3b: a novel Shaw type potassium channel expressed in terminally differentiated cerebellar Purkinje cells and deep cerebellar nuclei. *J. Neurosci.* 14: 511–522, 1994.
- GRAYBIEL, A. M. AND RAGSDALE, C. W. Fiber connections of the basal ganglia. *Prog. Brain Res.* 51: 349–351, 1979.
- GRISSMER, S., GHANSHANI, S., DETLEFSS, B., MCPHERSON, J. D., WASMUTH, J. J., GUTMAN, G. A., CAHALAN, M. D., AND CHANDY, K. G. The Shaw-related potassium channel gene, Kv3.1, on human chromosome 11, encodes the type I K<sup>+</sup> channel in T cells. *J. Biol. Chem.* 267: 20971–20979, 1992.
- GRISSMER, S., NGUYEN, A. N., AIYAR, J., HANSON, D. C., MATHER, R. J., GUTMAN, G. A., KARMLÖWICZ, M. J., ALPHERIN, D. D., AND CHANDY, K. G. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* 45: 1227–1234, 1994.

- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., AND SIKWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100, 1981.
- HARLOW, E. AND LANE, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratories, 1988.
- HARTSHORNE, R. P. AND CATTERALL, W. A. The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *J. Biol. Chem.* 259: 1667-1675, 1984.
- HAUBER, W., LUTZ, S., AND MUNKLE, K. The effects of globus pallidus lesions on dopamine-dependent motor behavior in rats. *Neuroscience* 86: 147-157, 1998.
- HEIMER, L., ZAHND, D. S., AND ALIJEVIĆ, G. F. Basal ganglia. In: *The Rat Nervous System* (2nd ed.), edited by G. Paxinos. New York: Academic Press, 1995.
- HEINEMANN, S. H., RETTO, J., GRAACK, H. R., AND PONGS, O. Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *J. Physiol. (Lond.)* 493: 625-633, 1996.
- HERNÁNDEZ-PINEDA, R., HERNÁNDEZ-CRUZ, A., MORENO H., CHOW, A., AND RUDY, B. Identification of voltage-gated K channels containing Kv3 subunits in neurons from the globus pallidus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: p. 1754, 1996.
- HILLE, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer, 1992.
- HO, C. S., GRANGE, R. W., AND JOHO, R. H. Electrophysiological effects of a disrupted K<sup>+</sup> channel gene: reduced body weight, impaired motor skill and muscle contraction, but no seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1533-1538, 1997.
- HONTANILLA, B., PARENT, A., AND GIMÉNEZ-AMAYA, J. M. Compartmental distribution of parvalbumin and calbindin D-28k in rat globus pallidus. *Neuroreport* 5: 2269-2272, 1994.
- ISACOFF, E. F., JAN, Y. N., AND JAN, L. Y. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus oocytes*. *Nature* 345: 530-534, 1990.
- IWAHORI, N., AND MIZUNO, N. A Golgi study on the globus pallidus of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 197: 29-43, 1981.
- JAN, L. Y., AND JAN, Y. N. Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 91-123, 1997.
- JOHNSTONE, D. B., WEI, A., BUTLER, A., SALKOFF, L., AND THOMAS, J. H. Behavioral defects in *C. elegans* agl-36 mutants result from potassium channels shifted in voltage-dependence of activation. *Neuron* 19: 151-164, 1997.
- KITA, H. Responses of globus pallidus to cortical stimulation: intracellular study in the rat. *Brain Res.* 589: 84-90, 1992.
- KITA, H. Parvalbumin-immunopositive neurons in the rat globus pallidus: a light and electron microscopy study. *Brain Res.* 657: 31-41, 1994.
- KITA, H. AND KITAI, S. T. Intracellular study of rat globus pallidus neurons: membrane properties and response to neostriatal subthalamic and nigral stimulation. *Brain Res.* 564: 296-305, 1991.
- KITA, H. AND KITAI, S. T. The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain Res.* 636: 308-319, 1994.
- LAU, D., CONTRERAS, D., CHOW, A., OZAITA, A., VEGA E., AND RUDY, B. Targeted disruption of a K<sup>+</sup> channel expressed in thalamocortical projections and cortical interneurons. *Somatosens. Mot. Res.* 16: 163, 1999.
- LENZ, S., PERNEY, T. M., QIN, Y., ROBBINS, E., AND CHESSELET, M. F. GABAergic interneurons of the striatum express the Shaw-like potassium channel Kv3.1. *Synapse* 18: 55-66, 1994.
- MARTINA, M., SCHULTZ, J. H., EIMKE, H., MONYER, H., AND JONAS, P. Functional and molecular differences between voltage-gated K<sup>+</sup> channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J. Neurosci.* 18: 8111-8125, 1998.
- MASSENGILL, J. L., SMITH, M. A., SON, D. I., AND O'DOWD, D. K. Differential expression of K4-AP currents and Kv3.1 potassium channel transcripts in cortical neurons that develop distinct firing phenotypes. *J. Neurosci.* 17: 3136-3147, 1997.
- MCCORMACK, K., LIN, J. W., IVERSON, L. E., AND RUDY, B. Shaker K<sup>+</sup> channel subunits from heteromultimeric channels with novel functional properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 1361-1371, 1990.
- MCCORMACK, T., VEGA-SANZ DE MIERA, E., AND RUDY, B. Molecular cloning of a member of a third class of Shaker-family K<sup>+</sup> channel genes in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5227-5231, 1990.
- MCDONALD, T. V., YU, Z., MING, Z., PALMA, E., MEYERS, M. B., WANG, K. W., GOLDSTEIN, S. A., AND FISHMAN, G. I. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current (I<sub>Kr</sub>). *Nature* 388: 289-292, 1997.
- MILLHOUSE, O. E. Pallidus neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.* 254: 209-227, 1986.
- MORENO, H., KENTROS, C., BUENO, E., WEISER, M., HERNÁNDEZ-CRUZ, A., VEGA-SANZ DE MIERA, E., PONCE, A., THORNHILL, W., AND RUDY, B. Thalamocortical projections have a K<sup>+</sup> channel that is phosphorylated and modulated by cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* 15: 5486-5501, 1995.
- MORIZUMI, T. AND HATTORI, T. Separate neuronal population of the rat globus pallidus projecting to the subthalamic nucleus, auditory cortex and pedunculo-pontine tegmental area. *Neuroscience* 46: 701-710, 1992.
- NAMBU, A. AND LLINAS, R. Electrophysiology of globus pallidus. *J. Neurophysiol.* 72: 1127-1139, 1994.
- NAMBU, A. AND LLINAS, R. Morphology of globus pallidus neurons: its correlation with electrophysiology in guinea pig brain slices. *J. Comp. Neurol.* 377: 85-94, 1997.
- PARENT, A. H. AND HAZRATI, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.* 20: 91-127, 1995a.
- PARENT, A. H. AND HAZRATI, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res. Rev.* 20: 128-154, 1995b.
- PARK, M. R., FALLS, W. M., AND KITAI, S. T. An intercellular HRP study of the rat globus pallidus. I. responses and light microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 211: 281-294, 1982.
- PAXINOS G. (Editor). *The Rat Nervous System* (2nd ed.). New York: Academic Press, 1995.
- PAXINOS G. AND WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (2nd ed.). New York: Academic Press, 1986.
- PERNEY, T. M., MARSHALL, J., MARTIN, K. A., HOCKFIELD, S., AND KACZMAREK, L. K. Expression of the mRNAs for the Kv3.1 potassium channel gene in the adult and developing rat brain. *J. Neurophysiol.* 68: 756-766, 1992.
- PINEDA, R., SAGAMICH, M., MORENO H., VEGA-SANZ DE MIERA, E., HERNÁNDEZ-CRUZ, A., AND RUDY B. Identification of currents mediated by channels with Kv3 subfamily proteins in neurons from the rat Globus pallidus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24: 527.12, 1998.
- PONGS, O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev.* 72: 169-188, 1992.
- RAJAKUMAR, N., ELISEVICH, K., AND FLUMERBELT, B. A. PARVALBUMIN-CONTAINING GABAergic neurons in the basal ganglia output system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 350: 324-336, 1994a.
- RAJAKUMAR, N., RUSHLOW, C. C., NAUS, G., ELISEVICH, K., AND FLUMERBELT, B. A. Neurochemical compartmentalization of the globus pallidus in the rat: an immunocytochemical study of calcium-binding proteins. *J. Comp. Neurol.* 346: 337-348, 1994b.
- RIEDEL, A., HARTIG, W., FRITSCHY, J. M., BRUCKNER, G., SEIFERT, U., AND BRAUER, K. Comparison of the rat dorsal and ventral striatopallidal system. A study using the GABA(A) receptor alpha-1 subunit and parvalbumin immunolabeling. *Exp. Brain Res.* 121: 215-221, 1998.
- RUDY, B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25: 729-749, 1988.
- RUDY, B., CHOW, A., LAU, D., AMARILLO, Y., OZAITA, A., SAGAMICH, M., MORENO, H., HERNÁNDEZ-PINEDA, R., HERNÁNDEZ-CRUZ, A., MACINTOSH, P., EKSTR, A., LEONARD, C., AND VEGA-SANZ DE MIERA, E. Contributions of Kv3 channels to neuronal excitability. *Ann. NY Acad. Sci.* 868: 304-341, 1999.
- RUDY, B., KENTROS, AND C. VEGA-SANZ DE MIERA, E. Families of K<sup>+</sup> channel genes in mammals: toward and understanding of the molecular basis of K channel diversity. *Mol. Cell. Neurosci.* 2: 89-102, 1991a.
- RUDY, B., KENTROS, C., WEISER, M., FRUHLING, D., SERODIO, P., VEGA-SANZ DE MIERA, E., ELLISMAN, M., POLLOCK, J. A., AND BAKER, H. Region-specific expression of a K<sup>+</sup> channel gene in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4603-4607, 1992.
- RUDY, B., SEN K., VEGA-SANZ DE MIERA, E., LAU, D., RED, R., AND WARD, D. Cloning of a human cDNA expressing a high voltage-activating, TEA sensitive type-A K<sup>+</sup> channel which maps to chromosome 1 band, p21. *J. Neurosci. Res.* 29: 401-412, 1991b.
- RUPPERSBERG, J. P., SCHROTER, K. H., SAKSMAN, B., STÖCKER, M., SEWING, S., AND PONGS, O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium channel proteins. *Nature* 345: 535-537, 1990.
- SANGUINETTI, M. C., CURRANT, M. E., ZOU, A., SHEN, J., SPECTOR, P. S., ATUNSON, D. L., AND KEATING, M. T. Coassembly of Kv(L)QT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384: 80-83, 1996.

- SCHNEIDER, J. S., LEVINE, M. S., HULL, C. D., AND BUCHWALD, N. A. Development of somatosensory responsiveness in the basal ganglia in awake cats. *J. Neurophysiol.* 54: 143-154, 1985.
- SCHROTER, K. H., RUPERSBERG, J. P., WUNDER, F., RETTING, J., STOCKER, M., AND PONGS, O. Cloning and functional expression of a TEA-sensitive A-type potassium channel from rat brain. *FEBS Lett.* 278: 211-216, 1991.
- SEKIRNIAK, C., MARTONE, M. E., WEISER, M., DEERINCK, T., BUENO, E., RUDY, B., AND ELLISMAN, M. Subcellular localization of the K<sup>+</sup> channel subunit Kv3.1b in selected rat CNS neurons. *Brain Res.* 766: 173-187, 1997.
- SERODIO, P., KENTROS, C., AND RUDY, B. Identification of molecular components of A channels activating at subthreshold potentials. *J. Neurophysiol.* 72: 1516-1529, 1994.
- SERODIO, P., VEGA-SAENZ DE MIERA, E., AND RUDY, B. Cloning of a novel component of A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J. Neurophysiol.* 75: 2174-2179, 1996.
- SHENG, M., LIAO, Y. J., JAN, Y. N., AND JAN, L. Y. Presynaptic A-current based on heteromultimeric K<sup>+</sup> channels detected in vivo. *Nature* 365: 72-75, 1993.
- SMITH-MAXWELL, C. J., LEDWELL, J. L., AND ALDRICH, R. W. Role of the S4 in cooperativity of voltage-dependent potassium channel activation. *J. Gen. Physiol.* 111: 399-420, 1998.
- STEFANI, A., CALABRESI, P., MERCURI, N. B., AND BERNARDI, G. A-current in rat globus pallidus: a whole-cell voltage clamp study on acutely dissociated neurons. *Neurosci. Lett.* 144: 4-8, 1992.
- STEFANI, A., PISANI, A., BONCI, A., STRATTA, F., AND BERNARDI, G. Outward potassium currents activated by depolarization in rat globus pallidus. *Synapse* 20: 131-136, 1995.
- SURMEIER, D. J., SENO, N., AND KITAI, S. T. Acutely isolated neurons of the rat globus pallidus exhibit four types of high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> current. *J. Neurophysiol.* 71: 1272-1280, 1994.
- TKATCH, T., BARANAUSKAS, G., AND SURMEIER, D. J. Basal forebrain neurons adjacent to the globus pallidus co-express GABA-ergic and cholinergic marker mRNAs. *Neuroreport* 9: 1935-1939, 1998.
- VEGA-SAENZ DE MIERA, E., RUDY, B., SUGIMORI, M., AND LLINAS, R. Molecular characterization of the sodium channel subunits expressed in mammalian cerebellar Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7059-7064, 1997.
- VEGA-SAENZ DE MIERA, E., WEISER, M., KENTROS, C., LAU, D., MORENO, H., SERODIO, P., AND RUDY, B. Shaw-related K<sup>+</sup> channels in mammals. In: *Handbook of Membrane Channels*. New York: Academic Press, 1994, p. 41-78.
- WANG, H., KUNKEL, D. D., MARTIN, T. N., SCHARTZKROIN, P. A., AND TEMPEL, B. L. Heteromultimeric K<sup>+</sup> channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature* 365: 75-79, 1993.
- WANG, H., KUNKEL, D. D., SCHARTZKROIN, P. A., AND TEMPEL, B. L. Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata and dendrites in the mouse brain. *J. Neurosci.* 14: 4588-4599, 1994.
- WANG, L. Y., GAN, L., FORSYTHE, I. D., AND KACZMAREK, L. K. Contribution of the Kv3.1 potassium channel to high-frequency firing in mouse auditory neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 509: 183-194, 1998.
- WEISER, M., BUENO, E., SEKIRNIAK, C., MARTONE, M. E., BAKER, H., HILLMAN, D., CHEN, S., THORNHILL, W., ELLISMAN, M., AND RUDY, B. The potassium channel subunit Kv3.1b is localized to somatic and axonal membranes of specific populations of CNS neurons. *J. Neurosci.* 15: 4298-4314, 1995.
- WEISER, M., VEGA-SAENZ DE MIERA, E., KENTROS, C., MORENO, H., FRANZEN, L., HILLMAN, D., BAKER, H., AND RUDY, B. Differential expression of Shaw-related K<sup>+</sup> channels in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 14: 949-972, 1994.
- WU, R. L. AND BARISH, M. E. Two pharmacologically and kinetically distinct transient potassium currents in cultured embryonic mouse hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 12: 2235-2246, 1992.

"Pero si me dan a elegir  
de entre las vidas (yo escojo)  
la del pirata cojo con pata de palo  
y parche en el ojo  
el viejo truán, capitan  
de un barco que tuviera por bandera  
un par de tibias y una calavera....."

Joaquin Sabina.