



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

**“Efecto del potasio en la estabilidad y la
selectividad de los canales de potasio Shab”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA

PRESENTA

MARCO VINICIO AMBRIZ RIVAS

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS:
DR. FROYLÁN MIGUEL GÓMEZ LAGUNAS

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi familia, mis amigos, compañeros, profesores... y en general a todos los que me han apoyado. Sin su valiosa ayuda este trabajo no se hubiera realizado. Muchas gracias.

mayo de 2006

Marco Vinicio Ambriz Rivas

Efecto del potasio en la estabilidad y la selectividad de los canales de potasio Shab

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Generalidades	4
1.1.1. El modelo de Hodgkin-Huxley y las propiedades funcionales de los canales iónicos	4
1.1.2. Naturaleza molecular	5
1.1.3. Estudios sobre la estructura tridimensional	6
1.2. Estructura de los canales de K ⁺ activados por voltaje	7
1.2.1. El poro	7
1.2.2. Vestíbulo externo	8
1.2.3. Cavidad interna o vestíbulo interno	9
1.2.4. El sensor de voltaje	9
1.2.5. Domino de tetramerización o T1	10
1.3. Mecanismos de permeación y <i>gating</i>	10
1.3.1. Permeación selectiva de K ⁺	11
1.3.1.1. Selectividad	11
1.3.1.2. Permeación	12
1.3.2. Mecanismos de <i>gating</i>	13
1.3.2.1 <i>Gating</i> de las compuertas de activación e inactivación	13
1.3.2.2 Movimiento del sensor de voltaje	16
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	19
2.1. Interacción entre la permeación y el <i>gating</i> : efecto del K ⁺ en la función de los canales de K ⁺ activados por voltaje	19
2.2. Sobrevivencia de la actividad del rectificador tardío de calamar en soluciones de 0K ⁺	20
2.3. El Kv2.1 y otros RTs son estables en 0K ⁺ y conducen Na ⁺	20

	Página
2.4. Comportamiento de los canales Kv1.5 y Kv1.3	21
2.5. Propiedades del canal Shaker en 0K ⁺	21
2.5.1. Colapso de la conductancia en ausencia de K ⁺	21
2.5.2. Permeación de Na ⁺ a través del canal Shaker	23
2.6. Planteamiento del problema	24
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo general	25
3.2. Objetivos específicos	25
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. Cultivo celular y expresión de canales iónicos	26
4.2. Registros electrofisiológicos	26
4.2.1. Electroodos	26
4.3. Soluciones	26
4.4. Análisis	27
CAPÍTULO V. RESULTADOS	28
5.1. Caída de la conductancia del canal Shab en 0K ⁺	28
5.1.1. Caída de G _K en soluciones con diferentes composiciones iónicas	28
5.1.2. Irreversibilidad del colapso de G _K	30
5.2. Estabilidad de G _K en soluciones con K ⁺	32
5.3. Conducción iónica del Shab en 0K ⁺	33
5.4. Estabilidad del canal Shaker en 0K ⁺	35
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	38
6.1. Discusión	38
6.1.1. Sitios de unión a K ⁺ que confieren de estabilidad al Shab	38
6.1.2. El canal Shab entra en estados no-conductores, no-inactivados, tras la caída de G _K	39
6.1.3. Conducción iónica	41
6.1.4. Relación entre la composición de la solución de 0K ⁺ y el colapso de G _K en el canal Shaker	41
6.1.5. Comparación entre la estabilidad del canal Shab y otros canales de K ⁺ activados por voltaje	42

	Página
6.2. Conclusiones	43
APÉNDICE A. USO DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN DE CANALES IÓNICOS	45
A.1. Introducción a los baculovirus	45
A.1.1. Tipos de transmisión <i>in vivo</i>	46
A.2. Los Baculovirus como vectores de expresión	48
A.2.1. Líneas celulares	48
A.2.2. Comparación entre la infección <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	49
A.2.3. Citopatogénesis de las células huésped por baculovirus recombinantes	49
A.3. Características del sistema de expresión	50
A.3.1. Ventajas	50
A.3.2. Limitantes	51
A.4. Expresión de canales iónicos por medio de baculovirus	51
APÉNDICE B. ARTÍCULO PUBLICADO	53
BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Dominios funcionales de los canales Kv	5
Figura 2. Estructura del poro	8
Figura 3. Estructura de dos canales de K ⁺ activados por voltaje	10
Figura 4. Permeación y selectividad	12
Figura 5. <i>Gating</i> de las compuertas de activación e inactivación	13
Figura 6. Modelos del sensor de voltaje	17
Figura 7. Alineamiento entre los canales Shaker, Shab y Kv2.1 en la región del poro (S5-S6)	23
Figura 8. Caída de la G _K del canal Shab en soluciones de 0K ⁺ con diferentes composiciones iónicas	29
Figura 9. Curso temporal de I _K del Shab antes y después de ir a 0K ⁺	31
Figura 10. Estabilidad del canal Shab en soluciones con K ⁺	32
Figura 11. Conducción iónica en 0K ⁺	34
Figura 12. Estabilidad del canal Shaker en soluciones de 0K ⁺ y 0Na ⁺	36
Figura 13. Comparación entre las I _g de los canales Shaker y Shab en 0K ⁺	40
Figura 14. Ciclo de vida del baculovirus <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	47
Figura 15. Comparación entre las células Sf9 infectadas y no infectadas con baculovirus	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Relación de abreviaturas y símbolos	V
Tabla 2. Líneas celulares más comunes para el manejo de Baculovirus recombinantes	48

Tabla 1. Relación de abreviaturas y símbolos

Abreviatura	Significado
~	aproximadamente
0K ⁺	cero potasio (K ⁺ no añadido)
0Na ⁺	cero sodio (Na ⁺ no añadido)
2K ₀	solución externa de 2 mM K ⁺
AcMNPV	virus de la polihedrosis nuclear múltiple de <i>Autographa californica</i>
BmNPV	virus de la polihedrosis nuclear de <i>Bombyx mori</i>
cDNA	DNA complementario
Colina ₀	solución externa de colina
Cs ₀	solución externa de Cs ⁺
G _{Cs}	conductancia al Cs ⁺
G _K	conductancia al K ⁺
G _{Na}	conductancia al Na ⁺
HP	potencial de reposo membranal
I _{Cs}	corriente de Cs ⁺
I _g	corrientes de <i>gating</i>
I _K	corriente de K ⁺
I _{Na}	corriente de Na ⁺
K ₀	solución externa de K ⁺ (100 mM)
kHz	kilohertz
K _i	solución interna de K ⁺
min	minutos
mM	milimolar
ms	milisegundos
mV	milivoltios
nA	nanoamperios
Na ₀	solución externa de Na ⁺
Na _i	solución interna de Na ⁺
NMG ⁺	N-metil-D-glucamina
NMG ₀	solución externa de NMG ⁺
NMG _i	solución interna de NMG ⁺
P _K	permeabilidad al K ⁺
P _{Na}	permeabilidad al Na ⁺
S.E.M.	desviación estándar
seg	segundos
TEA ⁺	tetraetilamonio
TMA ⁺	tetrametilamonio
μs	microsegundos

RESUMEN

Los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) son un grupo diverso de proteínas integrales de membrana que tienen en común el presentar una mayor selectividad a los iones K^+ que a los iones Na^+ [Hille, 1992]. Los iones K^+ , además de fluir a través de los canales y de modular de forma variable sus cambios conformacionales (*gating*), son un factor indispensable para mantener el estado funcional normal de estas proteínas. La remoción de K^+ en ambos lados de la membrana celular ejerce efectos drásticos en el estado funcional de cada tipo de canal. Así por ejemplo, Almers y Armstrong [1980] reportaron que el rectificador tardío del axón gigante de calamar pierde su actividad de modo irreversible en soluciones libres de K^+ . Por otro lado, las investigaciones realizadas con el canal Shaker B han demostrado que su conductancia se colapsa (cae) tras activar repetidamente a los canales durante la exposición a soluciones sin K^+ . El colapso es catalizado por Na^+ y se revierte completamente con despolarizaciones muy prolongadas [Gomez-Lagunas, 1997, 2001, 2004].

Los estudios recientes muestran que las respuestas a la ausencia de K^+ de los distintos tipos de canales que han sido estudiados son extremadamente variables. Las respuestas van desde la insensibilidad (ausencia de efecto), pérdida de la selectividad, o incluso, la abolición de la actividad del canal [e.g., ver Korn e Ikeda, 1995; Gomez-Lagunas, 1997; Immke *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000]. Esta diversidad de efectos resulta sorprendente, si se considera que todos los canales de K^+ comparten la misma secuencia característica, así como una estructura tridimensional muy conservada en la región del poro. Lo anterior muestra que el mecanismo y las bases moleculares de este fenómeno aun no se comprenden bien. Por lo tanto, para entender mejor el papel del K^+ en la selectividad y la estabilidad de los canales K_v , se decidió extender estos estudios a los canales rectificadores tardíos Shab.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis con el Shab muestran que la conductancia a K^+ (G_K) del canal es muy estable en ausencia del K^+ interno (K_o/Na_i) o del externo (Na_o/K_i), aunque la estabilidad es mayor con el K^+ del lado externo de la membrana (en K_o/Na_i). En cambio, G_K cae rápida e irreversiblemente (~80% en tan sólo 90 segundos) después de exponer a los canales a soluciones sin K^+ ($0K^+$) en ambos lados de la membrana. La caída de G_K ocurre aún con los canales cerrados y no depende de la composición de la solución de $0K^+$. En contra de lo que se esperaba, el canal Shab no presenta una conductancia a Na^+ (G_{Na}) cuantificable en ausencia de K^+ . Cabe señalar que el canal conduce muy bien Cs^+ en soluciones libres de K^+ , lo que

sugiere que la ausencia de una G_{Na} en $0K^+$ no se debe a una alta afinidad del poro por K^+ .

En general, de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos se sugiere que:

- 1) Existen dos sitios en donde K^+ mantiene la G_K estable: uno externo (por fuera del filtro de selectividad) y otro interno.
- 2) El canal Shab, tras ser expuesto a soluciones de $0K^+$, transita a través de estados no-conductores sin ser capaz de alcanzar el estado abierto (al ser activado por despolarizaciones).
- 3) La incapacidad de detectar G_{Na} en $0K^+$ no se debe a que los iones K^+ permanezcan fuertemente unidos al poro de los canales.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los canales de K⁺ son un grupo muy diverso de proteínas integrales de membrana que contribuyen de manera significativa al comportamiento eléctrico de las membranas biológicas. Originalmente, estas entidades moleculares fueron identificadas como las responsables de mediar el flujo saliente de potasio a través de las membranas neuronales durante la repolarización de los potenciales de acción. Los canales de K⁺ catalizan el flujo pasivo (a favor de gradiente) de los iones K⁺ a través de la membrana celular, con lo que controlan la excitabilidad de las membranas biológicas y en buena medida son responsables de establecer el potencial de reposo en las células, tanto excitables como no excitables. En células excitables (neuronas y músculos) las corrientes a través de canales de K⁺ siempre son hiperpolarizantes y sirven para controlar la duración, forma y frecuencia de disparo de los potenciales de acción. Los canales de K⁺ también desempeñan funciones importantes en las células no excitables; por ejemplo ayudan a mantener el balance electrolítico y osmótico en células animales, vegetales, levaduras y bacterias; regulan el volumen de los eritrocitos contribuyendo a que mantengan su forma y volumen; modulan la mitogénesis de las células T y B, etcétera [e.g., ver Van Driessche y Zeiske, 1985; Kaji, 1986; Gardner, 1990; Muto, 2001; Tazawa *et al.*, 2001].

Estas moléculas están dotadas de sensores que responden a estímulos fisiológicos, por ejemplo el voltaje, ligandos como Ca²⁺, Mg²⁺, proteínas G y poliaminas. La diversidad funcional de los canales de K⁺ está a la par de su diversidad molecular; existen muchas familias distribuidas a lo largo del árbol filogenético, de acuerdo con lo demostrado a partir los proyectos de secuenciación de genomas. A la fecha todos los organismos estudiados poseen al menos un tipo de canal de K⁺, sin importar si son eucariontes, bacterias o arqueas [Littleton y Ganetzky, 2000]; ningún otro tipo de canal iónico muestra semejante ubicuidad.

De todos los tipos de canales de K⁺, aquellos activados por voltaje (o dependientes de voltaje) han sido extensamente estudiados debido a su relevancia desde el punto de vista fisiológico y biofísico. El estudio de los canales de K⁺ dependientes de voltaje ha sido un campo de investigación muy activo desde que los trabajos pioneros de Hodgkin y Huxley [Hodgkin y Huxley, 1952a, 1952b; Hodgkin *et al.*, 1952] sentaron las bases para el estudio de las propiedades eléctricas de las membranas biológicas. En el presente capítulo se describen las propiedades funcionales y estructurales de los canales de K⁺ activados por voltaje.

1.1. Generalidades

1.1.1. El modelo de Hodgkin-Huxley y las propiedades funcionales de los canales iónicos

Los estudios de Hodgkin y Huxley constituyen el primer paso para la comprensión de los canales iónicos. Estos investigadores estudiaron las corrientes iónicas responsables de la generación del potencial de acción en el axón gigante de calamar. A través de sus observaciones dedujeron que las corrientes en la membrana del axón se deben al flujo de dos especies iónicas, Na⁺ y K⁺, a través de vías independientes [Hodgkin y Huxley, 1952a, 1952b]. Actualmente, estas vías se conocen como canales iónicos. Cada vía (canal) posee conductancias que están en función del potencial de membrana y del tiempo.

En sus trabajos Hodgkin y Huxley describieron dos propiedades básicas que caracterizan a los canales iónicos, a saber: permeación y “*gating*”. Sobre la permeación, descubrieron que cada componente de la corriente obedece la ley de Ohm y presenta un potencial de inversión experimental idéntico al potencial de Nerst correspondiente. Esto implica que las corrientes en el axón se deben a la difusión de los iones a favor de su gradiente electroquímico. Respecto al *gating*¹ observaron que el transcurso temporal de cada conductancia es diferente. La conductancia al sodio (G_{Na}) se activa e inactiva (decae) rápidamente durante una despolarización, mientras que la conductancia al potasio (G_K) se activa con mayor lentitud y no se inactiva. Estos investigadores describieron el transcurso temporal de cada conductancia como una serie de reacciones cuyas cinéticas son gobernadas por constantes de velocidad dependientes del potencial de membrana y del tiempo.

Aunque Hodgkin y Huxley realizaron una descripción muy completa sobre las propiedades de cada permeabilidad, no pudieron precisar con detalle los mecanismos moleculares subyacentes. Con respecto a la permeación, demostraron que es a favor del gradiente electroquímico, mientras que su conclusión principal sobre el *gating* fue que su dependencia del voltaje depende de componentes en la membrana que se comportan como dipolos o cargas eléctricas a los cuales nombraron “partículas de *gating*” que se reorientaban bajo la influencia del potencial de membrana, lo que permitía (o bloqueaba, según el caso) el flujo de los iones. Las partículas de *gating* corresponden a lo que actualmente se conoce como sensores de voltaje.

¹ “*Gating*” denomina la serie de cambios conformacionales que sufre un canal durante su funcionamiento

1.1.2. Naturaleza molecular

Durante mucho tiempo no se contó con información sobre la naturaleza molecular de las vías de permeación descritas por Hodgkin y Huxley. La noción de que las vías son canales transmembranales provino de experimentos de bloqueo selectivo y medición de la conductancia realizadas empleando agentes farmacológicos como la tetrodotoxina (TTX), que bloquea G_{Na} [Narahashi *et al.*, 1964; Nakamura *et al.*, 1965]; y el tetraetilamonio (TEA⁺), que bloquea G_K [Hagiwara y Saito, 1959; Armstrong y Binstock, 1965]. Esta propuesta fue confirmada como resultado del estudio de corrientes unitarias (corrientes a través de un solo canal) [Hladky y Haydon, 1972].

Posteriormente se descubrió que los canales iónicos son proteínas integrales de membrana con varios segmentos transmembranales. El primer canal de K⁺ clonado fue el llamado Shaker, de *Drosophyla melanogaster*; su clonación y secuenciación fue reportada simultáneamente por los laboratorios de Jan y Jan [Tempel *et al.*, 1987], Tanouye [Kamb *et al.*, 1987] y Pongs [Pongs *et al.*, 1988]. El análisis de su secuencia reveló que cada polipéptido está formado por seis segmentos transmembranales, S1 a S6 (Figura 1). Los segmentos S1 a S4 conforman al dominio encargado de sensor el voltaje, mientras que S5 y S6 constituyen el poro de los canales. Los canales de K⁺ son

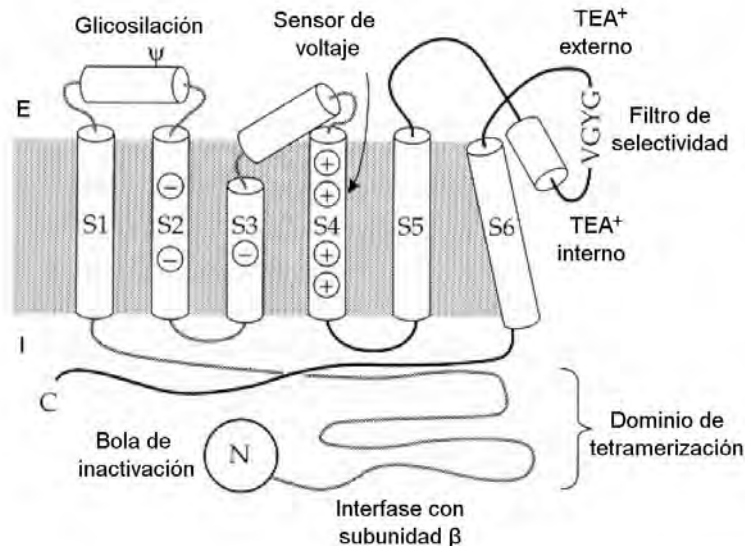


Figura 1. Dominios funcionales de los canales Kv [Hille, 2001]. Se muestran las principales regiones de las subunidades α (principales) de estos activados por voltaje. E indica el lado extracelular, mientras que I es el intracelular.

tetrámeros ya que se requieren cuatro polipéptidos para formar un canal funcional [MacKinnon, 1991].

Poco tiempo después se encontraron otros tres canales de K⁺ activados por voltaje en *D. melanogaster* que son muy similares al Shaker y que fueron denominados Shab, Shaw y Shal [Butler *et al.*, 1989, 1990]. Estudios posteriores identificaron más canales de K⁺ en diversos organismos (animales, plantas, bacterias, etcétera), algunos de ellos presentan arquitecturas moleculares muy distintas a las del Shaker u otros canales activados por voltaje. Sin embargo, todos los canales de K⁺ descritos presentan una secuencia muy conservada, TXGYG, que se denomina “secuencia característica” [Heginbotham *et al.*, 1994]; a nivel estructural esta secuencia constituye el filtro de selectividad. La secuencia característica y su estructura asociada son críticas para mantener la selectividad a K⁺ que exhiben estos canales [Heginbotham *et al.*, 1994; Doyle *et al.*, 1998].

Actualmente, los canales de K⁺ activados por voltaje se clasifican en varias familias² [Chandy y Gutman, 1993; Gutman *et al.*, 2003, 2005]. Las familias KCNQ y eag están compuestas por canales con cinética de activación lenta. El grupo denominado canales Kv está conformado por las familias Kv1, Kv2, Kv3, y Kv4 que son homólogas de los canales Shaker, Shab, Shaw y Shal, respectivamente. Se caracterizan por poseer cinéticas de activación rápida, además de ser muy similares entre sí a nivel funcional y estructural [Coetzee *et al.*, 1999]. En adelante sólo se discutirán las propiedades de los canales del grupo Kv.

1.1.3. Estudios sobre la estructura tridimensional

Gracias a diversos experimentos electrofisiológicos se empezaron a conocer los aspectos funcionales más importantes de estas macromoléculas. Sin embargo, los modelos generados carecían de detalles a escala atómica. Esta situación cambió en 1998, cuando el grupo de MacKinnon logró resolver la estructura del canal de K⁺ bacteriano KcsA, al parecer en el estado cerrado, por medio de cristalografía de rayos X [Doyle *et al.*, 1998]. Este sencillo canal sólo consta de dos segmentos transmembranales (M1 y M2) que forman el poro y tiene forma de cono invertido (Figura 2). La estructura del KcsA mostró detalles moleculares que al parecer concuerdan con los modelos previos. Aunque esta estructura resultó un avance importante en el área, no ayudó a comprender el *gating* de los canales. Tiempo después este grupo cristalizó

² La clasificación se basa en el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos.

otro canal bacteriano: el MthK (de dos segmentos transmembranales) que se encuentra en el estado abierto [Jiang *et al.*, 2002a]. La estructura también concuerda con resultados previos sobre la localización de la compuerta de activación y su mecanismo de *gating*.

Recientemente, el grupo de MacKinnon cristalizó dos canales dependientes de voltaje. El primero es el canal KvAP, de la arquea *Aeropyrum pernix* [Jiang *et al.*, 2003a]. Los resultados obtenidos sobre esta estructura fueron completamente inesperados y contradicen la visión aceptada sobre la estructura y movimiento del sensor de voltaje. En la actualidad el debate en torno a esta estructura se ha centrado en si representa o no al estado nativo de los canales. El segundo canal es el Kv1.2, un canal eucariote (de *Rattus norvegicus*) bien caracterizado [Long *et al.*, 2005a]. Aunque su estructura se asemeja más al modelo aceptado sobre el sensor de voltaje, todavía no aporta evidencias concluyentes sobre la estructura y mecanismo de acción de este. Se requieren más estudios para poder esclarecer el funcionamiento del sensor del voltaje y la forma de acoplarse con la compuerta de activación.

En la siguiente sección se presentará a detalle los resultados de estos estudios y su importancia en la comprensión de la estructura y función de los canales de K⁺ activados por voltaje.

1.2. Estructura de los canales de K⁺ activados por voltaje

A partir de los numerosos estudios sobre este grupo de canales de K⁺ se conocen los siguientes componentes estructurales:

1.2.1. El poro

Este dominio está formado por los segmentos transmembranales S5-S6 conectados por el asa del poro (o asa P). Su función principal es servir como vía de permeación y selección de los iones. Los detalles estructurales de este dominio se obtuvieron gracias a la cristalización del canal KcsA y se muestran en la Figura 2 [Doyle *et al.*, 1998]. El segmento transmembranal S5 (equivalente a M1 del KcsA) se encuentra ubicado en la periferia del poro, es una hélice transmembranal que cruza desde el lado intracelular al lado extracelular y se conecta con una estructura llamada torreta (que es importante en la unión de toxinas). En el extremo carboxilo terminal de la torreta se encuentra el asa P que consta de dos partes: la hélice del poro, que se extiende de modo entrante hasta

un tercio de la longitud de la membrana y al lado se localiza el filtro de selectividad, que da vuelta hacia el lado externo del canal.

El filtro de selectividad es una estructura de forma cilíndrica con 3 Å de diámetro en la que se encuentran cuatro sitios de unión a K⁺ (Figura 2A). Cada ion K⁺ es coordinado por ocho oxígenos provenientes de los grupos carbonilo de la cadena principal. En los sitios de unión a K⁺ los iones se encuentran deshidratados. El filtro de selectividad desemboca en la hélice interna, formada por el segmento S6 (M2) que cruza del lado externo al interno. Las cuatro hélices internas del canal delimitan la cavidad interna y cerca del lado citoplasmático (extremo carboxilo terminal) convergen hacia un cruce. El cruce de las hélices constituye la compuerta de activación de los canales de K⁺ y forma una barrera al flujo de iones cuando está cerrada.

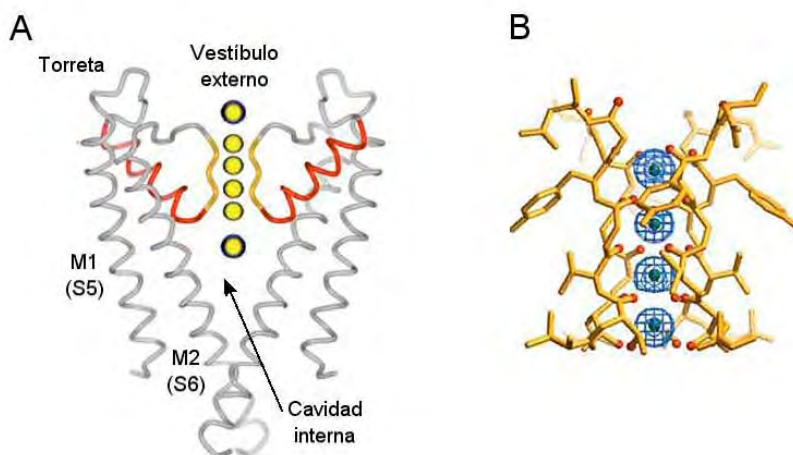


Figura 2. Estructura del poro. (A) Diagrama de listones de dos de las subunidades del KcsA, mostrando en dorado el filtro de selectividad y la hélice del poro en rojo [Zhou *et al.*, 2001a]. Se muestran los seis sitios de unión a K⁺. (B) Vista detallada del filtro de selectividad con sus cuatro sitios de unión, con iones K⁺ deshidratados [Zhou *et al.*, 2001a; MacKinnon, 2003]. Cada ion K⁺ es coordinado por ocho oxígenos (cuatro por arriba y cuatro por debajo).

1.2.2. Vestíbulo externo

Es la región cóncava del canal que se encuentra del lado extracelular y está formado por varios residuos de la torreta y del asa P. En él se localiza el sitio de bloqueo de muchas toxinas naturales y del tetraetilamonio (TEA⁺) externo (Figura 1). También está implicado en el proceso de inactivación tipo C. Esta región del canal tiene un sitio de unión a K⁺ que se ubica justo por encima del filtro de selectividad [Zhou *et al.*, 2001a], como muestra la Figura 2A.

1.2.3. Cavidad interna o vestíbulo interno

Se trata de una cavidad formada por las paredes de la hélice interna (Figura 2A). En esta cavidad se aloja un ión K⁺ hidratado [Zhou *et al.*, 2001a]. Además, éste es el sitio de bloqueo por TEA⁺ intracelular (Figura 1) [Zhou *et al.*, 2001b]. Antes de que se contara con las estructuras cristalográficas Armstrong demostró por medio de derivados del TEA⁺ que su sitio de bloqueo (las paredes de la cavidad interna) es de naturaleza hidrófoba [Armstrong, 1971].

1.2.4. El sensor de voltaje

Está formado por los segmentos transmembranales S1 a S4, los tres primeros segmentos son hélices ricas en residuos hidrófobos, mientras que el S4 posee residuos con carga positiva cada tercer posición [Aggarwal y MacKinnon. 1996; Seoh *et al.*, 1996]. Las evidencias experimentales indican que el S4 es el elemento estructural encargado de sensar el voltaje. El segmento S4 se comporta como la "partícula de *gating*" predicha por Hodgkin y Huxley, puesto que se mueve en respuesta a cambios en el potencial de membrana.

Cabe destacar que la estructura del sensor de voltaje, y el modo en el que este opera aún no han sido claramente establecidos. El modelo clásico sobre la arquitectura molecular del sensor de voltaje propone que los segmentos S1, S2 y S3 atraviesan transversalmente la membrana y que están expuestos a los lípidos de ésta, mientras que el segmento S4 se encontraría rodeado por los demás segmentos transmembranales, dentro de una cavidad conformada por proteína. Este modelo convencional contrasta con la estructura cristalográfica del canal KvAP (Figura 3A) [Jiang *et al.*, 2003a]. La estructura de este canal muestra varios aspectos desconcertantes, entre los que destacan: a) la ubicación de los segmentos S1 a S4, que yacen casi paralelos al plano de la membrana y b) que las cargas del S4 se encuentran expuestas directamente a los lípidos de la membrana, en un medio con una constante dieléctrica muy baja. Esta estructura ha recibido muchas críticas en contra por su inconsistencia con la mayoría de los estudios previos sobre el sensor de voltaje. Desde el punto de vista físico es improbable que las cargas del segmento S4 se muevan a través de un medio tan apolar ya que es muy desfavorable desde el punto de vista energético.

La reciente estructura propuesta para el canal Kv1.2 (un canal de mamífero) no ha resultado concluyente para esclarecer esta cuestión, porque aunque en ella todos los segmentos transmembranales atraviesan la membrana de forma casi perpendicular (Figura 3B), los autores continúan interpretando que las cargas de *gating* del segmento S4 se encuentran expuestas a los lípidos y que se mueven a través de la membrana según el “modelo de remo” [Long *et al.*, 2005b].

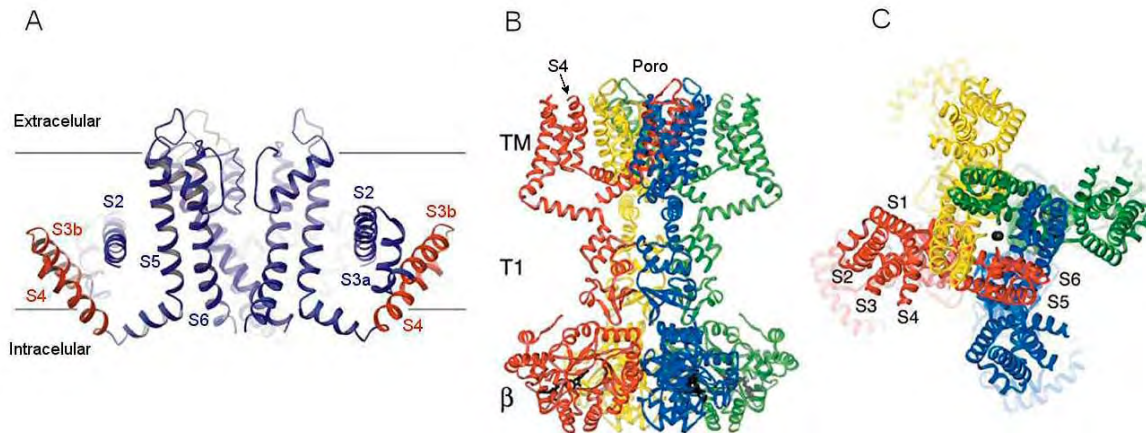


Figura 3. Estructura de dos canales de K⁺ activados por voltaje. (A) Modelo del canal KvAP, en el que se muestra la orientación de los segmentos transmembranales respecto a la membrana [Jiang *et al.*, 2003b]. Los segmentos S4 y S3b forman la estructura en forma de remo, que está marcada en rojo. Para mayor claridad se omitió la subunidad frontal y el segmento S1 de las otras subunidades. (B) Vista lateral del canal Kv1.2, con sus cuatro subunidades [Long *et al.*, 2005a]. TM señala al dominio formado por los segmentos transmembranales. (C) El canal Kv1.2 visto desde el lado extracelular [Long *et al.*, 2005a]. En la imagen se señala la ubicación de los segmentos transmembranales en una de las subunidades.

1.2.5. Domino de tetramerización o T1

Los canales de las familias Kv tienen un dominio conservado denominado T1, que se encuentra en el extremo amino (N) terminal del canal (Figuras 1 y 3B). Se trata de una estructura globular citoplásmica que se encuentra por debajo del poro del canal. El dominio T1 tiene dos funciones: a) Evita que se ensamblen heterotetrámeros formados por subunidades de familias diferentes, lo que confiere especificidad a la asociación de subunidades [Li *et al.*, 1992; Shen y Pfaffinger, 1995]. b) Es el sitio de unión a subunidades β accesorias que modulan el *gating* de los canales [Gulbis *et al.*, 2000], las cuales se asocian en la parte inferior del T1.

1.3. Mecanismos de permeación y *gating*

Conceptualmente, los canales de K⁺ poseen dos propiedades que Hodgkin y Huxley consideraron como independientes³: la permeación y el *gating*. Actualmente se cuenta con una imagen más o menos detallada de los mecanismos moleculares que subyacen a la permeación (permeación y selectividad) y el *gating* (que incluye el *gating* de las compuertas del canal y el movimiento del sensor de voltaje), aunque aun continúan sin esclarecerse algunos puntos importantes, como el movimiento del sensor de voltaje. En la presente sección se presenta un resumen sobre la información reportada a la fecha en la literatura.

1.3.1. Permeación selectiva de K⁺

1.3.1.1. Selectividad

Los canales de K⁺ permiten el flujo de iones K⁺ sin que algún otro catión fisiológicamente relevante (principalmente Na⁺, que es el catión monovalente competidor más abundante en el medio fisiológico) logre atravesar sus poros. Este cometido lo realizan con un grado exquisito de selectividad ya que la proporción de permeabilidades entre K⁺ y Na⁺ es de al menos 1000 a 1. El filtro de selectividad es el elemento estructural clave en el proceso de selección de los iones permeables.

Como se mencionó con anterioridad, los sitios de unión a K⁺ están constituidos por ocho oxígenos (del grupo carbonilo) que poseen un momento dipolar negativo. La distancia entre estos oxígenos, que es de 3Å de diámetro, imita la primera capa de la esfera de hidratación de los iones K⁺ en solución (Figura 4A). En consecuencia, los iones K⁺ que se aproximan al filtro son coordinados por los oxígenos de los sitios de unión a K⁺ y pierden su capa de hidratación, con los que quedan específicamente unidos dentro del filtro. El proceso de deshidratación de los iones K⁺ por parte del filtro es favorable en términos termodinámicos.

En cambio, los iones Na⁺ son demasiado pequeños como para ser coordinados por todos los oxígenos de los sitios de unión a K⁺. Se ha propuesto que debido a restricciones estructurales el filtro de selectividad no puede contraerse para coordinar al

³ De hecho el concepto de independencia entre permeación y *gating* es obsoleto. Actualmente, las evidencias experimentales indican que estas propiedades interactúan. En el próximo capítulo se abordará con detalle este tema.

Na⁺ (Figura 4A)⁴. Por lo tanto, la remoción de su capa de hidratación resulta energéticamente desfavorable, impidiendo su penetración en el poro⁵. Los aspectos básicos sobre el mecanismo de selectividad expuesto en las líneas anteriores fue propuesto originalmente hacia mediados de la década de los setenta por Armstrong [Armstrong, 1975]; hipótesis que fue corroborada a nivel atómico por las estructuras cristalográficas del KcsA [Zhou *et al.*, 2001a].

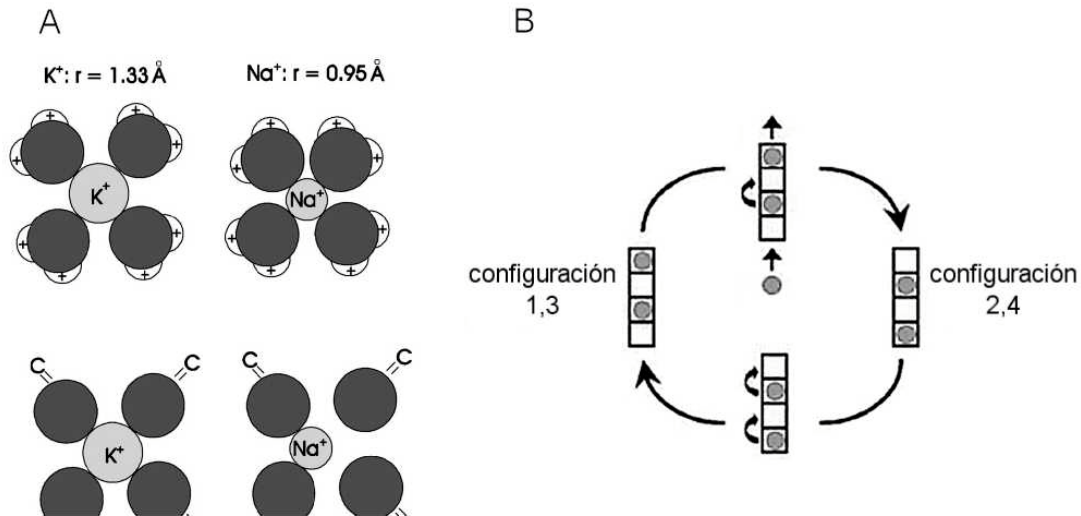


Figura 4. Permeación y selectividad. (A) Modelo de discriminación entre K⁺ y Na⁺ [Bezanilla y Armstrong, 1972; Armstrong, 2003]. En la parte superior se muestran a los iones con su esfera de hidratación, mientras que en la parte de abajo están dentro del filtro de selectividad (sólo se muestran cuatro oxígenos). (B) Ciclo de conducción de K⁺, en el que se muestra las configuraciones 1,3 y 2,4 [Morais-Cabral *et al.*, 2001]. Para contar con más detalles, consulte el texto correspondiente.

1.3.1.2. Permeación

Respecto a la permeación, se sabe que es el resultado de la ocupación del poro por múltiples iones K⁺ [Hodgkin y Keynes, 1955; Hille y Schwarz, 1978; Morais-Cabral *et al.*, 2001]. Se ha propuesto que el filtro de selectividad normalmente tiene ocupados dos de sus sitios de unión a K⁺. Esto da origen a dos configuraciones distintas: 1,3 y 2,4 (1 es el sitio más externo y 4 está junto a la cavidad interna), en la que los iones K⁺ se encuentran separados entre sí por una molécula de agua. La repulsión electrostática entre los dos iones K⁺ próximos ayuda a que la afinidad intrínseca de éstos por los

⁴ Muchos estudios recientes sugieren que la propuesta MacKinnon de un filtro rígido es errónea: la estructura del filtro de selectividad no es rígida, sus fluctuaciones térmicas permiten que incluso acomode iones Na⁺ [e.g. ver Roux, 2005].

⁵ Sin embargo, en el próximo capítulo veremos que existen canales de K⁺ capaces de conducir Na⁺ bajo ciertas condiciones.

sitios de unión disminuya lo suficiente como para permitir que los iones cambien de posición dentro del poro.

Las configuraciones 1,3 y 2,4 forman parte de un ciclo de conducción como se muestra en la Figura 4B. El ciclo corresponde a un ion K⁺ que atraviesa el filtro de selectividad: un ion entra a la fila desde un lado del filtro mientras que otro sale del lado opuesto. La dirección neta del flujo está determinada por el gradiente electroquímico del K⁺. Esta imagen, basada en los estudios cristalográficos [Morais-Cabral *et al.*, 2001], concuerda con los experimentos que llevaron a Hodgkin y Keynes a postular que la conducción de K⁺ requiere del movimiento en fila india de dos a tres iones a través de la membrana [Hodgkin y Keynes,1955].

1.3.2. Mecanismos de *Gating*

1.3.2.1. *Gating* de las compuertas de activación-cierre e inactivación

Para poder cumplir con sus funciones de señalización eléctrica, los canales de K⁺ regulan la permeabilidad de sus iones K⁺ a través de tres mecanismos principales: activación, cierre e inactivación (esta última puede ser de dos tipos: rápida o lenta, dependiendo de la magnitud de la constante de tiempo de inactivación). La activación y el cierre son controlados por la misma compuerta, que se localiza en la porción citoplásmica del S6. Por otro lado, cada tipo de inactivación es modulado por compuertas específicas. A continuación se presentan los detalles sobre cada uno de estos mecanismos de *gating*.

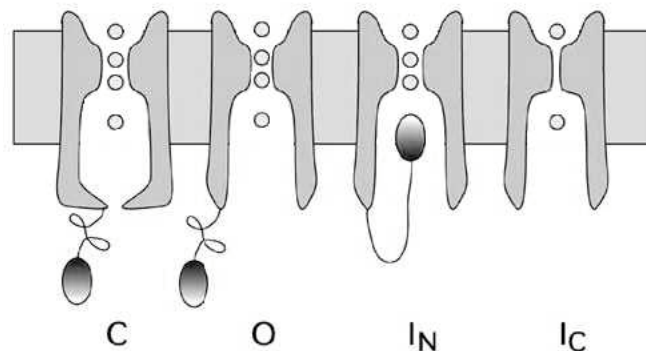


Figura 5. *Gating* de las compuertas de activación e inactivación. Esquema de los cuatro estados de los canales de K⁺ activados por voltaje [Korn y Trapani, 2005]: cerrado (C), abierto (O), en inactivación N (I_N) o inactivación C (I_C).

A) Activación-cierre: Las primeras nociones sobre la localización y función de la compuerta de activación-cierre fueron aportadas por Armstrong [Armstrong, 1971]. Sus experimentos con TEA⁺ y otros iones derivados del TEA⁺ mostraron que esta compuerta se encuentra en un dominio intracelular del canal (Figura 5). Recientemente se ha determinado que el TEA⁺ y sus derivados ocupan la cavidad interna y sólo acceden a este sitio de bloqueo cuando la compuerta del canal se encuentra abierta [Zhou *et al.*, 2001b]. Los estudios posteriores de Yellen y colaboradores [Holmgren *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997] indican que la compuerta está formada por la secuencia PXP (residuos 473 a 475 del Shaker, ver Figura 7), que se localiza cerca del extremo carboxilo terminal del S6. Dicha secuencia está muy conservada entre los canales de K⁺ activados por voltaje de origen eucarionte [Lu *et al.*, 2001].

Como resultado de estos y otros estudios funcionales [Holmgren *et al.*, 1998; del Camino *et al.*, 2000, 2001] y estructurales [Jiang *et al.*, 2002b] se ha construido un modelo plausible del *gating* de la compuerta de activación-cierre. La secuencia PXP forma el cruce de las hélices internas y funge como una bisagra que expande o contrae al extremo citoplásmico del poro. En el estado cerrado, la distancia entre las hélices internas es muy estrecha en el punto del cruce. Durante la activación del canal, los segmentos S6 sufren una torsión que hace que se aparten entre sí en el punto de cruce. Esto provoca la formación de una abertura de tamaño considerable en el extremo citoplásmico del poro. La abertura comunica la cavidad interna del canal con la solución intracelular, permitiendo así el libre paso de los iones a través del poro (Figura 5). En cambio, durante el cierre las hélices internas (S6) dejan de experimentar torsión y vuelven a su posición original, cerrando la compuerta.

B) Inactivación rápida o inactivación tipo N: Este mecanismo de *gating* consiste en la obstrucción del poro por parte de un péptido bloqueador que forma parte del canal, como se ilustra en la Figura 5. El primer reporte de este fenómeno involucra al canal Shaker y se asemeja a la inactivación rápida de los canales de Na⁺. De modo similar a los iones de amonio cuaternario que estudió Armstrong [Armstrong, 1971, 1975], el extremo N terminal de los canales Shaker actúa como una partícula bloqueadora por que probablemente se une directamente a la cavidad interna [Zhou *et al.*, 2001b]. Debido a que esta interacción sólo ocurre tras la apertura de la compuerta de activación, los canales de K⁺ que presentan este fenómeno conducen transitoriamente durante el breve periodo entre su apertura y el bloqueo del poro por parte de la partícula de inactivación.

La localización de la partícula inactivadora varía entre los canales de K⁺. En algunos casos está en el extremo N terminal de la subunidad principal (α) [Hoshi *et al.*, 1990], mientras que en otros se encuentra en el extremo N terminal de una subunidad β asociada [Rettig *et al.*, 1994]. La inactivación tipo N puede ser eliminada de los canales por medio de digestión enzimática o por delección de la secuencia N terminal [Hoshi *et al.*, 1990], y se puede recuperar al añadir un péptido soluble con la misma secuencia del lado citoplásmico [Zagotta *et al.*, 1990]. No existe una secuencia consenso entre los extremos N terminales capaces de producir este tipo de inactivación, sin embargo es necesaria la presencia de residuos básicos e hidrófobos para que el péptido tenga la capacidad de interactuar con el canal abierto [Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993a, 1993b].

C) Inactivación lenta: Es un segundo mecanismo de inactivación que normalmente es mucho más lento que la inactivación tipo N y constituye otra alternativa para producir corrientes transitorias en respuesta a un estímulo sostenido. Existen varios mecanismos de inactivación lenta; sin embargo, el mejor caracterizado hasta ahora es la llamada inactivación tipo C, del canal Shaker. Los experimentos realizados por los grupos de Yellen [Yellen *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996] e Isacoff [Loots e Isacoff, 1998] sugieren que este mecanismo de inactivación implica la constricción del vestíbulo externo del canal (ver Figura 5). Esta es particularmente notoria en posiciones cercanas del filtro de selectividad.

Se la nombró inactivación tipo C debido a que este proceso se ve afectado por mutaciones cerca del extremo carboxilo del canal [Hoshi *et al.*, 1991]. La inactivación C persiste en los canales Shaker tras eliminar a la partícula inactivadora del extremo N terminal [Hoshi *et al.*, 1991] y se sabe que su velocidad se ve afectada por muchos factores. Altas concentraciones de K⁺ externo y otros cationes monovalentes permeables [Pardo *et al.*, 1992; Lopez-Barneo *et al.*, 1993] así como el TEA⁺ externo [Grissmer y Cahalan, 1989; Choi *et al.*, 1991] reducen la velocidad de inactivación C del canal Shaker.

Por otro lado algunos residuos que constituyen el vestíbulo externo influyen en su cinética. El estudio más destacado al respecto fue realizado sobre canal Shaker por medio de mutagénesis; este muestra que la posición 449 (localizada encima del filtro de selectividad) es crítica en el proceso: las mutaciones que introducen cargas tanto positivas como negativas aceleran la inactivación mientras que los residuos hidrófobos la hacen más lenta [Lopez-Barneo *et al.*, 1993]. En otros canales que presentan este tipo de inactivación, como Kv1.3 y Kv1.4 [Panyi *et al.*, 1995; Rasmusson *et al.*, 1995], la

posición equivalente a la 449 del Shaker ejerce los mismos efectos según el tipo de residuo presente [Pardo *et al.*, 1992; Jäger *et al.*, 1998].

En contraste, existe un grupo numeroso de canales Kv que presentan mecanismos de inactivación lenta distintos a la inactivación C, por ejemplo Kv1.5 [Fedida *et al.*, 1999], Kv2.1 [Klemic *et al.*, 1998], Kv3.1 [Klemic *et al.*, 2001], Kv4.1 [Jerng y Covarrubias, 1997] y Shab [Resultados sin publicar del grupo de Froylán Gomez Lagunas]. Aún no se comprenden a fondo los mecanismos moleculares de inactivación lenta de estos canales.

1.3.2.2. Movimiento del sensor de voltaje

El movimiento de carga a través de la membrana es el mecanismo básico por el cual opera el sensor de voltaje. Se calcula que en el Shaker se mueven de 12 a 13 cargas elementales (e_0) por canal durante la activación [Seoh *et al.*, 1996; Schoppa *et al.*, 1992; Aggarwal y MacKinnon, 1996]; la mayor parte de esta corresponde a los cuatro primeros residuos básicos (generalmente son argininas) del segmento S4 y se mueven hacia el lado extracelular en respuesta a despolarizaciones⁶ [Larsson *et al.*, 1996].

En la literatura están reportados una vasta cantidad de experimentos biofísicos sobre la accesibilidad, el movimiento y las distancias intramoleculares sobre esta región del canal. Estos datos, junto con los obtenidos por cristalografía, han dado lugar a tres distintos modelos sobre el movimiento del sensor de voltaje. Aún no se sabe con certeza cual es el modelo que describe mejor la realidad. La Figura 6 ilustra las características de cada modelo y los detalles sobre cada uno serán descritos a continuación:

A) Modelo canónico o de hélice deslizante [e.g., ver Catterall, 1986; Durell y Guy, 1992]: La Figura 6A muestra el modelo canónico. Aunque existen variaciones propuestas al modelo, la idea general consiste en que durante una despolarización el segmento S4 rota sobre su eje y al mismo tiempo sufre una traslación considerable en el sentido perpendicular a la membrana. Esto provoca que la exposición de las cargas del S4 cambie del lado intracelular al lado extracelular, translocando así las cargas de *gating* a través de la membrana. El resto del sensor de voltaje no sufre mayor perturbación.

⁶ A estas cargas se denominan “cargas de *gating*” y su movimiento produce las “corrientes de *gating*”, I_g . Estas últimas se comportan como corrientes capacitivas no lineales [Schneider y Chandler, 1973; Keynes y Rojas, 1974; Armstrong y Bezanilla, 1973].

Según esta propuesta, el segmento S4 se encuentra rodeado por las demás hélices transmembranales dentro de una especie de cavidad o “canalículo”.

En la versión original del modelo, el cambio de exposición requiere que el S4 sufra una translación de gran magnitud (16Å) y que se rompan los puentes salinos entre las argininas del S4 y residuos con cargas negativas presentes en S2 y S3, aspartatos y glutamatos, que estabilizan las cargas del S4 en su posición de reposo. Versiones más recientes [Gandhi e Isacoff, 2002; Ahern y Horn, 2004; Durell *et al.*, 2004] proponen que la translación del S4 es un poco menor debido a que las cargas del S4 se mueven a través de hendiduras en la estructura del sensor (conectadas al canalículo) que están llenas de moléculas de agua.

B) Modelo de transportador (Figura 6B) [Bezanilla, 2002; Starace y Bezanilla, 2004; Bezanilla y Roux, 2004]: El modelo de transportador es muy similar al modelo canónico puesto que también propone que el S4 se encuentra rodeado por los demás segmentos transmembranales. En este modelo las cargas se encuentran expuestas a una hendidura conectada a la solución interna en la posición cerrada, mientras que en la abierta estas se mueven a otra hendidura que está expuesta a la solución externa. A diferencia del modelo canónico, las cargas de *gating* se translocan a través de la rotación del S4 sin que este segmento sufra una traslación apreciable. Además

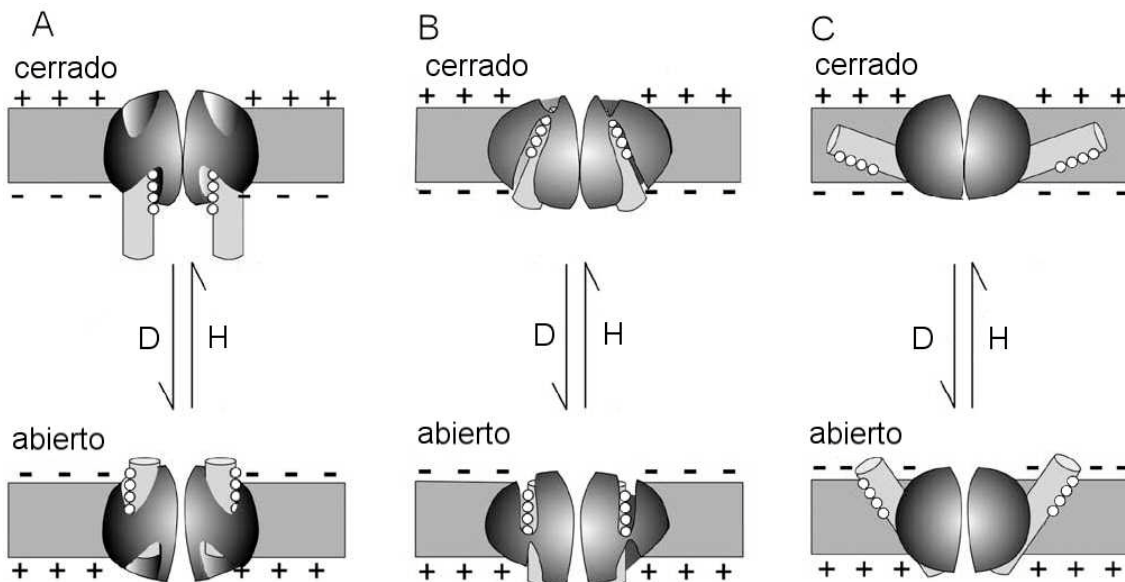


Figura 6. Modelos del sensor de voltaje [Bezanilla, 2005]. (A) Modelo canónico. (B) Modelo de transportador. (C) Modelo de remo. Las cargas de gating se muestran como círculos blancos. D y H simbolizan despolarización e hiperpolarización, respectivamente. Los detalles de cada mecanismo son expuestos en el texto.

propone que el campo eléctrico se concentra en una región muy pequeña del canal que solamente cubre a los residuos implicados en el proceso. En resumen, las cargas de *gating* se mueven a través de todo el campo eléctrico transmembranal a pesar de que el segmento S4 no experimente movimientos a gran escala.

C) Modelo de remo [Jiang *et al.*, 2003b]: En la Figura 6C se describe el modelo que introdujo el grupo de MacKinnon basado en las estructuras cristalográficas del KvAP. El modelo propone que el S4 se localiza en la periferia del canal en una estructura que se asemeja a un remo (que incluye al S4 y la parte C terminal del S3, S3b), y que las cargas de *gating* se encuentran directamente expuestas a los lípidos de la membrana durante su movimiento. La estructura en forma de remo (Figura 3A) está anclada al resto del canal por medio del conector S5-S6 y por la porción N terminal del S3 (S3a). Durante la despolarización, el segmento S4 sufre una gran traslación de forma tal que las cargas pasan de estar en contacto con la membrana en el estado cerrado a exponerse a la solución extracelular en el estado abierto. En consecuencia el S4 sufre una traslación de varios Å a través de la membrana.

Otro aspecto mecánico que aun no queda claro es el acoplamiento entre el sensor de voltaje y la compuerta de activación. Recientemente surgieron evidencias que señalan dos regiones críticas en este proceso: el conector S4-S5 y la porción C terminal del S6, que se localizan en el dominio intracelular del canal. Los estudios hechos a través de construcción de quimeras [e.g., ver Lu *et al.*, 2001, 2002] y mutagénesis [e.g., Tristani-Firouzi *et al.*, 2002; Decher *et al.*, 2004] sugieren que estas regiones están en estrecho contacto, por lo que el movimiento del sensor de voltaje se transmite a la compuerta de activación gracias al conector S4-S5, que se mueve junto con el sensor. Sin embargo, aún se desconocen los detalles moleculares sobre este acoplamiento.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1. Interacción entre la permeación y el *gating*: efecto del K⁺ en la función de los canales de K⁺ activados por voltaje

Como se presentó en el capítulo anterior, la biofísica clásica consideraba que las propiedades de permeación y *gating* eran independientes. Sin embargo, las evidencias experimentales demuestran que los iones K⁺ no solamente permean a través de los canales. En muchos casos los iones permeables también modulan el *gating* con lo que alteran las propiedades funcionales y posiblemente la estructura del canal. Por ejemplo, el cierre del rectificador tardío del axón de calamar se torna más lento al aumentar la concentración de K⁺ externo (K₀⁺). Se piensa que este efecto inhibitorio es causado por la unión de K⁺ en un sitio localizado en el poro de los canales, lo que se conoce como la hipótesis de la ocupación [Swenson y Armstrong, 1981; Armstrong y Matteson, 1986; Matteson y Swenson, 1986]. Como se mencionó en la introducción, el K₀⁺ también reduce la velocidad de inactivación tipo C de los canales Shaker, Kv1.3 y Kv1.4 [Lopez-Barneo *et al.*, 1993; Panyi *et al.*, 1995; Rasmusson *et al.*, 1995].

En algunos casos la concentración de K₀⁺ puede modular la magnitud de la corriente al modificar el número de canales conductores. Por ejemplo, la remoción de sólo el K⁺ externo suprime la corriente de los canales Kv1.4 [Pardo *et al.* 1992; Jäger *et al.*, 1998] y de ciertas mutantes del Shaker [Lopez-Barneo *et al.*, 1993; Ortega-Saenz *et al.*, 2000]. Este efecto se relaciona con la inactivación lenta y se revierte por readición de K⁺. De hecho la magnitud de la corriente aumenta al elevar la concentración de K₀⁺, a pesar de que ello disminuye el gradiente electroquímico del K⁺. Por el contrario, la concentración del K⁺ externo no afecta la magnitud de G_K del Shaker B silvestre [Gomez-Lagunas, 1997].

Por otro lado, los iones K⁺ son un factor indispensable para mantener el estado funcional normal de los canales. La completa remoción del potasio de ambos lados de la membrana (cero potasio, 0K⁺) ejerce efectos muy variados y en muchos casos drásticos sobre las propiedades de estas proteínas. Tras ser expuestos a esta condición algunos canales dejan de ser selectivos a K⁺ y se vuelven inusualmente permeables a Na⁺ (mientras estén en 0K⁺); en otros casos pierden completamente su capacidad para conducir iones, aun cuando sean reintegrados a un medio rico en K⁺. Cada canal de K⁺ activado por voltaje responde de modo diferente a estas condiciones. En las próximas secciones se realiza una revisión de los efectos del 0K⁺ reportados en la literatura.

2.2. Sobrevivencia de la actividad del rectificador tardío de calamar en soluciones de $0K^+$

La primera observación sobre el efecto del $0K^+$ en la actividad de los canales de K^+ dependientes de voltaje se hizo en el rectificador tardío (RT) del axón gigante de calamar¹ [Chandler y Meves, 1970; Almers y Armstrong, 1980]. Los registros de I_K en el axón se mantienen estables en soluciones de composición fisiológica. En cambio tras exponer al axón a $0K^+$ (con los canales cerrados a $-70mV$) se observa un lento decaimiento en la magnitud de la corriente, una vez que se ha regresado al medio con K^+ para tomar los registros. No se observan cambios en la cinética de los canales tras la exposición a $0K^+$.

El trabajo realizado por Almers y Armstrong [1980] muestra que la caída de la conductancia ocurre independientemente de la composición iónica de la solución de $0K^+$; se tiene el mismo efecto con Na^+ , Li^+ y tetrametilamonio (TMA^+), que es un catión orgánico impermeable de gran tamaño. El decaimiento de I_K sigue un transcurso exponencial, con una constante de tiempo de aproximadamente 11 minutos a $8^\circ C$ y es irreversible. Al agregar K^+ solamente desde el lado externo se previene la caída de la corriente. En estos estudios descubrieron que otros cationes son capaces de proteger la corriente, como Rb^+ , NH_4^+ y Cs^+ . La capacidad de protección de estos cationes monovalentes al parecer se debe a que estos se unen con afinidad al poro: son iones permeables (Rb^+ , NH_4^+) o bloqueadores (Cs^+).

Con estos resultados Almers y Armstrong propusieron que los canales de K^+ normalmente están ocupados por uno o más iones K^+ en el poro y que su remoción provoca que los dipolos negativos² de éste sufran repulsiones electrostáticas capaces de distorsionar la estructura de los canales, dejándolos disfuncionales.

2.3. El $Kv2.1$ y otros RTs son estables en $0K^+$ y conducen Na^+

Tiempo después se descubrió que, a diferencia del canal del axon de calamar, varios rectificadores tardíos de neuronas de vertebrados permanecen estables pero conducen Na^+ en ausencia de K^+ [Zhu e Ikeda, 1993; Callahan y Korn, 1994; Block y Jones, 1997].

¹ De hecho la corriente de rectificación tardía del axón gigante de calamar está formada por las contribuciones iónicas de varios canales [Rosenthal *et al.*, 1996, 1997; Jerng y Gilly, 2002].

² Actualmente se sabe que los dipolos negativos provienen del filtro de selectividad [Doyle *et al.*, 1998].

Los estudios citados con anterioridad se llevaron a cabo con canales de K⁺ nativos, por lo que no se estableció su identidad molecular (gene o clona). Posteriormente, Korn e Ikeda [1995] demostraron que el canal Kv2.1 es responsable de producir estas corrientes en las neuronas de mamíferos y posteriormente han estudiado con detalle las propiedades de permeación y selectividad del canal clonado. Con base en sus observaciones propusieron que en el Kv2.1 los iones K⁺ y Na⁺ compiten por sitios de unión dentro del poro que determinan cual ion ocupa al canal y permea.

Otro aspecto interesante de este canal es la pérdida de la sensibilidad al bloqueo por TEA⁺ externo en 0K⁺ [Ikeda y Korn, 1995]. Las corrientes de Na⁺ (en 0K⁺) de los canales Kv2.1 no se alteran al aplicar TEA⁺, mientras que al añadir K⁺ externo se observa que las corrientes son bloqueadas. Con base en estas observaciones se sugirió que los canales Kv2.1 sufren un cambio conformacional en 0K⁺ que altera la afinidad del vestíbulo por TEA⁺ externo y que estos cambios son regulados por un sitio de unión a K⁺ en el vestíbulo externo [Ikeda y Korn, 1995].

2.4. Comportamiento de los canales Kv1.5 y Kv1.3

De modo similar al Kv2.1, el canal Kv1.5 permanece activo durante las exposiciones a 0K⁺ [Wang *et al.*, 2000]. Sin embargo su conductancia a Na⁺ (G_{Na}) es pequeña, más de diez veces menor a la del Kv2.1 [Korn e Ikeda, 1995; Wang *et al.*, 2000]. La corriente de Na⁺ de este canal tiene la peculiaridad de inactivarse con mayor rapidez que la corriente “normal” de K⁺ [Wang *et al.*, 2000]. En contraste, al parecer los canales Kv1.3 son completamente insensibles a la falta de K⁺. Carecen de una corriente medible a Na⁺ y permanecen activos tras ser expuestos a 0K⁺ [Immke *et al.*, 1998].

2.5. Propiedades del canal Shaker en 0K⁺

2.5.1. Colapso de la conductancia en ausencia de K⁺

A la fecha, el Shaker B es el canal mejor caracterizado bajo estas condiciones particulares. Los estudios previos realizados por nuestro equipo de investigación muestran que la conductancia a K⁺ (G_K) de este canal se mantiene estable en soluciones de 0K⁺ mientras los canales se encuentren cerrados. Sin embargo, cuando se mandan pulsos activadores en 0K⁺ se aprecia un notable decremento (colapso) de G_K [Gomez-Lagunas, 1997, 2001]. La caída de la corriente depende del número de pulsos y no de la frecuencia con la que se los aplica. Se ha propuesto que el colapso

ocurre cuando los canales se cierran sin K⁺, durante la fase de repolarización de los pulsos activadores.

Un factor decisivo en la estabilidad del canal es la composición de las soluciones de 0K⁺. La caída es significativamente mayor en presencia de iones Na⁺: tras aplicar 20 pulsos despolarizantes se observa que I_K cae 99% en soluciones de Na⁺ contra 20% en soluciones de N-metil-D-glucamina (NMG⁺, un catión orgánico impermeable) [Gomez-Lagunas, 2001]. Estos resultados muestran que los iones Na⁺ catalizan el colapso de la conductancia pero no son indispensables para que este ocurra.

Aparte del K⁺ los cationes monovalentes Rb⁺, NH₄⁺ y Cs⁺ (desde el lado externo) previenen el colapso de G_K [Gomez-Lagunas, 1997]. Ciertos bloqueadores también son efectivos para proteger a los canales en 0K⁺: el TEA⁺ (externo), Ba²⁺ y algunas toxinas de escorpión tienen este efecto [Gomez-Lagunas, 1997, 1999, 2001, 2004].

Otro parámetro importante en la caída de la conductancia es el potencial de reposo membranal (HP) aplicado. Los potenciales de reposo despolarizados (HP por encima de -50 mV) impiden la caída de G_K [Gomez-Lagunas, 1997]. Esto sugiere que los canales no se pueden colapsar desde la inactivación tipo C. Por otro lado, el proceso de colapso puede revertirse completamente tras ejercer despolarizaciones prolongadas (3 minutos en HP = 0 mV) [Gomez-Lagunas, 1997].

Todas estas observaciones condujeron a Gómez Lagunas a proponer que: a) Los canales Shaker caen en un estado cerrado (no inactivado) extraordinariamente estable en 0K⁺. b) Al parecer estos canales sufren algún cambio conformacional en 0K⁺ que les impide conducir. c) Los iones K⁺ y Na⁺ compiten de modo excluyente por un sitio de unión que modula la estabilidad de G_K.

Trabajos posteriores mostraron que el sensor de voltaje también sufre cambios importantes en 0K⁺ [Melishchuk *et al.*, 1998; Loboda *et al.*, 2001]. La cantidad total de carga de *gating* disminuye a poco más de dos tercios de su valor original en K⁺ y la cinética de la I_g OFF (que se asocia con la velocidad de cierre de los canales) es más rápida. Al parecer los sensores de voltaje también cambian de conformación en 0K⁺. A partir de estos resultados los autores confirmaron la hipótesis de Gómez Lagunas de que los canales Shaker colapsados se mueven a través de estados no-conductores cerrados sin ser capaces de alcanzar el estado conductor (abierto) [Gomez-Lagunas, 1997].

Finalmente, se sabe que las mutaciones sobre la posición 449 (que es crítica en la inactivación tipo C) alteran la susceptibilidad de los canales en 0K⁺. Las mutantes T449Y y T449V son inmunes a la falta de K⁺ [Melishchuk *et al.*, 1998] y además exhiben una velocidad de inactivación C mucho menor [Lopez-Barneo *et al.*, 1993]. Estos resultados, aunados al hecho que este tipo de inactivación protege del colapso de G_K, sugieren que existe una relación entre estos dos procesos. Aun se desconoce el mecanismo molecular que provoca la caída de G_K y su relación con la inactivación C.

2.5.2. Permeación de Na⁺ a través del canal Shaker

Respecto a la permeación en 0K⁺, se sabe que antes de que su conductancia se colapse, el canal Shaker presenta una pequeña pero cuantificable G_{Na} que se observa tanto en el estado abierto como en el estado inactivado tipo C del canal [Starkus *et al.*, 1997, 2000; Ogielska y Aldrich 1998; Loboda *et al.*, 2001]. Un aspecto importante de la inactivación C del Shaker es que durante ella la relación de permeabilidades P_{Na}/P_K aumenta [Starkus *et al.*, 1997, 2000].

La G_{Na} del canal Shaker silvestre es diminuta cuando se la compara con la G_{Na} del Kv2.1. En contraste, la mutante A463C del Shaker presenta una permeación substancial a Na⁺, similar a la del Kv2.1 [Ogielska y Aldrich 1998]. La mutación introduce una cisteína en el S6 que equivale a la cisteína 394 del Kv2.1 silvestre (ver Figura 7) y se piensa que el aumento de la G_{Na} se debe a que esta mutación disminuye la afinidad del poro por K⁺. A partir de estas observaciones Ogielska y Aldrich [1998] concluyen que los iones Na⁺ y K⁺ pueden ocupar simultáneamente a los canales y que

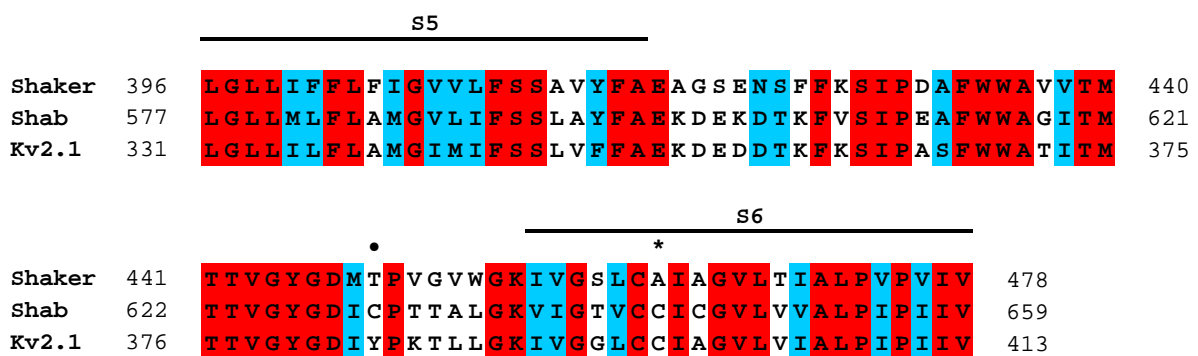


Figura 7. Alineamiento entre los canales Shaker, Shab y Kv2.1 en la región del poro (S5-S6). Los residuos idénticos están resaltados en rojo, mientras que los residuos similares están en azul. Además se indican dos posiciones importantes: (•) 449 del Shaker o equivalente, (*) 463 del Shaker o equivalente. El alineamiento se realizó con el algoritmo CLUSTAL W [Thompson *et al.*, 1994; Combet *et al.*, 2000].

esta ocupación múltiple produce interacciones entre los iones dentro del poro.

2.6. Planteamiento del problema

Además de fluir a través de los canales, los iones K⁺ ejercen efectos significativos en la estabilidad, la selectividad y el *gating* (i.e., en todos los elementos que conforman la función de los mismos). Sin embargo, los iones K⁺ modulan todos estos factores funcionales de manera muy variable en los distintos tipos de canales de K⁺. Esta variabilidad de efectos es sorprendente en vista de la conservación del filtro de selectividad del poro, y sus bases mecánicas y estructurales no se conocen bien. Por lo anterior, resulta obvio que los estudios del papel del K⁺ en la función de los canales arrojará información importante sobre los determinantes de la estabilidad y selectividad del poro así como de la interacción entre permeación y *gating*.

Para tener un mejor conocimiento sobre este fenómeno se decidió extender los estudios de estabilidad y selectividad dependiente de K⁺ a los canales Shab. El Shab es un canal rectificador tardío de *D. melanogaster* que forma parte de la familia Kv2 y es homólogo del Kv2.1 (comparten 76% de identidad en su secuencia de aminoácidos) [Frech *et al.*, 1989]. Estudios anteriores sobre este canal se centraron en su caracterización genética [Butler *et al.*, 1989, 1990; Tsunoda y Salkoff, 1995] así como en el movimiento de su sensor de voltaje [Islas y Sigworth, 1999]. A pesar de las investigaciones citadas con anterioridad, el Shab sigue siendo un canal pobremente caracterizado (a diferencia del Shaker), hecho que brindó la oportunidad de que con esta investigación se genere valiosa información para esclarecer el fenómeno.

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar el papel del K^+ en la estabilidad y la selectividad del poro de los canales Shab.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto que ejercen soluciones de $0K^+$ de diferente composición iónica sobre la estabilidad de G_K del canal Shab.
- Estudiar la estabilidad de los canales con K^+ presente en un solo lado de la membrana.
- Establecer condiciones que puedan revertir la caída de la corriente en caso de la conductancia del canal sufra de un proceso de decaimiento.
- Formular una hipótesis sobre la localización del (o de los) sitio(s) de unión a K^+ que determinan la estabilidad de G_K .
- Determinar si los canales pierden su selectividad en $0K^+$.
- Comparar la estabilidad dependiente de K^+ y la selectividad del canal Shab con la reportada en el canal Shaker.

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivo celular y expresión de canales iónicos

Se utilizó la línea celular de insecto Sf9, derivada del endotelio ovárico de la oruga *Spodoptera frugiperda*. Esta se mantuvo en cultivo a 27°C con medio de cultivo Sf-900 II (Gibco). Para expresar los canales las células fueron infectadas, usando una multiplicidad de infección de 10, con baculovirus recombinantes¹ (AcMNPV) que contienen el cDNA del canal Shab (clona Shab11, con número de acceso en el Gene Bank M32659) o del canal Shaker (Shaker B, X07132) como fue previamente reportado [Klaiber *et al.*, 1990; Gomez-Lagunas y Armstrong, 1994; Islas y Sigworth, 1999]. Las células infectadas se sembraron en cubreobjetos cortados a 3x3mm para su manipulación. Después de la infección, las células fueron incubadas a 27°C por 48 horas, tras las cuales se hicieron los experimentos.

4.2. Registros electrofisiológicos

Se registraron corrientes macroscópicas usando la técnica de Patch-Clamp bajo la configuración de célula completa [Hamill *et al.*, 1981] con un amplificador para fijación de voltaje Multiclamp 700 (Axon Instruments). La señal fue filtrada a 5kHz y se digitalizó a 100 μ s/punto con una interfase Digidata 1322A (Axon Instruments) para su almacenamiento en una computadora de escritorio.

Entre el 70 y el 80% de la resistencia en serie fue compensada electrónicamente. Los componentes pasivos de la membrana (transiente capacitivo y corriente de fuga) fueron sustraídos mediante un protocolo de pulsos P/4. El potencial de reposo (HP) fue de –80 mV, a menos que se indique lo contrario. Todos registros electrofisiológicos fueron realizados a temperatura ambiente (20-25°C).

4.2.1. Electroodos

Para su fabricación se utilizaron tubos capilares de borosilicato (KIMAX 51), y se los pulió a 0.8-2M Ω de resistencia. No se realizó ningún otro tratamiento para su uso.

4.3. Soluciones

Las soluciones se nombraron con base al cation principal (por ejemplo K_i), según se indica a continuación.

Soluciones internas (en mM)

K_i: 90 KF, 30 KCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES-KOH.

Na_i: 90 NaF, 30 NaCl, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES-NaOH.

NMG_i: 90 HF, 120 NMG, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES-HCl.

Soluciones externas (en mM)

Na_o: 145 NaCl, 10 CaCl₂, 10 HEPES-NaOH.

K_o: 100 KCl, 45 NaCl, 10 CaCl₂, 10 HEPES-KOH.

2K_o: 2 KCl, 145 NaCl, 10 CaCl₂, 10 HEPES-NaOH.

Cs_o: 145 CsCl, 10 CaCl₂, 10 HEPES-NaOH,

NMG_o: 145 NMG-HCl, 10 CaCl₂, 10 HEPES-HCl.

Colina_o: 145 Colina Cl, 10 CaCl₂, 10 HEPES-TMA OH.

El pH de las soluciones internas y externas fue de 7.2.

4.4. Análisis

Los resultados fueron expresados como la media \pm S.E.M, indicando el número experimentos realizados. La significancia estadística fue evaluada con la prueba t. El análisis de datos fue realizado empleando los programas pClamp 9.0 (Axon Instruments) y SigmaPlot 7.0 (SPSS Inc.).

¹ Para mayor información sobre el sistema de expresión, consulte el Apéndice A.

CAPÍTULO V. RESULTADOS

5.1. Caída de la conductancia del canal Shab en $0K^+$

5.1.1. Caída de G_K en soluciones con diferentes composiciones iónicas

Para conocer el papel que desempeñan los iones K^+ en la estabilidad de los canales Shab, primero fueron registradas las corrientes control de K^+ en las soluciones K_0/Na_i (ver Materiales y Métodos). Las corrientes fueron evocadas dando pulsos a 0 mV por 30 ms y fueron aplicados cada 12 segundos, durante un periodo de 5 minutos para monitorear la estabilidad en condiciones control.

El panel izquierdo de la Figura 8A muestra una corriente de K^+ (I_K) en una célula representativa bajo esta condición. La corriente en esas condiciones de registro es muy estable durante al menos 25 minutos (ver abajo). Inmediatamente después, para probar la estabilidad del Shab en $0K^+$ (no añadido), se perfundió la solución de prueba Na_0 (Na_0/Na_i) durante 1.5 minutos, con los canales sin perturbar (cerrados) con el potencial de reposo membranal (HP) de -80mV (indicado por la flecha en la Figura 8A). Posteriormente, se regresó a la solución control K_0 para probar el estado de I_K . El trazo en el panel derecho muestra que tras la breve exposición a $0K^+$ hubo una drástica caída de I_K . La caída en la corriente se observa en todos los voltajes, por lo que no se debe a un corrimiento en la probabilidad de apertura de los canales (ver sección de conducción iónica).

Tras la exposición de la membrana a soluciones de $0K^+$, la conductancia al potasio (G_K) se pierde; probablemente porque los iones K^+ que confieren estabilidad a G_K se disocian de los canales. Esto conduce a la siguiente pregunta: ¿El (o los) ion(es) K^+ que dan estabilidad se encuentran unidos al filtro de selectividad? Para arrojar luz sobre esta importante cuestión se repitió el experimento de la Figura 8A pero en esta ocasión fueron empleadas soluciones de $0K^+$ y $0Na^+$, reemplazando al Na^+ por cationes grandes e impermeantes. En las Figuras 8B y C se presenta un experimento representativo que muestra que tanto en NMG_0/NMG_i como en $Colina_0/NMG_i$ (ver Materiales y Métodos), se produce una caída de G_K similar a la que ocurre en Na_0/Na_i . Lo anterior se aprecia mejor en la Figura 8D.

La caída de la corriente fue estadísticamente mayor ($p < 0.05$) en soluciones de Na_0 ($81 \pm 5\%$, $n = 9$) que en NMG_0 ($70 \pm 4\%$, $n = 10$) o en $Colina_0$ ($63 \pm 9\%$, $n = 3$), mientras que

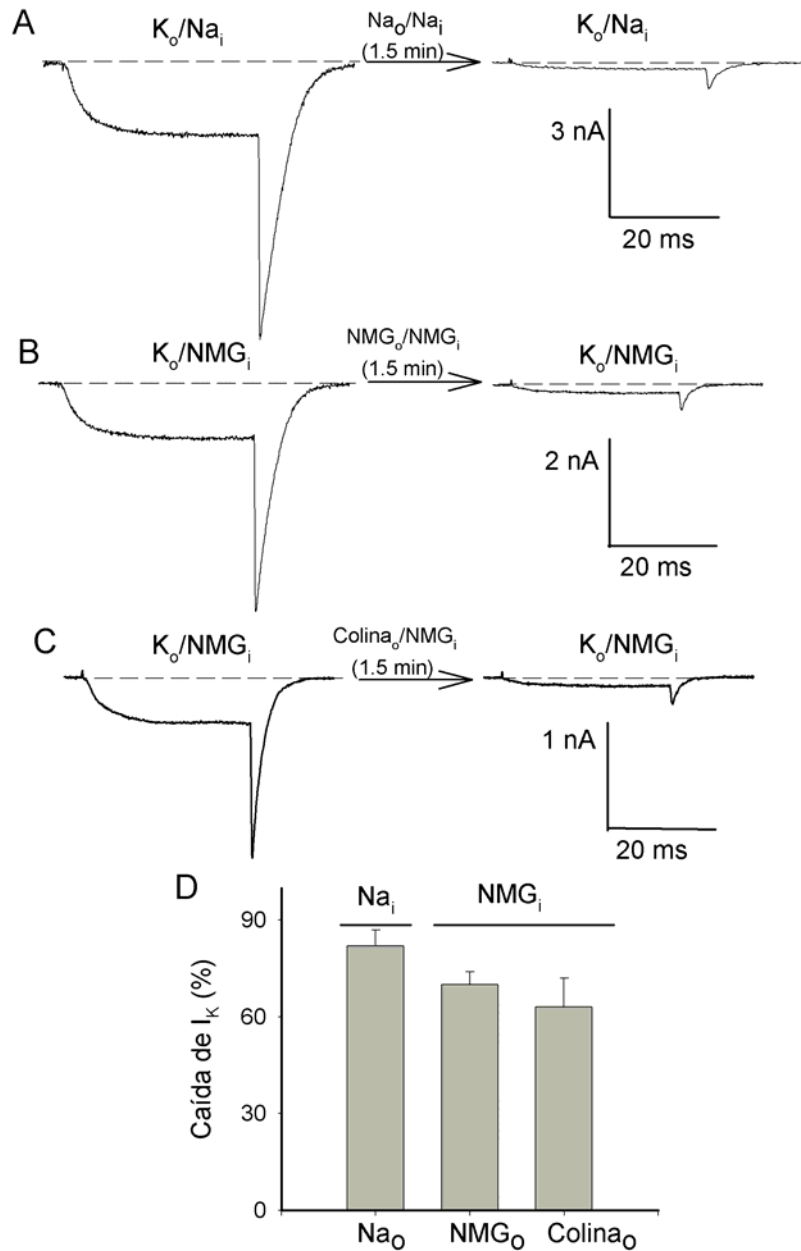


Figura 8. Caída de la G_K del canal Shab en soluciones de $0K^+$ con diferentes composiciones iónicas. Durante la exposición a las soluciones de $0K^+$ los canales se mantuvieron cerrados a -80 mV. (A) I_K evocada por pulsos de prueba en K_o/Na_i antes (Control, panel izquierdo) y después (panel derecho) de que la célula fuera expuesta a Na_o/Na_i durante 1.5 min, como indica la flecha. (B) Como en A, pero la corriente fue tomada en K_o/NMG_i antes (izquierda) y después (derecha) de perfundir NMG_o (NMG_o/NMG_i). (C) Como en A, pero el registro fue tomado en K_o/NMG_i antes (izquierda) y después (derecha) de bañar a la célula en soluciones $Colina_o/NMG_i$. (D) Disminución de I_K tras exponer las células a Na_o/Na_i , NMG_o/NMG_i y $Colina_o/NMG_i$, como se indica. Aunque el decremento de G_K en Na^+ es mayor, las tres soluciones tuvieron un efecto comparable en la estabilidad de los canales.

las dos últimas soluciones no difieren significativamente entre sí ($p < 0.05$). A pesar de estas diferencias, es claro que las tres soluciones tienen un efecto comparable sobre la caída de G_K en el canal Shab. Por lo tanto: a) estos datos sugieren que el K^+ que estabiliza G_K no se encuentra en el filtro de selectividad (de lo contrario hubiéramos esperado que G_K no cayera en NMG o Colina) y b) el comportamiento de Shab difiere significativamente del exhibido por el Shaker, el cual es muy estable en NMG^+ (ver Figura 12).

Los resultados anteriores junto con los reportados por Islas y Sigworth [1999], quienes registraron corrientes de *gating* bajo condiciones similares a las presentes en la Figura 8B indican que, tras la exposición a $0K^+$, el canal Shab continúa presentando corrientes de *gating*, pero carece de capacidad de conducción. Este mismo fenómeno se observa en el canal Shaker [Gomez-Lagunas, 1997; Melishchuk *et al.* 1998; Loboda *et al.* 2001] aunque este canal recupera su G_K tras despolarizaciones prolongadas, como fue mencionado con anterioridad.

5.1.2. Irreversibilidad del colapso de G_K

El comportamiento del canal Shab difiere sustancialmente del reportado para el Shaker, porque su conductancia no puede recuperarse por cambios en el potencial de membrana. Esto se demuestra en la Figura 9A, que presenta el curso temporal de la corriente de K^+ en una célula representativa.

Inicialmente I_K tenía un valor de -2.4 nA ($t=0$), y se mantuvo constante durante los siguientes 5 minutos. Cuando la célula se expuso a la solución de $0K^+$ (Na_o/Na_i) por 1.5 minutos, como en la Figura 8A, I_K cayó aproximadamente a -0.24 nA (indicado por la primera flecha), y se mantuvo en este nivel durante los siguientes 10 min. Después se cambió HP a un potencial despolarizado, 0 mV, durante 3 min (ya que este procedimiento permite recuperar completamente la conductancia de Shaker). Inmediatamente después el HP se regresó a -80 mV y aproximadamente 1 min después se probó el estado de los canales, aplicando los pulsos de prueba. No se produjo ningún cambio en la amplitud de I_K (señalado por la segunda flecha). Finalmente, en el tiempo marcado por la tercera flecha (aproximadamente a los 17 minutos) el HP se hiperpolarizó a -100 mV y todos los pulsos siguientes fueron aplicados a partir de este HP. Nuevamente, no se observa ningún cambio en I_K . Esto último también demuestra que la caída de G_K no se debió a inactivación de los canales.

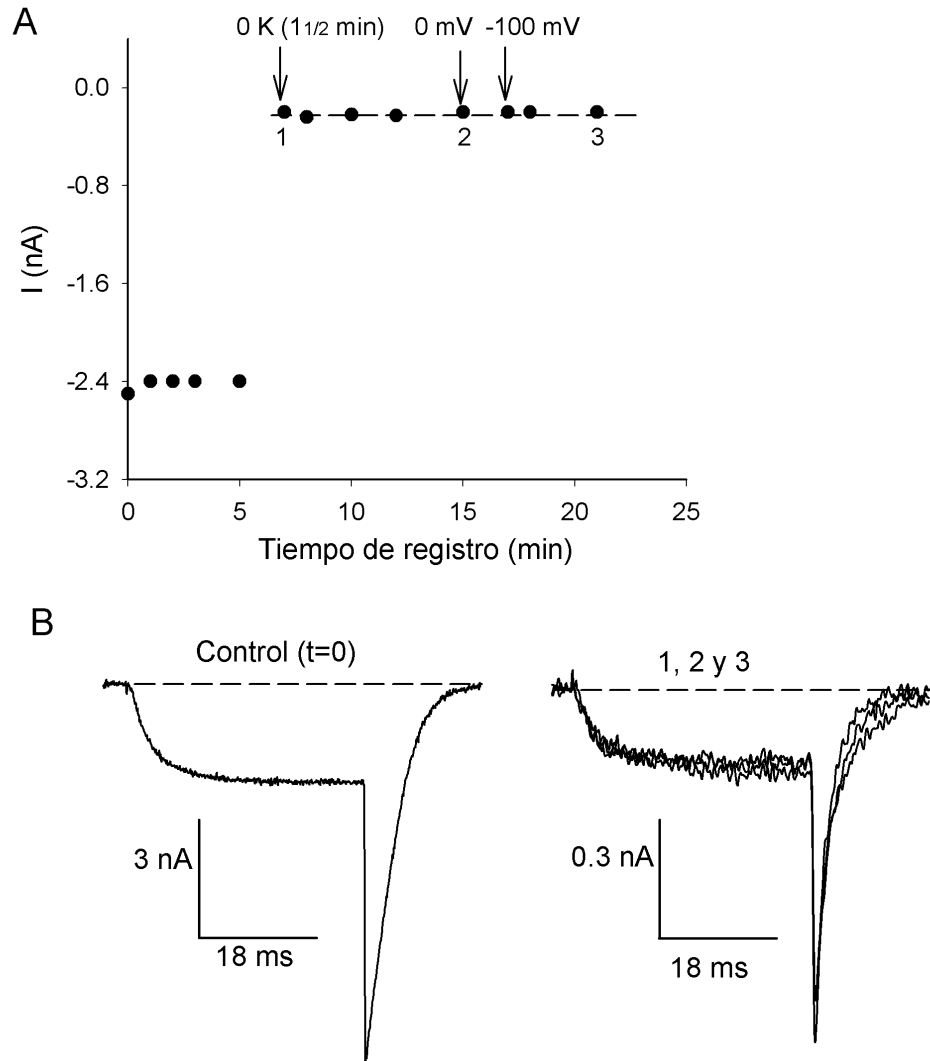


Figura 9. Curso temporal de I_K del Shab antes y después de ir a $0K^+$. (A) Magnitud de I_K evocada por pulsos de prueba en función del tiempo de registro (K_o/Na_i) en una célula representativa. La corriente inicial fue de aproximadamente $-2.4nA$, y se mantuvo estable durante los 5 min que estubo en K_o/Na_i . Después se perfundió Na_o durante 1.5 min e inmediatamente se volvió a K_o para aplicar los pulsos de prueba; la I_K cayó aproximadamente a $-0.25 nA$ (flecha marcada con **0K** o **1**). Posteriormente el HP fue cambiado a $0 mV$ durante 3 min tras lo cual se volvió a $-80 mV$ antes de registrar el punto señalado por la flecha **0 mV**, **2**. Finalmente HP fue cambiado a $-100 mV$ (flecha **-100 mV**) y los pulsos subsecuentes fueron aplicados a partir de este potencial de membrana. I_K no cambió en absoluto durante el resto del experimento. (B) Panel izquierdo: I_K control al inicio del registro. Panel derecho: I_K superpuestas registradas a los tiempos indicados por los números en A.

Este comportamiento se ilustra con los trazos en la Figura 9B. El panel izquierdo muestra la corriente control ($t=0$), mientras que en el panel derecho se superponen los registros tomados justo al regresar de la exposición a $0K^+$ (punto señalado con **1**), el que se tomó después de 3 min de despolarización a 0 mV y después de que se hiperpolarizó a -100 mV (marcados **2** y **3**, respectivamente). Estas pruebas sobre la estabilidad del canal Shab (Figuras 8 y 9) sugieren que el colapso de la G_K es irreversible. Todas las células estudiadas (alrededor de 30) exhibieron el mismo comportamiento.

5.2. Estabilidad de G_K en soluciones con K^+

Para caracterizar mejor el fenómeno se determinó la estabilidad de los canales en soluciones con K^+ . La Figura 10A compara el curso temporal de I_K durante 25 minutos en condiciones estandar de registro (Na_0/K_i) vs en K_0/Na_i . I_K es notablemente estable en presencia de K^+ de un solo lado de la membrana, sin embargo resulta muy interesante ver que I_K es más estable con K^+ extracelular (K_0/Na_i) que con K^+ intracelular (Na_0/K_i). El alto potasio externo mantiene I_K prácticamente en su valor inicial (casi 100%) durante al menos 25 minutos (en realidad en esa condición I_K es completamente estable por mas

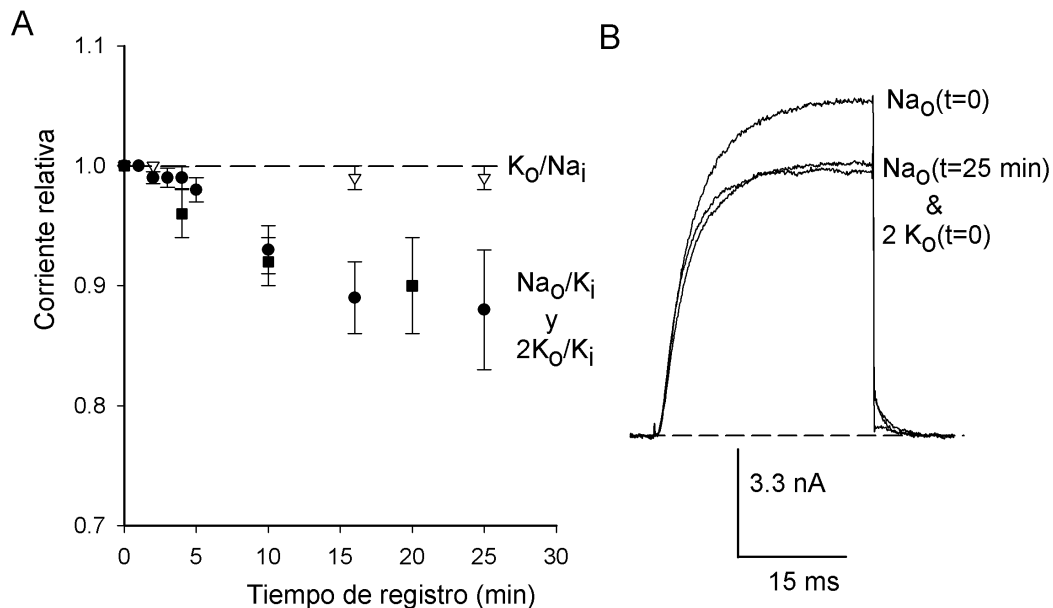


Figura 10. Estabilidad del canal Shab en soluciones con K^+ . (A) Curso temporal de la corriente relativa [$I_K(t)/I_K(t=0)$] en las soluciones que se indican. Los puntos son la media \pm S.E.M. de $n=4$, K_0/Na_i ; $n=5$, Na_0/K_i ; $n=4$ $2K_0/K_i$. (B) Superposición de las I_K evocadas por pulsos de 0 mV/30 ms, tanto al inicio del experimento en Na_0/K_i [$Na_0(t=0)$], después de 25 min en Na_0/K_i [$Na_0(t=25 \text{ min})$], y la corriente registrada inmediatamente después de añadir 2 mM K^+ a la solución externa [$2K_0(t=0)$].

de una hora, no mostrado). En cambio, con K^+ solo del lado interno se aprecia una caída muy lenta, pero sostenida, de la conductancia del canal que fue observada en todas las células probadas ($n=5$).

La lenta caída de G_K en Na_0/K_i no se puede revertir añadiendo K^+ a la solución externa. Ello se muestra la Figura 10B, en la que se sobreponen tres trazos de I_K : a) al inicio el registro en Na_0 [**t=0**]; b) a los 25 minutos de haber expuesto la célula a Na_0/K_i , marcado como Na_0 [**t= 25 min**], en la que I_K había caído 80% de su valor inicial; y c) inmediatamente después de la adición de 2 mM de K^+ al medio externo (**2K₀ [t=0]**, i.e., $Na_0 + 2mM K_0^+/K_i$). La amplitud de I_K es la misma antes y después de añadir 2mM de K_0 . Más aún, e importante para la discusión: la amplitud de I_K en **2K₀/K_i** sigue cayendo con un curso temporal (tomando como tiempo inicial el momento de la adición de **2K₀ [t=0]**) indistinguible al observado durante los 25 minutos previos, con la célula en solo Na_0/K_i (cuadrados sólidos).

5.3. Conducción iónica del Shab en $0K^+$

Como se mencionó anteriormente, el canal Kv2.1 conduce Na^+ de forma significativa y estable en $0K^+$ [Korn e Ikeda, 1995]. Por otro lado, la introducción en el Shaker de cisteína en la posición 463 hace que el canal mutante (Shaker A463C) aumente su conductancia a Na^+ en $0K^+$, en relación con el canal silvestre. Por lo tanto, ya que el Shab nativo también presenta una cisteína en la posición equivalente a 463 (ver Figura 7) decidimos estudiar la posible conducción de Na^+ en $0K^+$ en este canal.

Para ello se usaron células con una elevada expresión de canales para así facilitar la detección de la posible I_{Na} . La Figura 11A muestra los resultados de una célula representativa. En el panel izquierdo se presenta la I_K en K_0/Na_i evocada por pulsos que van desde -60 mV a +20 mV en incrementos de 20 mV desde HP de -80mV. Posteriormente, la célula se mantuvo en Na_0 por 45 segundos, y los canales se activaron (en Na_0/Na_i) como en el control. No se observó ninguna corriente dependiente de tiempo (panel medio). Finalmente la célula se regresó a K_0 , y se observó que la reducción de I_K (de aproximadamente 80%, ver panel derecho) fue similar la que ocurre cuando no se activa a los canales en $0K^+$ (ver Figura 8D).

Como se mencionó en el apartado 5.1.1, la caída de I_K es exactamente igual en todos los voltajes, como se ilustra en la Figura 11C en la que se presenta la relación I-V para los trazos de la Figura 11A. Se obtuvieron los mismos resultados en todas las células ($n=4$); en dos de ellas se dio un solo pulso a +60 mV por 30 ms en Na_0 , y no se observó

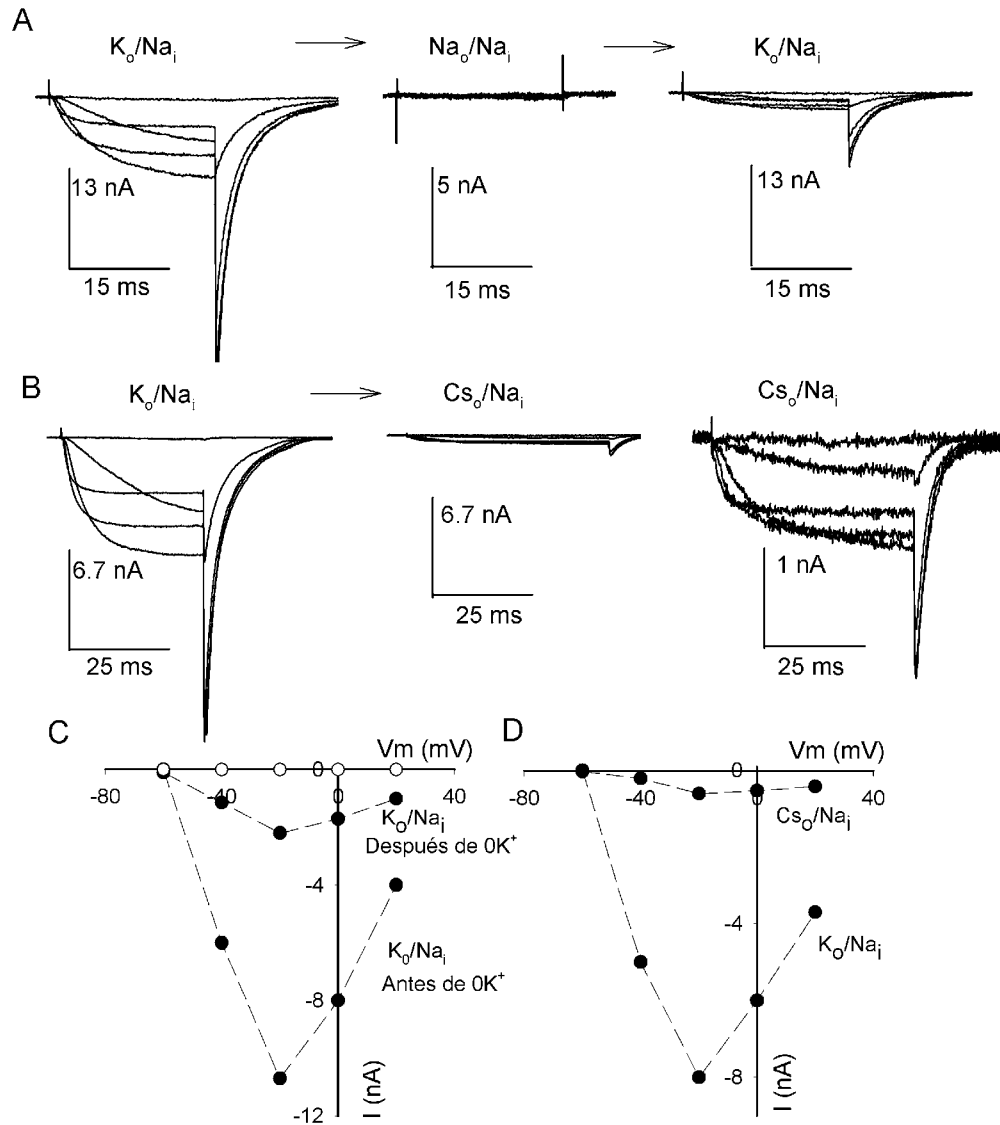


Figura 11. Conducción iónica en $0K^+$. (A) Panel izquierdo: I_K evocada por pulsos de 30 ms de -60 a $+20$ mV, aplicados cada 5 seg en incrementos de 20 mV en K_o/Na_i . Panel medio: corriente evocada como en el control pero con la célula en Na_o/Na_i (por 45 seg). Panel derecho: I_K registrada con la célula de vuelta a K_o/Na_i . (B) Panel izquierdo: I_K registrada como en A, pero en una célula diferente. Panel medio: Corriente entrante de I_{Cs} evocada como en A (en Cs_o/Na_i). Panel derecho: muestra I_{Cs} en una escala expandida. (C) Curva IV de los trazos en A. Símbolos blancos: Na_o/Na_i , Símbolos negros: I_K antes y después de la exposición en $0K^+$, como se indica. Las corrientes se midieron al final de los pulsos de activación. (D) Relación IV comparando I_K contra I_{Cs} de los trazos en B, como se indica en la figura.

corriente dependiente de tiempo. Esto demuestra que la disminución en la corriente, después de exponer los canales a $0K^+$ (Figura 8), no se debe a un corrimiento en la dependencia de voltaje de la activación de mismos.

La imposibilidad de detectar I_{Na} en $0K^+$ tiene dos explicaciones posibles: 1) I_{Na} existe, pero es muy pequeña y su detección se dificulta por la caída de la conductancia. 2) Alternativamente, de acuerdo a lo propuesto por el grupo de Aldrich [Ogielska y Aldrich, 1999], la falta de corriente de Na^+ podría deberse a iones K^+ remanentes en el poro que bloqueen el flujo de Na^+ (aunque estos iones K^+ son incapaces de mantener la estabilidad del canal).

Para discernir entre estas dos posibilidades se probó si los iones Cs^+ son capaces de acarrear corriente a través del canal Shab en $0K^+$. El panel izquierdo de la Figura 11B muestra I_K en una célula representativa bajo condiciones control K_0/Na_i . Después de perfundir Cs_0 , se observó claramente una I_{Cs} entrante con una G_{Cs}/G_K igual a 0.07. El panel derecho muestra la corriente de Cs^+ a mayor escala, para mayor claridad. La Figura 11D compara las curvas I-V de los trazos en K_0 y Cs_0 , como se indica. Mediciones realizadas en otras tres células dieron en promedio $G_{Cs}/G_K = 0.12 \pm 0.04$, $n=4$. Estas observaciones sugieren que, en contra de lo propuesto por Aldrich, la falta de I_{Na} en $0K^+$ no se debe a que iones K^+ permanezcan fuertemente unidos al poro del Shab, porque si ese fuera el caso entonces debería de esperarse que también bloquearan el flujo de Cs^+ .

5.4. Estabilidad del canal Shaker en $0K^+$

Las condiciones que provocan la caída de G_K en el canal Shab son muy diferentes a las que producen el colapso de G_K del Shaker. La Figura 12A (panel superior izquierdo) presenta una I_K control del Shaker evocada por un pulso activante de +20mV/30ms en las soluciones K_0/NMG_i . Después la célula se mantuvo con NMG_0 y se le aplicaron 40 pulsos activantes (en NMG_0/NMG_i) para activar extensivamente a los canales. Finalmente, para probar el estado de los canales se regreso a K_0 , y se aprecia que la I_K del Shaker sólo tuvo una reducción muy pequeña tras los pulsos con NMG^+ ($0K^+$) a ambos lados de la membrana (Figura 12A, panel central). A diferencia del canal Shab, la G_K del Shaker es muy estable en soluciones de $0K^+$ y $0Na^+$.

La estabilidad de la G_K del canal Shaker en $0Na^+$ podría deberse a que los iones K^+ que confieren la estabilidad tienen que ser substituidos por Na^+ para dejar el canal [Gomez-Lagunas, 2001], o bien también sería factible que parte de la estabilidad del canal se

debiera a un cambio conformacional (inactivación C, la cual es favorecida por la presencia de NMG^+) que impida o dificulte el colapso del poro.

Para probar estas hipótesis, inmediatamente después de registrar la corriente mostrada en el panel central de la Figura 12A, la célula se perfundió nuevamente con NMG_0 , y se dieron sólo 20 pulsos en NMG_0/NMG_i , tras lo cual inmediatamente después (i.e., sin regresar antes a K^+) se dieron otros 20 pulsos pero esta vez en Na^+ externo (Na_0/NMG_i), dando un total de 40 pulsos como en el panel central. Finalmente, se regresó a K_0 para determinar el estado de G_K . Si la segunda hipótesis fuera cierta, I_K no debería de caer significativamente bajo estas condiciones experimentales. En cambio,

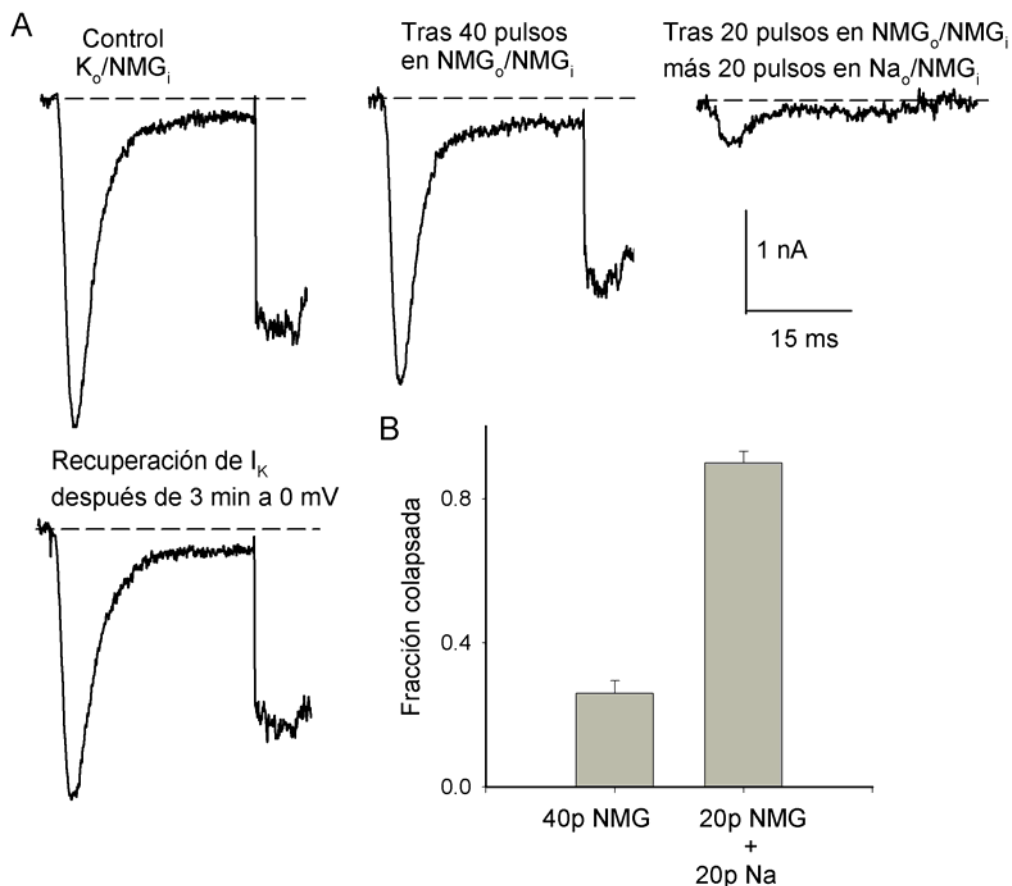


Figura 12. Estabilidad del canal Shaker en soluciones de $0K^+$ y $0Na^+$. (A) Panel superior izquierdo: I_K control, evocada por pulsos de $+20$ mV/30 ms en K_0/NMG_i . Panel central: I_K remanente en K_0/NMG_i después de dar 40 pulsos activadores (1 pulso por segundo, $+20$ mV/30 ms) en NMG_0/NMG_i . G_K casi no cayó, a diferencia del Shab. Panel derecho: I_K (en K_0/NMG_i) remanente después de dar primero 20 pulsos en NMG_0/NMG_i e inmediatamente después otra ronda de 20 pulsos pero en Na_0/NMG_i . I_K cayó $\sim 85\%$. Panel inferior izquierdo: Recuperación de G_K después de depolarizar a la célula a 0 mV por 3 min, la corriente fue registrada un minuto después de volver a -80 mV. (B) Magnitud del colapso de G_K en varias células tratadas como en A ($n=4$).

el trazo en el panel derecho muestra que hubo una caída significativa de I_K . El panel inferior izquierdo ilustra la recuperación de I_K tras despolarizar a los canales a 0 mV durante 3 minutos.

A partir de estos experimentos se puede concluir que, tras activar extensivamente a los canales en soluciones de NMG^+ , estos están en una conformación en la que los iones K^+ estabilizantes se pierden tan pronto como existan iones Na^+ en la solución de $0K^+$ y los canales se activen repetidamente.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

6.1. Discusión

6.1.1. Sitios de unión a K^+ que confieren de estabilidad

La conductancia del canal Shab es considerablemente estable cuando la concentración de K^+ es alta de un solo lado de la membrana. Sin embargo los canales (G_K) son más estables cuando se exponen a K^+ externo (K_o/Na_i) que en K^+ interno (Na_o/K_i). Como contraste, G_K cae rápidamente con $0K^+$ a ambos lados de la membrana. Los experimentos de la Figura 10 sugieren que existen cuando menos dos sitios de unión a K^+ que son necesarios para mantener la estabilidad de la G_K del canal Shab, uno interno y otro (u otros) externos, probablemente localizado(s) por fuera del filtro de selectividad.

La existencia de uno (o varios) sitio(s) externo(s) explica por que G_K se pierde rápidamente en soluciones de $0K^+$ (y $0Na^+$), con los canales cerrados a $-80mV$. En un sitio externo al filtro de selectividad los iones K^+ estabilizadores no podrían mantenerse unidos al canal debido a que:

- a) No sienten la caída de potencial a través de la membrana, que bajo estas condiciones ($-80 mV$) tendería a llevarlos hacia el lado intracelular.
- b) En este(os) sitio(s) no existen barreras físicas impuestas por la conformación cerrada que impidan la pérdida de los iones K^+ (la compuerta de activación se encuentra localizada en el extremo carboxilo terminal del segmento S6, como se mencionó en la introducción).
- c) Los iones K^+ abandonan el sitio sin importar si están presentes los iones apropiados (suficientemente pequeños como el Na^+) que puedan sustituir al K^+ (Figura 8).

Si los iones K^+ que confieren la estabilidad estuvieran en el filtro de selectividad se esperaría que no abandonaran el canal mientras este se encuentre cerrado, sin importar la composición iónica de las soluciones (como en el caso del canal Shaker). Además G_K no caería (o lo haría muy lentamente) en presencia de los cationes grandes impermeables Colina⁺ y NMG⁺ [Gomez-Lagunas, 1997, 2001, 2004]. Esta hipótesis se respalda en la observación de que la magnitud de la caída de G_K en $0K^+$ es similar tanto

al dar pulsos despolarizantes desde -80 mV como al tener los canales cerrados en dicho potencial de reposo.

La hipótesis de sitios internos está fundamentada en las siguientes observaciones:

a) G_K es mucho más estable en Na_0/K_i que en Na_0/Na_i , por lo tanto el K⁺ interno confiere una estabilidad sustancial.

b) Tener 2 mM de K₀⁺ no cambia significativamente la velocidad de decaimiento de G_K que se observa con solamente Na⁺ externo (i.e., en Na_0/K_i). Lo anterior señala que la afinidad del sitio externo por K⁺ es baja (mayor a 2 mM). Por lo tanto, si la estabilidad observada en Na_0/K_i se debiera a la fuga de K⁺ interno hacia él o los sitios externos, esta debería de cambiar la concentración de K₀⁺ a valores superiores a 2 mM, lo cual parece improbable en ausencia de factores que restringen la difusión de iones en el vestíbulo externo del poro.

6.1.2. El canal Shab entra en estados no-conductores, no-inactivados, tras la caída de G_K

Al llevar a los canales Shab a 0K⁺ se observa que la conductancia al K⁺ cae irreversiblemente, a pesar de que después se añada K₀ o se cambie el potencial de membrana. Los resultados obtenidos en los experimentos descritos en este trabajo descartan que la caída de I_K se deba a que los canales se encuentren en un estado inactivado por que la corriente no se recupera paulatinamente tras la exposición a 0K⁺. Si el colapso de G_K en 0K⁺ se debiera a la inactivación lenta del canal, la corriente debería de recuperarse a potenciales hiperpolarizados, lo cual no fue observado (ver Figura 9). Por otro lado se sabe que la adición de K⁺ del lado extracelular acelera la recuperación de la inactivación lenta de algunos de canales de K⁺ [Rasmusson *et al.*, 1995; Levy y Deutsch, 1996; Klemic *et al.*, 2001]. Sin embargo, la adición de K⁺ externo (K₀⁺) tampoco recupera la G_K del canal Shab (Figura 9).

Los estudios de movimiento de carga hechos por Islas y Sigworth [1999] muestran que el Shab presenta corrientes de gating (I_g) bajo condiciones que provocan una rápida caída de G_K (NMG_0/NMG_i). Las condiciones que utilizaron estos autores son semejantes a las reportadas en la sección 5.1.1 de los resultados de este trabajo (Figura 8B). Es importante notar que estas corrientes de *gating* tienen una cinética anormal: la I_g OFF (de cierre) tiene un transcurso temporal mucho más rápido que el observado en canales Kv2.1 y Shaker W434F (mutación que suprime la conducción

iónica, pero deja intactas las corrientes de *gating* [Perozo *et al.*, 1993]); además la cantidad de carga movida por los sensores de voltaje del Shab es mucho menor a la presente los canales Shaker, Kv1.1 y Kv2.1 (~7.5 e₀ en el Shab contra ~13 e₀ en los otros canales). Islas y Sigworth tenían como objetivo comparar el movimiento de carga en canales funcionales. Sin embargo, las I_g del Shab son casi iguales a las I_g reportadas en el canal Shaker tras el colapso de su G_K en 0K⁺ (Figura 13) [Melishchuk *et al.* 1998; Loboda *et al.*, 2001], por lo que es muy probable que los autores antes mencionados hayan subestimado la I_g de Shab.

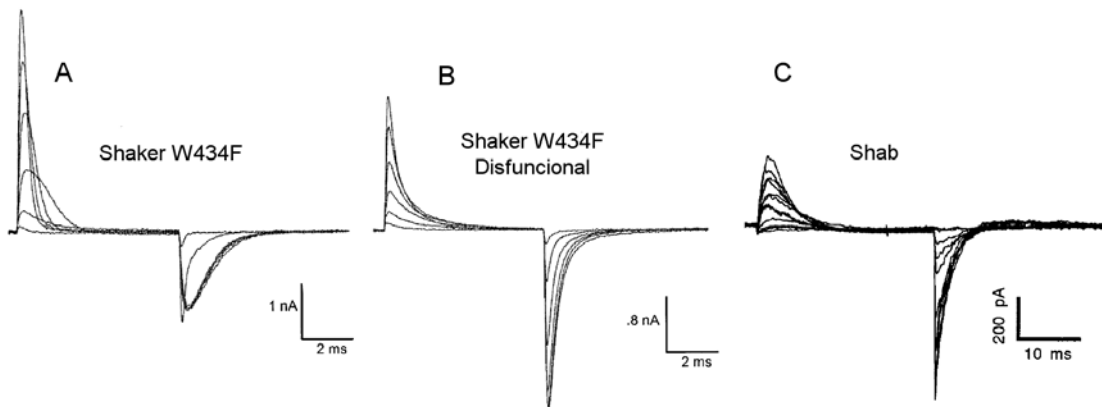


Figura 13. Comparación entre las I_g de los canales Shaker y Shab en 0K⁺. (A) I_g normal del Shaker W434. (B) I_g del canal Shaker W434 tras el colapso de su conductancia en 0K⁺ (canales disfuncionales). (C) I_g del canal Shab expuesto a 0K⁺. En el caso del canal Shaker W434F las I_g se evocaron con pulsos de -80 a 120 mV en incrementos de 40 mV (HP= -100 mV), mientras que en el Shab fueron de -140 a 20 mV (HP= -90 mV). Aunque las condiciones de registro fueron distintas, se aprecia que (B) y (C) son muy similares. Los registros en A y B son de Loboda *et al.*, 2001; C de Islas y Sigworth, 1999.

Con base en estas observaciones, este trabajo propone que los canales Shab, tras ser expuestos a 0K⁺, se mueven a través de varios estados no-conductores, no-inactivados, pero son incapaces de llegar al estado conductor, al igual que los canales Shaker. Además concluimos que aún no se han descrito las I_g del canal Shab en su estado funcional. Por ello, una de las recomendaciones para continuar con esta línea de investigación consiste en estudiar la relación entre las corrientes *gating* y la estabilidad de G_K en el canal Shab.

Finalmente, como se mencionó con anterioridad, la adición de K⁺ del lado extracelular de la membrana no recupera la corriente perdida durante la exposición a Na₀/K_i. Este hecho nos lleva a sugerir que el lento decaimiento de G_K cuando sólo hay K⁺ del lado

interno (Na_0/K_i) se debe a un mecanismo similar al que provoca el rápido colapso de G_K en $0K^+$.

6.1.3. Conducción iónica

Los experimentos de permeación descritos en el capítulo anterior muestran que los canales Shab no conducen Na^+ (en $0K^+$) de modo apreciable, a diferencia de los canales Kv2.1 o Shaker A463C. En cambio el canal Shab presenta una G_{Cs} medible en las mismas condiciones. Esto indica que la incapacidad de detectar corrientes de Na^+ no se debe a que iones K^+ permanezcan fuertemente unidos en el filtro de selectividad, al quitar el K^+ de las soluciones de registro, bloqueando así la permeación de otros iones. Es decir, en contra de lo propuesto por Ogileska y Aldrich [1998] en relación con la posible permeación de Na^+ en canales de K^+ , la ausencia de corriente de Na^+ en el Shab no se debe a que el poro tenga una afinidad muy elevada por K^+ . Existen dos posibilidades que explicarían estos resultados:

- a) La I_{Na} es mucho menor a I_{Cs} y su detección se dificulta por la rápida caída de la conductancia del canal en $0K^+$.
- b) Otra alternativa consiste en que existan otros residuos, además de los presentes en el filtro de selectividad y la posición 644, que determinen la conducción de Na^+ en el Shab.

Para discernir entre estas posibilidades se requieren más estudios sobre la permeación en este canal.

6.1.4. Relación entre la composición de la solución de $0K^+$ y el colapso de G_K en el canal Shaker

Como se mencionó anteriormente, la estabilidad de los canales Shaker en soluciones de NMG^+ podría deberse a dos razones: a) los iones K^+ que confieren la estabilidad tienen que ser substituidos por un ión apropiado (como Na^+) para dejar el canal, o b) al activar a los canales en soluciones de NMG^+ ocurre un cambio conformacional (inactivación C) que impide el colapso del poro.

Los experimentos de la Figura 12 indican que muy probablemente la estabilidad en NMG^+ se debe a que los iones K^+ no pueden ser reemplazados por este catión orgánico, en los sitios que confieren la estabilidad a G_K [ver Gomez-Lagunas, 2001]. Sin

embargo, es importante señalar que aún no está claro el papel de la inactivación lenta en el colapso del poro, ya que existen datos contradictorios en la literatura y a la fecha no hay algún estudio que se haya abocado a estudiar esta relación.

6.1.5. Comparación entre la estabilidad del canal Shab y otros canales de K^+ activados por voltaje

El comportamiento del Shab en $0K^+$ difiere de modo sustancial al reportado en los canales Shaker. A continuación se enumeran las principales diferencias entre estos canales:

a. La G_K del canal Shab cae rápidamente en $0K^+$, mientras los canales están cerrados al HP de $-80mV$. En contraste, el canal Shaker es estable en esta condición.

b. La G_K del canal Shaker es estable en soluciones de $0K^+$ y $0Na^+$, mientras que la G_K del Shab decae sin que importe la presencia de Na^+ en las soluciones de $0K$.

c. El decaimiento de G_K en el canal Shab no se puede revertir al volver a agregar iones K^+ del lado externo de la membrana ni al cambiar el potencial de membrana, por lo que al parecer el colapso de la G_K es irreversible. En cambio la conductancia del canal Shaker se recupera al aplicar despolarizaciones muy prolongadas (decenas de segundos a minutos, dependiendo del potencial).

d. Respecto a la estabilidad de G_K en soluciones con K^+ , sabemos que la conductancia del canal Shaker es estable durante al menos una hora en Na_0/K_i , mientras que la G_K del canal Shab decae lentamente en función del tiempo de registro (G_K cae un 20% de su valor original en aproximadamente 25 min).

e. Los canales Shab no presentan corrientes de Na^+ significativas en $0K^+$ (I_{Na} fue indetectable). Por otro lado se sabe que los canales Shaker pueden conducir Na^+ , ya que las corrientes de Na^+ tienen una magnitud pequeña pero cuantificable. Las corrientes de Na^+ del Shaker al parecer se presentan tanto en el estado abierto como en el estado inactivado tipo C.

La estabilidad del Shab se comporta de modo muy diferente a la observada en el Kv2.1, a pesar de que estos canales pertenecen a la misma familia de canales de K^+ activados por voltaje. El Kv2.1 es estable en $0K^+$ y posee una conductancia a Na^+ alta, al parecer mayor a la que presentan la mayoría de los canales de Kv [Korn e Ikeda, 1995]. Por otro

lado, el Shab no es estable en 0K⁺ ni conduce Na⁺ de modo apreciable. Resulta sorprendente que dos canales con un alto nivel de homología, y con un filtro de selectividad idéntico, tengan respuestas tan distintas cuando son expuestos a 0K⁺.

A partir del presente estudio se puede apreciar que los canales Shab son muy inestables en 0K⁺ respecto a la mayoría de los canales Kv registrados bajo estas condiciones. Por ejemplo, los canales Kv1.3 y Kv1.5 (miembros mamíferos de la familia de canales de K⁺ tipo Shaker) poseen conductancias que siguen intactas después de haber sido expuestos a 0K⁺ [Korn e Ikeda, 1995; Immke *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000]. Los canales Shab también difieren de los canales Kv1.4, en los que la conductancia cae y se recupera al remover y reañadir K⁺ extracelular [Pardo *et al.* 1992; Jäger *et al.*, 1998].

Por otro lado, el comportamiento del canal Shab en 0K⁺ es más semejante al que presentan los canales que conforman la I_K en el axón gigante de calamar. Sin embargo, existen algunas diferencias entre sus respuestas; por ejemplo, al parecer la G_K del canal Shab cae más rápido en 0K⁺ que en el rectificador tardío del calamar. En cambio, el Shab presenta corrientes de *gating* en respuesta a despolarizaciones, una vez que la conductancia se ha colapsado. Experimentos recientes sobre el rectificador tardío del calamar (utilizando TEA⁺ intracelular) indican que el sitio que da estabilidad se localiza en el dominio extracelular [Khodakhah *et al.* 1997]. Aun se desconoce si ocurre lo mismo en canal Shab, por lo que se siguen realizando experimentos para comprobar esta posibilidad.

6.2. Conclusiones

De acuerdo con los resultados experimentales obtenidos con el canal Shab, se concluye que:

- La G_K del canal Shab decae rápidamente en ausencia de iones K⁺ (0K⁺), con los canales cerrados a -80 mV. Por otro lado la conductancia es estable en soluciones con K⁺ en solo un lado de la membrana, externo (K_o/Na_i) o interno (Na_o/K_i), aunque interesantemente, la estabilidad es mucho mayor en la primera condición.
- El decaimiento de G_K en 0K⁺ no es alterado por la composición de la solución de 0K⁺. Se tiene un efecto comparable (% de colapso) con soluciones de Na⁺, NMG⁺ y colina⁺.

- Al parecer existen dos sitios en donde los iones K^+ mantienen la G_K estable: uno externo (por fuera del filtro de selectividad) y otro interno.
- El Shab, tras ser expuesto a $0K^+$, se mueve a través de estados no-conductores, no-inactivados (como los descritos por primera vez por nuestro grupo de investigación en el Shaker), sin ser capaz de alcanzar el estado abierto al ser activado por despolarizaciones.
- El decaimiento de G_K no puede revertirse al cambiar el potencial de membrana ni al agregar K^+ externo, lo que sugiere que el proceso es irreversible.
- La lenta caída de la G_K en Na_0/K_i obedece a un mecanismo similar al que provoca que G_K decaiga rápidamente en $0K^+$ (Na_0/Na_i).
- La incapacidad de detectar I_{Na} no se debe a iones K^+ que permanecen fuertemente unidos al poro de los canales en $0K^+$ (i.e., no se debe a que el poro presente una afinidad alta por K^+).
- El Shab tiene una conductancia a Cs^+ notoria ($G_{Cs}/G_K = 0.12 \pm 0.04$).

APÉNDICE A. USO DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN DE CANALES IÓNICOS

Los baculovirus recombinantes como vectores de expresión constituyen uno de los sistemas de expresión heteróloga más poderosos y versátiles en eucariontes [O'Reilly *et al.*, 1992; Kidd y Emery, 1993]. Se utiliza para expresar genes de diversos orígenes (animales, plantas, hongos, bacterias y virus) en líneas celulares de insecto, como Sf9 o Sf21. Entre sus ventajas más claras están la producción de proteínas que requieren procesamiento postraducciona l y posee una alta eficiencia de producción de proteína recombinante. Además, tiene otras cualidades que lo convierten en un buen sistema de expresión heterólogo de canales iónicos; por ello, en los últimos años se ha extendido su uso en el campo de la biofísica.

En el laboratorio del Dr. Froylán Gómez Lagunas, sitio donde se desarrolló este trabajo experimental, se han explotado las ventajas que ofrece este sistema de expresión para estudiar las propiedades de permeación y gating de los canales de K⁺ dependientes de voltaje Shaker y Shab. A continuación se describen los principios y características más importantes de este sistema de expresión.

A.1. Introducción a los baculovirus

Los baculovirus son el grupo de virus que afecta con mayor frecuencia a las poblaciones de insectos. Están constituidos por moléculas de DNA circular de doble cadena y superenrolladas que se encuentran protegidas por una cápside cilíndrica [Summers y Anderson, 1972]. A la fecha se han descrito alrededor de 500 especies de baculovirus; la mayoría de estos infectan a los artrópodos, en particular a los insectos del orden de los Lepidópteros [Matthews, 1982; Longworth, 1983].

Las dos especies más utilizadas para la expresión de genes son el virus de la polihedrosis nuclear múltiple de *Autrographa californica* (AcMNPV) y en menor medida el virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV). Ambas especies atacan exclusivamente a lepidópteros como *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*. El AcMNPV es el baculovirus más extensamente estudiado, su genoma ha sido completamente mapeado y secuenciado [Harrap, 1972; Ayres *et al.*, 1994; Kool y Vlak, 1993], razón por la cual se tiene una mayor gama de vectores de expresión basados en este baculovirus.

Los baculovirus silvestres presentan dos tipos de ciclo de vida: uno lítico y otro ocluido; estos se desarrollan de modo independiente a través de las tres fases del ciclo de replicación del virus. Las principales características de las fases de la infección viral son:

A) Fase temprana: También se conoce como la fase de síntesis del virus ya que éste prepara a la célula infectada para la replicar su DNA. Los eventos en esta fase incluyen la adsorción del virus a las células, la penetración, la remoción de su matriz y cápside, la expresión temprana de genes virales y finalmente la supresión de la expresión de genes del huésped. La síntesis inicial del virus comienza entre 30 minutos y 6 horas post-infección.

B) Fase tardía: Durante esta fase se produce el ciclo lítico. En esta fase (también conocida como la fase estructural del virus) los genes tardíos se expresan para replicar el DNA viral y ensamblar las partículas virales. Entre las 6 y 12 horas post-infección, las células empiezan a producir virus extracelulares (extracellular virus, EV) también conocidos como virus no ocluidos (non-occluded virus, NOV) o virus gemados (budded virus, BV). Los virus extracelulares están constituidos por DNA genómico y la cápside; cubiertos por membrana plasmática (que obtienen de la célula huésped) y glicoproteína (gp) 64, la cuál es necesaria para que el virus sea endocitado por las células. La producción máxima de virus extracelulares se registra entre las 18 y 36 horas posteriores a la infección.

C) Fase muy tardía: También se conoce como la fase de la proteína de oclusión viral. En la fase muy tardía se produce el ciclo ocluido del baculovirus y se caracteriza por la expresión de los genes de la polihedrina y p10, que son los responsables de la formación de los virus ocluidos (occluded virus, OV) también conocidos como cuerpos de oclusión (occlusion bodies OB) o cuerpos de inclusión poliédricos (polyhedral inclusion bodies, PIBs). Finalmente ocurre la lisis celular, donde se liberan a los virus ocluidos. Los virus ocluidos se producen en el núcleo; están constituidos por una matriz formada por la proteína polihedrina, que les confiere gran resistencia a condiciones ambientales adversas. Bajo esta matriz se encuentran varios viriones encapsulados (formados por la cápside y el DNA genómico). Los cuerpos de inclusión poliédricos tienen la apariencia de cuerpos poligonales oscuros bajo la microscopía óptica (Figura 15B). Los virus ocluidos se producen entre las 24 y las 96 horas posteriores al inicio de la infección.

A.1.1. Tipos de transmisión *in vivo*

A) Transmisión vertical: El ciclo inicia cuando las larvas de insecto consumen accidentalmente virus ocluidos, que se encuentran dispersos en el ambiente. Tras ser consumidos, la matriz de polihedrina de estos virus es degradada por el pH alcalino del intestino medio del insecto lo que provoca la liberación de los viriones encapsulados. Éstos se fusionan con las células del epitelio microviliar, dando inicio a la infección. Eventualmente, las células infectadas liberan virus extracelulares hacia el sistema hemolinfático del insecto.

B) Transmisión horizontal: Los virus extracelulares se dispersan por todo el cuerpo del insecto a través del sistema hemolinfático, lo que provoca que muchos tipos celulares resulten infectados. Al transcurrir diez generaciones virales la larva de insecto muere y los virus ocluidos, que fueron producidos en la fase muy tardía, son liberados en el ambiente para iniciar un nuevo ciclo.

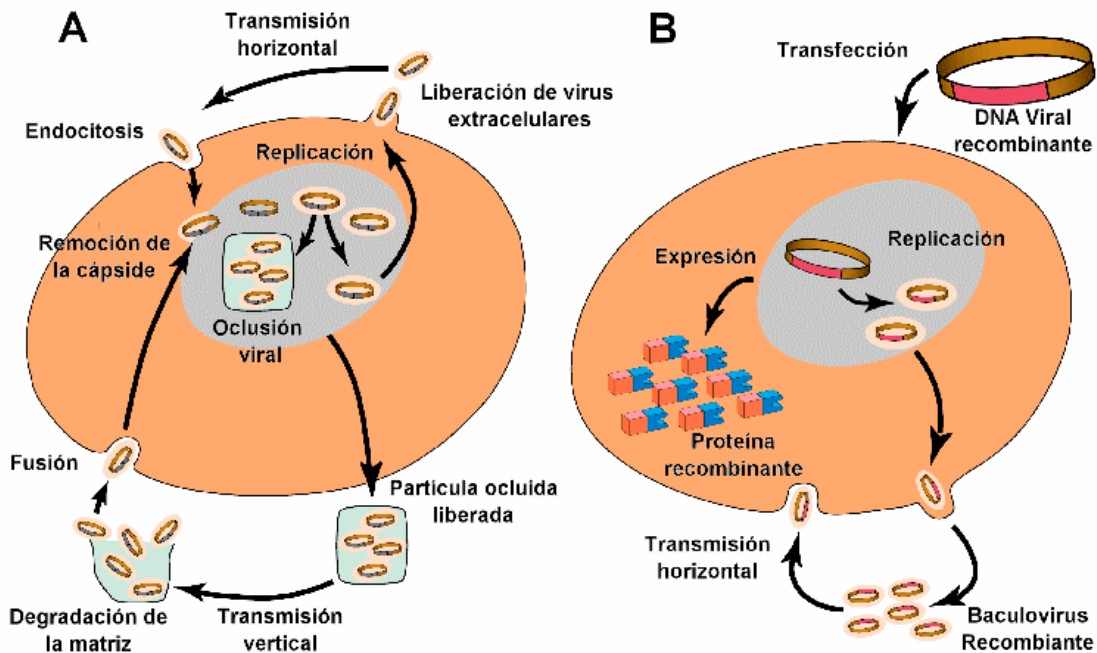


Figura 14. Ciclo de vida del baculovirus *in vivo* e *in vitro*. (A) *In vivo*: En él existen dos poblaciones virales, la extracelular y la ocluida. Los virus extracelulares se forman en el ciclo lítico, mientras que los ocluidos son producto del ciclo ocluido. Los baculovirus silvestres se propagan por transmisión horizontal y vertical. (B) *In vitro*: En el DNA cromosomal del baculovirus se sustituye el gene de la polihedrina por algún transgene de interés. Este DNA se transfecta en las células de insecto, lo que produce baculovirus recombinantes. Estos se emplean para dos fines: para expresar la proteína recombinante en las células de insecto o para producir más reservas de virus. Figura modificada de "Baculovirus expression vector system manual, sixth edition. 1999".

A.2. Los baculovirus como vectores de expresión

La diferencia principal entre la infección *in vivo* que ocurre en la naturaleza y la infección en un sistema recombinante *in vitro* consiste en la sustitución del gene de la polihedrina (que se encuentra presente en el genoma del baculovirus silvestre) por un gene heterólogo o por cDNA. Existen dos estrategias para llevar a construir baculovirus recombinantes: por recombinación homóloga [Summers y Smith, 1987], o por transposición sitio-específica [Luckow *et al.*, 1993]; ambas requieren vectores de transferencia que insertan el gene o cDNA de interés en el DNA genómico de un baculovirus parental.

Los insertos generalmente están bajo el control del promotor de la polihedrina (PH). En la fase tardía, los viriones recombinantes son ensamblados y liberados; sin embargo en la fase muy tardía de la infección los genes heterólogos insertados en el baculovirus son puestos bajo el control del promotor PH, que induce niveles muy altos de transcripción del inserto. Por lo tanto, el producto recombinante es expresado en vez de la polihedrina (que sólo está presente en los baculovirus silvestres). Generalmente las proteínas recombinantes son procesadas y modificadas postraduccionalmente de modo adquieren su estado funcional.

A.2.1. Líneas celulares

Existen múltiples líneas celulares de origen lepidóptero destinadas al manejo de baculovirus recombinantes; en la Tabla 2 se enumeran las principales líneas huéspedes. De todas ellas, la línea celular Sf9 es la más utilizada. Esta se estableció a partir de células del epitelio ovárico de *Spodoptera frugiperda* (oruga comúnmente conocida como “gusano cogollero” o “fall armyworm”) [Vaughn *et al.*, 1977]. Aunque es la línea celular mejor caracterizada, aun no se tiene claro si es la más apta para replicación de virus o para expresión de proteínas recombinantes. Un estudio sugiere que las diferentes líneas celulares proveen distintos niveles de expresión y de glicosilación en la misma proteína recombinante [Hink WF *et al.*, 1991].

Tabla 2. Líneas celulares más comunes para el manejo de Baculovirus recombinantes

Especie de insecto	Línea celular
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Sf9
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Sf21
<i>Trichoplusia ni</i>	Tn-368
<i>Trichoplusia ni</i>	High-Five BTI-TN-5B1-4

A.2.2. Comparación entre la infección *in vivo* e *in vitro*

La Figura 14 resume el modo de infección y propagación de los baculovirus *in vivo* e *in vitro*. Durante el ciclo lítico se producen virus extracelulares que promueven la transmisión horizontal de la infección hacia los tejidos del insecto en una infección *in vivo*, o en el cultivo celular en un sistema de expresión *in vitro*. Este ciclo del virus es usado *in vitro* tanto para producir reservas del virus como para inducir la expresión de proteína transgénica en las células de insecto. *In vivo*, durante el ciclo ocluido, se generan viriones empacados en cuerpos de inclusión poliédricos; estos viriones promueven la transmisión vertical de los virus entre insectos huéspedes. *In vitro* se sustituye el gen que codifica la polihedrina por un gene heterólogo, lo que impide la formación de los virus ocluidos (por tanto no hay transmisión vertical).

Desde el punto de vista bioquímico, la diferencia esencial entre el ciclo lítico y el ciclo ocluido (*in vivo*) se debe por la inducción de la producción de la polihedrina en la fase muy tardía.

A.2.3. Citopatogénesis de las células huésped por baculovirus recombinantes

Durante la infección con los baculovirus recombinantes ocurren muchos cambios morfológicos en las células huéspedes. El transcurso temporal de la infección así los cambios morfológicos que ocurren durante ésta dependen de varios factores, como la cepa de virus, la línea celular, etcétera. A continuación se enumeran los cambios morfológicos que produce la infección por baculovirus recombinantes AcMNPV en la línea celular de insecto Sf9.

A) Fase temprana: El RNA viral es detectable a partir de los 30 minutos del inicio de la infección. Durante las primeras 6 horas de infección, la estructura celular empieza a cambiar, las funciones celulares normales declinan y se expresan las proteínas de la fase temprana de la infección.

B) Fase tardía: Entre las 6 y 24 horas post-infección se evidencian muchos cambios en las células infectadas como el cese completo de las funciones celulares normales, la proliferación celular se detiene y aumenta la producción de componentes virales y virus extracelulares. Las células infectadas aumentan de diámetro y el núcleo incrementa su tamaño. Las células pueden exhibir una refractividad reducida bajo la microscopía de contraste de fases.

C) Fase muy tardía: De 20 a 36 horas las células dejan de producir virus extracelulares, comienza la síntesis y expresión del producto recombinante. El diámetro de las células y el de sus núcleos sigue aumentando de tamaño (hasta un 50% más comparado con el de las células no infectadas, ver Figura 15). En esta fase el citoplasma de las células contiene muchas vacuolas y el núcleo a veces muestra un aspecto granulado. A medida que progresa la infección, la viabilidad de las células disminuye.

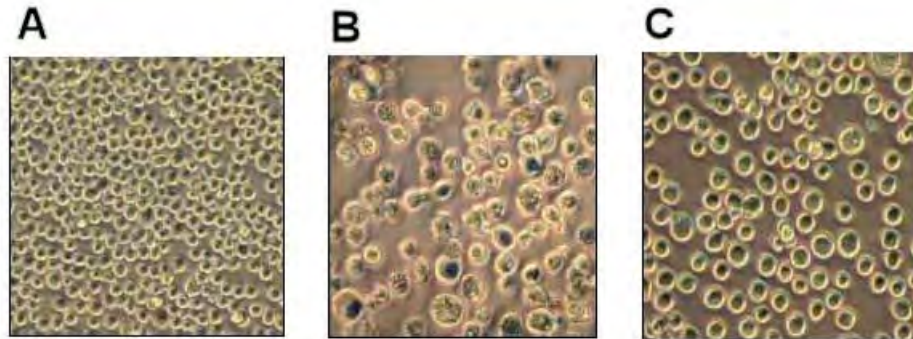


Figura 15. Comparación entre las células Sf9 infectadas y no infectadas con baculovirus [Baculovirus expression vector system manual, sixth edition, 1999]. (A) Sf9 no infectadas. (B) Sf9 infectadas con un baculovirus silvestre. En ellas se observa la presencia de cuerpos de inclusión polihédricos. (C) Sf9 infectadas con un baculovirus recombinante (con el gene Xyle).

A.3. Características del sistema de expresión

A.3.1. Ventajas

A) Bioseguridad: Los baculovirus no son patogénicos en vertebrados ni en plantas [Ignoffo, 1975]. Estos virus tienen una gama muy limitada de especies huéspedes (sólo algunas especies de lepidópteros), por lo tanto estos sistemas se manejan fácilmente y no representan ningún peligro de bioseguridad.

B) Producción de grandes cantidades de proteína recombinante: Este sistema induce un nivel de producción proteína recombinante tan elevado que rivaliza en eficiencia con los sistemas de expresión en levaduras o en bacterias, y es muy superior (~100 veces mayor) al que se tiene en sistemas de expresión en células de mamíferos.

C) Proliferación celular: Los tiempos de duplicación de las células de insecto (12-15 h) son 50% más cortos que en la mayoría de las líneas celulares de mamífero (24 h).

Además, estas tienen dos ventajas importantes respecto a las células de mamífero: las células de insecto no requieren CO₂, y se las puede adaptar a medios de cultivo libres de suero.

D) Procesamiento postraducciona l de las proteínas recombinantes: Generalmente, las células de insecto procesan las proteínas del mismo modo que las células de mamífero [Smith *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1985]. Características biofísicas como la conformación, oligomerización, localización celular y modificaciones postraduccionales se mantienen (en la mayoría de los casos) intactas en este sistema de expresión. Sin embargo algunos tipos de modificación postraducciona l, como la N-glicosilación, pueden estar afectadas en las células infectadas (ver limitantes).

A.3.2. Limitantes

A) Clonación directa: La clonación directa de insertos no es posible en este sistema debido al gran tamaño del genoma del baculovirus (~130 k pares de bases).

B) Cultivo de las células de insecto: A pesar de que las células de insecto son fáciles de cultivar, estas son muy sensibles a detergentes, pirógenos y pesticidas, por lo que se deben mantener condiciones óptimas de cultivo.

C) Alteraciones del procesamiento postraducciona l por efectos temporales de la infección: Aunque en la mayoría de los casos las proteínas son modificadas de modo correcto, la supresión de la síntesis de macromoléculas del huésped durante la fase muy tardía puede tener consecuencias adversas en el procesamiento postraducciona l de las proteínas recombinantes (esto varía en cada caso). En ocasiones se producen poblaciones heterogéneas de proteína. Este efecto es más marcado en la N-glicosilación.

A.4. Expresión de canales iónicos por medio de baculovirus

Los baculovirus han sido utilizados principalmente para la expresión de proteínas solubles, sin embargo hacia 1989 existían reportes de que las células de insecto eran capaces de expresar proteínas integrales de membrana de origen mamífero como los receptores a la transferrina, el factor de crecimiento epidérmico y el receptor β-adrenérgico [Domingo y Trowbridge, 1988; Greenfield *et al.*, 1988, George *et al.*, 1989].

Estos resultados motivaron al grupo de Miller a construir un baculovirus recombinante para la expresión de los canales de potasio Shaker B en la línea celular Sf9 [Klaiber *et al.*, 1990]. Ellos demostraron que este sistema de expresión es eficiente para la expresión de canales iónicos, puesto que se producen cantidades apreciables de esta proteína en la membrana plasmática (detectado mediante Western Blot) así como la expresión de corrientes de K⁺ que corresponden a las descritas en el canal Shaker (por medio de técnicas electrofisiológicas). Sin embargo, Klaiber *et al.* encontraron que la mayor parte de la proteína no alcanza a incorporarse a la membrana, por lo que este sistema no se usó posteriormente para el fin que se había propuesto inicialmente, a saber, realizar estudios bioquímicos de la proteína que forma el canal Shaker B.

La línea celular Sf9 tiene varias ventajas desde el punto de vista electrofisiológico; por ejemplo, no muestran actividad de canales dependientes de voltaje endógenos a un nivel discernible (tienen un fondo electrofisiológico muy limpio), lo cual las convierte en una excelente opción para estudiar la actividad de canales expresados de modo heterólogo. Además estas células son aptas para realizar registros por medio de patchclamp tanto en configuración de parche escindido (inside-out y outside-out) así como en célula completa (whole cell) [Klaiber *et al.*, 1990]. La identificación de las células con altos niveles de expresión es relativamente fácil, sólo requiere el conocimiento de los cambios morfológicos que sufren las células al ser infectadas. Usualmente se tienen corrientes de buena amplitud (0.5 a 20 nA) con células que tienen una apariencia similar a la que se muestra en la Figura 15C.

Finalmente, existen muchas publicaciones que reportan el uso de baculovirus recombinantes para expresar varios tipos de canales iónicos de interés. Por citar algunos ejemplos tenemos a los canales de K⁺ activados por voltaje Shab, SqKv1A y Kv1.1 [Islas y Sigworth, 1999; Brock *et al.*, 2001; Gubitosi-Klug *et al.*, 1995], algunos rectificadores entrantes (Kir) [Mikhailov *et al.*, 2000; Schwalbe *et al.* 2002; Salvador *et al.*, 2003;] y el canal de cloro CFTR, codificado por el gene de la fibrosis quística [Kartner *et al.*, 1991].

APÉNDICE B. ARTÍCULO PUBLICADO

Pflügers Arch – Eur J Physiol (2005) 450: 255–261
 DOI 10.1007/s00424-005-1411-9

ION CHANNELS, TRANSPORTERS

Marco Ambriz-Rivas · Leon D. Islas
 Froylan Gomez-Lagunas

K⁺-dependent stability and ion conduction of Shab K⁺ channels: a comparison with Shaker channels

Received: 25 November 2004 / Revised: 11 February 2005 / Accepted: 9 March 2005 / Published online: 21 May 2005
 © Springer-Verlag 2005

Abstract K⁺ depletion exerts dramatically variable effects on different potassium channels. Here we report that Shab channels are rather stable in the absence of either internal or external K⁺ alone; however, its stability is greater with K⁺ outside the cell. In contrast, with 0 K⁺ (non-added) solutions on both sides of the membrane, the conductance (G_K) is rapidly and irreversibly lost. G_K is lost with the channels closed and regardless of the composition of the 0 K⁺ solutions. In comparison, it is known that the Shaker B G_K collapses only if the channels are gated in 0 K⁺, Na⁺-containing solutions. In order to compare the behavior of Shab to that of Shaker, we show that after extensively gating the channels in 0 K⁺ *N*-methyl-D-glucamine solutions, most Shaker channels remain stable, and in a conformation where G_K collapses as soon as there is Na⁺ in the solutions. Regarding ion conduction, in contrast to Kv2.1 and Shaker A463C that have a sizable G_{Na} in 0 K⁺, Shab, which shares a 463-cysteine and an identical signature sequence with these channels, does not appreciably conduct Na⁺, although it presents a significant Cs⁺ conductance. The observations suggest that there are at least two sites where K⁺ binds and thus maintains Shab G_K stable, one internal and the other(s) most likely located outside the selectivity filter.

Keywords Shab · Shaker · K⁺ channels · Conductance · Stability · Selectivity

M. Ambriz-Rivas · F. Gomez-Lagunas (✉)
 Facultad de Medicina, Department Fisiología,
 UNAM. México. Cd. Universitaria, Apartado Postal 70–250,
 México, DF, 04510, México
 E-mail: froylangl@yahoo.com
 Tel.: + 55-5-6232263

L. D. Islas
 Howard Hughes Medical Institute,
 Department Physiology and Biophysics,
 University of Washington, Seattle, WA 98195, USA

Introduction

Since the classical study of Almers and Armstrong in 1980 [1] on the stability of the squid K⁺ channel, it has been widely recognized that K⁺ ions play a critical role in the stability of K⁺ channels. However, recent studies have demonstrated that K⁺ depletion exerts extremely variable effects on different K⁺ channels [e.g., see 1, 2, 4, 9, 12, 20, 22]. Considering the conservation of the signature sequence and the associated selectivity filter of the pore [3, 7], these variability results are surprising and its molecular basis is poorly understood. Moreover, it is known that K⁺ ions are also needed to maintain the selectivity of some K⁺ channels [e.g., 2, 5, 12, 14–16, 18, 19]. The relation between the K⁺-dependent stability and selectivity of the channels is not well understood. In order to improve our knowledge of these processes, here we extend our previous observations on the K⁺-dependent stability and selectivity of Shaker to delayed rectifier Shab channels.

Shaker channels endure, without noticeable changes, prolonged exposures to 0 K⁺ (non-added) solutions on both sides of the membrane, as long as they are kept closed throughout the exposure to 0 K⁺. However if the channels are gated by the delivery of activating pulses in 0 K⁺, then their conductance (G_K) collapses [4, 6]. The drop of G_K becomes significant only when there is Na⁺ in the solutions: approximately 99% versus 20% drop upon the delivery of 20 pulses in Na⁺- or *N*-methyl-D-glucamine (NMG⁺)-containing solutions, respectively [5]. It is thought that G_K collapses during the deactivation (closing) of open channels in 0 K⁺ at the end of the activating pulses [4, 14]. The non-conducting channels present gating currents [14]. Prolonged depolarizations restore G_K [4].

Shab shares an identical signature sequence with Shaker channels [7], and here we show that, in contrast to the behavior of Shaker, the Shab G_K drops rapidly and irreversibly in 0 K⁺ solutions while the channels are

kept closed at -80 mV and regardless of the Na⁺ content of the solutions. Moreover, to better appreciate the differences between Shab and Shaker behavior, we also report that even after numerous gating cycles in 0 K⁺- and 0 Na⁺-, NMG⁺-containing solutions, Shaker channels not only remain quite stable, but do so in a conformation from which G_K collapses as soon as there is Na⁺, and the channels are gated.

It is also known that the mammalian Shab homologue Kv2.1 remains stable and presents a substantial G_{Na} in 0 K⁺ [12], whereas Shaker B only presents a scant, but measurable, G_{Na} , before the conductance collapses [4, 14, 16, 18]. The mutation A463C in S6 of Shaker, which introduces a cysteine that is present in the same position in Kv2.1, greatly increases G_{Na} in 0 K⁺. The latter is thought to be the result of a decreased affinity of K⁺ in the pore, brought about by the A463C mutation [16]. Considering that Shab shares an identical signature sequence and 463 residues with both Kv2.1 and Shaker A463C, we have also tested its ability to conduct Na⁺ in 0 K⁺.

Materials and methods

Cell culture and K⁺-channel expression

Insect Sf9 cells were kept in culture at 27°C in Grace's media (Gibco). The cells were infected, with a multiplicity of infection of 10, with a recombinant baculovirus, *Autographa californica*, containing the cDNA of either Shab (dShab11, Gen Bank access number M32659) or Shaker B (Gen Bank access number X07132) K⁺ channels as previously reported [5, 8, 11]. Electrophysiological recordings were carried out 48 h after the infection of the cells.

Electrophysiological recordings

Currents were recorded under whole-cell patch clamp with a Multiclamp 700 (Axon Instruments, Union City, Calif., USA). The currents were filtered at 5 kHz and sampled at 100 μ s/point, with a Digidata 1322A interface (Axon Instruments). Electrodes were made of Borosilicate glass (KIMAX 51) pulled to a 0.5–2 M Ω resistance. Seventy to eighty percent of the series resistance was compensated. The holding potential (HP) was -80 mV (except where indicated).

Solutions

Solutions were named by their main cation e.g., K_i.

1. The internal solutions contained:

- K_i: 90 mM KF, 30 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, and 10 mM HEPES-K
- Na_i: 90 mM NaF, 30 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, and 10 mM HEPES-Na

c) NMG_i: 90 mM HF, 120 mM NMG, mM 2 MgCl₂, mM 10 EGTA, and 10 mM HEPES-TMA

2. The external solutions contained:

- Na_o: 145 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES-Na
- K_o: 100 mM KCl, 45 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES-K
- Cs_o: 145 mM CsCl, 10 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES-Na
- NMG_o: 145 mM NMG-HCl, 10 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES
- Choline_o: 145 mM cholineCl, 10 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES-TMA

The pH of both internal and external solutions was 7.2.

The results are expressed as mean \pm SEM of the indicated number of experiments. Statistical significance was evaluated with the unpaired *t*-test.

Results

In order to test the role of K⁺ in the stability of Shab channels, control K⁺ currents (I_K) were recorded in K_o/Na_i solutions (see "Materials and Methods"). The currents were evoked by 0 mV/30-ms pulses, applied every 12 s during 5 min to first check the stability of the channels under control conditions. Figure 1a, left panel, shows a control I_K of a representative cell. Thereafter, the cell was superfused with the test, 0 K⁺ (non-added), Na_o solution for 1.5 min, with the channels kept closed at the HP of -80 mV (indicated by the arrow). Finally, the cell was superfused back with the K_o solution and the state of the channels was tested. The trace in the right panel shows that, after the brief exposure to 0 K⁺ solutions (Na_o/Na_i), there was a marked reduction of I_K . The decrease of I_K is equally observed at all voltages (see Fig. 4)

Upon K⁺ removal, G_K is lost, probably because stabilizing K⁺ ion(s) are removed from the channels. Is the stabilizing K⁺ bounded to the selectivity filter of the pore? To gain more insight regarding this point, we repeated the experiment illustrated in Fig. 1a, but this time using 0 K⁺ and 0 Na⁺ solutions. Figure 1b, c show that bathing the membrane in either NMG_o/NMG_i or choline_o/NMG_i solutions, respectively, produces a drop of G_K similar to that observed in Na_o/Na_i. This is best seen in Fig. 1d, where the average reduction of I_K after exposure to 0 K⁺ solutions is shown. The fall of I_K is statistically larger in Na⁺ ($81 \pm 5\%$, $n=9$) than in either NMG⁺ ($70 \pm 4\%$, $n=10$) or choline⁺ ($63 \pm 9\%$, $n=3$) solutions, whereas the effects of the last two solutions mentioned do not significantly differ ($P < 0.05$). Nevertheless, it is clear that the three solutions have a comparable effect on the stability of the Shab G_K . This statement is supported by the dramatically different effects of Na⁺ versus NMG⁺ (or choline⁺) solutions in the stability of the Shaker G_K [5]; Fig. 5).

The above results along with those of Islas and Sigworth [8] (who managed to record Shab gating currents under conditions similar to those in Fig 1b) suggest that, after exposure to 0 K⁺, Shab continues to gate, but without being able to conduct, as seen in Shaker [4, 14, 15]. However, in contrast to the case of Shaker, whose conductance is recovered with prolonged depolarizations [4], the Shab G_K cannot be recovered by adding back K⁺ (Fig. 1) or by changes of the membrane potential. This is demonstrated in Fig 2a, where the time course of I_K in a representative cell is shown. Initially, I_K(t=0) approximately -2.4 nA, and remained constant for the next

5 min. Then, the cell was exposed to 0 K⁺ solutions (Na_o/Na_i) for 1.5 min, like in Fig. 1a. I_K dropped to approximately -0.24 nA, (indicated by the first arrow), and remained without any significant change for the next 10 min. At that moment, the HP was depolarized to 0 mV for 3 min, a procedure that allowed the recovery of the Shaker G_K [4], and after approximately 1 min with the HP back at -80 mV, the state of the channels was tested. There was no change in the amplitude of I_K (signaled by the second arrow). Finally, at the time indicated by the third arrow (approximately 17 min), the HP was hyperpolarized to -100 mV, and the subsequent test pulses were applied from this HP. Again there was no significant change in the amplitude of I_K. This behavior is illustrated by the traces in Fig. 2b. The left panel shows the control current [control(t=0)]. The right panel shows the current after the exposure to 0 K⁺ (1 in Fig. 2a) superimposed with those recorded after the 3 min depolarization to 0 mV and after the change of the HP to

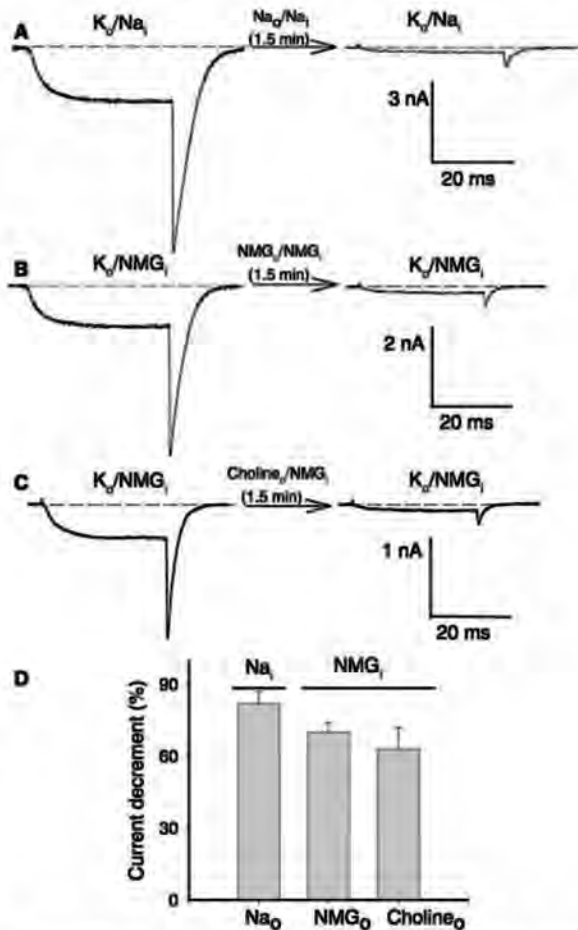


Fig. 1 a-d Drop of Shab K⁺ conductance (G_K) in 0 K⁺ solutions of varying composition. **a** K⁺ currents (I_K) evoked by a 0 mV/30-ms pulse in K_o/Na_i before (left panel) and after (right panel) bathing the cell in Na_o/Na_i solutions during 1.5 min, as indicated by the arrow. **b** As in **a**, but I_K was recorded in K_o/N-methyl-D-glucamine_i (NMG_i) before (left panel) and after (right panel) bathing the cell in NMG_o/NMG_i solutions. **c** As in **a**, but currents were recorded in K_o/NMG_i before (left) and after (right panel) bathing the cell in choline_o/NMG_i solutions. During the exposure to 0 K⁺ the channels were kept closed at -80 mV. **d** I_K decrement after bathing the cell in either Na_o/Na_i, NMG_o/NMG_i or choline_o/NMG_i solutions, as indicated. The drop of G_K is statistically larger in Na⁺ than in either NMG⁺ or choline⁺ solutions, whereas the effects of the two latter do not statistically differ (P<0.05). Nevertheless, the three solutions have a comparable effect on G_K

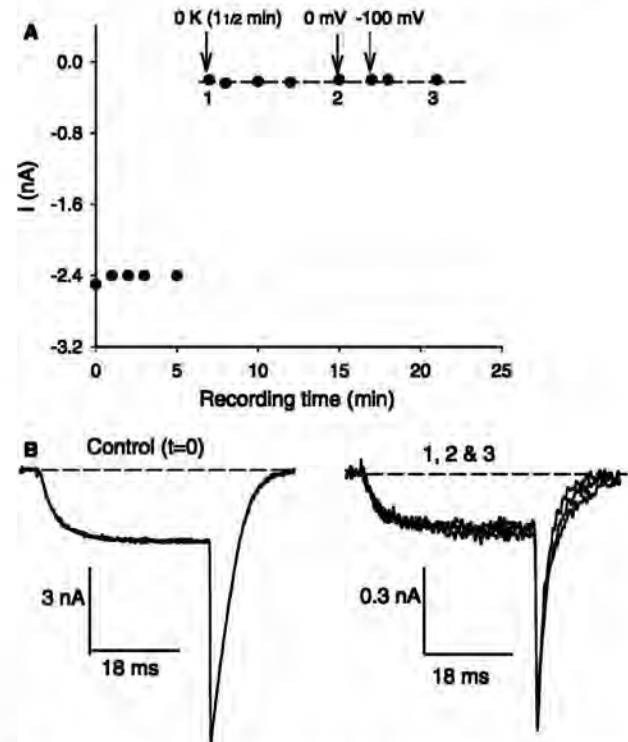


Fig. 2 a, b Time course of I_K before and after exposure to 0 K⁺. **a** I_K evoked by 0 mV/30-ms test pulses against time of recording (in K_o/Na_i) in a representative cell. Initially, I_K is approximately -2.4 nA. Afterward, the cell was superfused with Na_o for 1.5 min and thereafter, with the cell back in K_o, the test pulses were applied; I_K drops to approximately -0.24 nA (arrow labeled 0 K⁺). Afterward, the holding potential (HP) was changed to 0 mV for 3 min, and after approximately 1 min with the HP back at -80 mV, the point signaled by the arrow labeled 0 mV was recorded. I_K did not change. Finally, the HP was changed to -100 mV, and all subsequent pulses were applied from this HP (last arrow). I_K did not change either. **b** Left panel, I_K at the beginning of the recording. Right panel, superimposed I_K recorded at the times indicated by the corresponding numbers in **a**

-100 mV (2 and 3 in Fig. 2a, respectively). The results in Figs. 1 and 2 suggest that the drop of the Shab G_K is irreversible. The same behavior has been observed in all the cells tested (> 30).

Figure 3 shows the stability of I_K as a function of the time of recording in K⁺-containing solutions. I_K is quite stable with K⁺ present in only one side of the membrane. However, it is interesting to note that I_K is slightly, but significantly, more stable with K⁺ outside (in K_o/Na_i) than inside the cell (in Na_o/K_i). In comparison, Shaker I_K remains completely stable for hours in the presence of either of these recording conditions [4].

The drop of Shab G_K in Na_o/K_i cannot be reverted by the addition of K⁺ to the external solution. This is shown in Fig. 3b, which presents three superimposed I_K : one recorded at time 0 [labeled $Na_o(t=0)$]; one recorded after 25 min with the cell in Na_o/K_i , I_K having fallen to approximately 80% of its initial value; and one recorded after the subsequent immediate addition of 2 mM K_o [labeled $Na_o(t=25 \text{ min})$ and $2 K_o(t=0)$, respectively]. The amplitude of I_K before and after the addition of 2 mM K⁺ is the same. Furthermore, and importantly, taking as time 0, the moment of 2 mM K_o addition, it is seen that the amplitude of I_K continues to drop [in $(Na_o + 2K_o)/K_i$], with a time course that is indistinguishable from that observed during the previous 25 min in only Na_o/K_i (marked as squares in Fig 3a; see also "Discussion").

We were also interested in studying ion conduction properties in order to determine if Shab could have a measurable I_{Na} in 0 K⁺, as seen in Kv2.1 and Shaker A463C [12, 16]. In order to do this, we chose cells with high channel expression to facilitate the detection of a possible I_{Na} . Figure 4a shows the results of a representative experiment. The left panel presents I_K evoked by stepping up the membrane from -60 mV to +20 mV, in 20-mV increments from the HP of -80 mV, in K_o/Na_i . Thereafter, the cell was superfused for 45 s with Na_o , and the channels were activated (in Na_o/Na_i) as in the control. There was no time dependent current (middle panel). Finally, the cell was superfused back with K_o .

The reduction of I_K (approximately 80%, right panel) was similar to that seen without opening the channels in Fig. 1d (see "Discussion"). Besides, as mentioned above, the decrease of I_K is observed at all voltages. This effect is best observed in Fig. 4c, which presents the I-V relationship of the traces, as indicated. The same result was obtained in all the cells tested ($n=4$). In two of the cells a single +60 mV/30-ms pulse was applied in Na_o , and there was no time-dependent current (not shown).

The failure to detect I_{Na} in 0 K⁺ may have several explanations. One possible explanation is that I_{Na} exists but is very small and difficult to detect with the drop in conductance. Alternatively, it could be that tightly bound K⁺ ions remain in the pore, blocking the passage of Na⁺ (although being unable to preserve the conductance). To get some insight into this phenomenon, we investigated to see if Cs⁺ ions could carry current in 0 K⁺. The left panel of Fig. 4b shows I_K from a representative cell in K_o/Na_i . After the cell was superfused with Cs_o, inward I_{Cs} was easily observed ($G_{Cs}/G_K=0.07$, middle panel). The right panel shows I_{Cs} in an expanded scale. Figure 4d compares the I-V curves of the traces, as indicated. Measurements with three other cells gave $G_{Cs}/G_K=0.12 \pm 0.04$, $n=4$. The above observations suggest that the lack of measurable I_{Na} in 0 K⁺ may not be due to the persistence of tightly bound K⁺ ions in the pore of the channels, because if that were the case, then it would be expected that they would also block the passage of Cs⁺.

The conditions that drop the Shab G_K become more striking when they are compared with those that produce the collapse of the Shaker G_K . Figure 5a (left panel) shows a control I_K through Shaker B, elicited by a +20 mV/30-ms activating pulse in K_o/NMG_i . Then, the cell was superfused with NMG_o , and an excess (see "Introduction") of 40 activating pulses were delivered (in NMG_o/NMG_i) to extensively gate the channels (not shown). Then, the cell was superfused again with K_o , and the state of the channels was tested. There was only a mild reduction of I_K (middle panel); in contrast to Shab, the Shaker G_K is very stable in 0 K⁺ and 0 Na⁺ solutions.

Fig. 3 a, b Stability of Shab G_K in K⁺-containing solutions. **a** Relative current [$I_K(t)/I_K(t=0)$] against time of recording in the indicated solutions (see text). The points are the mean \pm SEM of $n=4$, K_o/Na_i ; $n=5$, Na_o/K_i ; $n=4$ ($Na_o + 2K_o$)/ K_i . **b** Superimposed I_K evoked by a 0-mV pulse, recorded at the beginning of the experiment in Na_o/K_i [$Na_o(t=0)$], after 25 min of recording in Na_o/K_i , and after the immediate addition of 2 mM K⁺ to the Na_o solution, as indicated

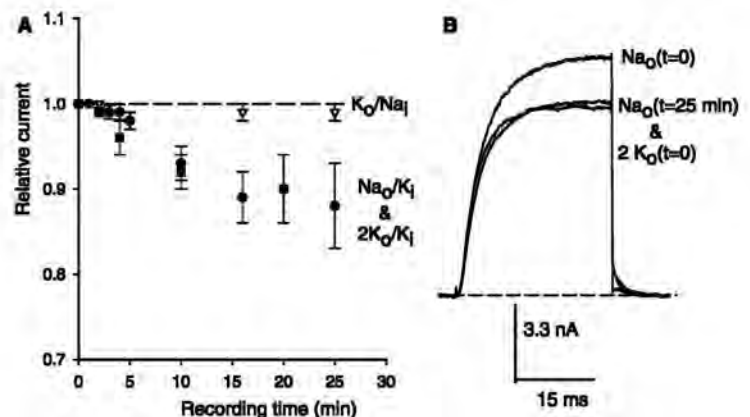


Fig. 4 a, b Ion conduction in 0 K⁺. **a** Left panel, I_K evoked by depolarizing pulses from -60 to +20 mV, applied every 5 s in 20-mV increments from the HP of -80 mV, in K_o/Na_i. **Middle panel**, currents evoked as in the control but with the cell in Na_o/Na_i. **Right panel**, I_K recorded with the cell back in K_o/Na_i. **b** **Left panel**, I_K recorded as in a but in a different cell. **Middle panel**, inward I_{Cs} evoked as in a, with the cell in Cs_o/Na_i. The **right panel** shows I_{Cs} in an expanded scale. **c** I-V relationship of the traces in a. **Open symbols** Na_o/Na_i, **closed symbols** I_K before and after exposure to 0 K⁺ as indicated; the currents were measured at the end of the activating pulses. **d** I_K vs V_m, and I_{Cs} vs V_m of the traces in b, as indicated

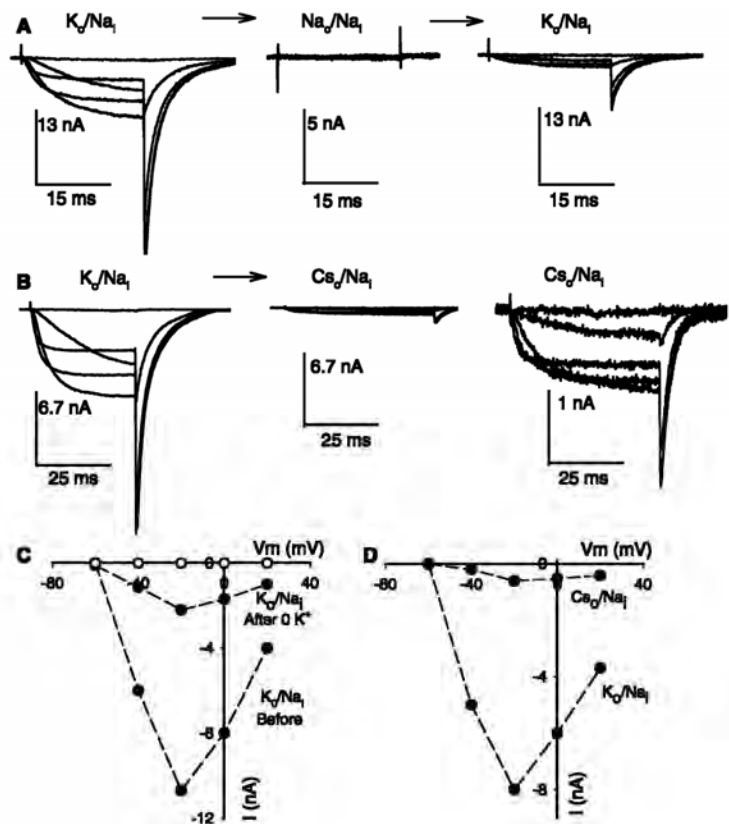
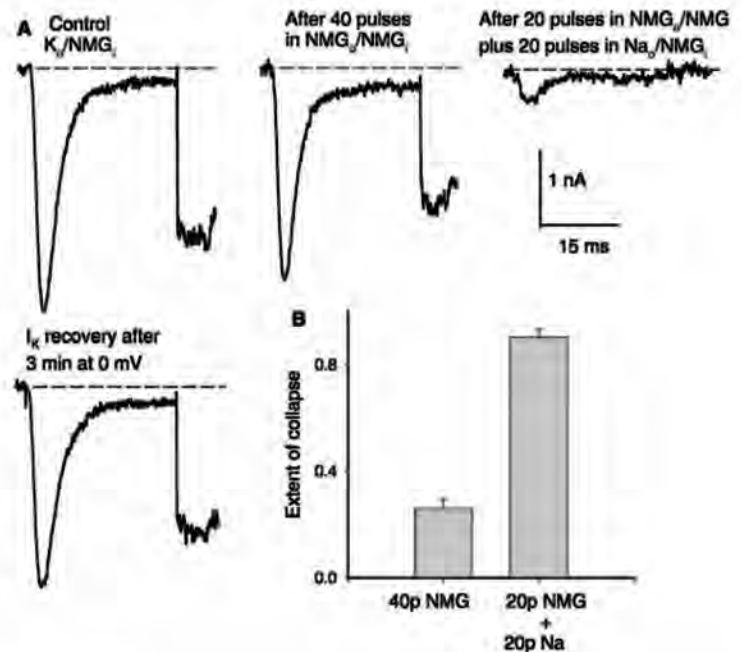


Fig. 5 a, b Stability of Shaker G_K in 0 K⁺ and 0 Na⁺ solutions. **a** **Left upper panel** control I_K evoked by +20 mV/30-ms activating pulse in K_o/NMG_i. **Middle panel**, I_K left after the delivery of 40 activating pulses (1 pulse/s) in NMG_o/NMG_i (not shown). **Right panel** I_K left after the delivery of 20 pulses in NMG_o/NMG_i, immediately followed by a second round of 20 pulses in Na_o/NMG_i (not shown). **Left lower panel** G_K recovery after a 3-min depolarization to 0 mV. The current was recorded 1 min after the HP was back at -80 mV. **b** Extent of drop of G_K after pulsing like in a, as indicated (n=4)



The stability of Shaker G_K in 0 Na⁺ likely arises because the stabilizing K⁺ has to be replaced by Na⁺ in order to readily leave the channels [5]. However, after

repeatedly pulsing in NMG solutions, it could be that part of the stability could also come from a conformational change that might hinder the loss of the stabilizing

K^+ . To test the latter possibility, immediately after the trace in the middle panel of Fig. 5a was recorded, the cell was superfused again with NMG_o , and 20 pulses were delivered (in NMG_o/NMG_i). Then, the cell was placed in Na_o/NMG_i , and another 20 pulses were applied (not shown). Finally, the cell was superfused back with K_o , and channel activity was tested. There was a significant drop of G_K (right panel). The left lower panel illustrates the recovery of G_K after a 3 min depolarization to 0 mV. Fig. 5b shows the average of four experiments as in Fig. 5a. In conclusion, it may be said that after extensively pulsing in NMG solutions, Shaker channels remain in a conformation from which the stabilizing K^+ is readily lost, as soon as there is Na^+ in the 0 K^+ solutions, and the channels are gated (see "Discussion").

Discussion

The Shab conductance is rather stable with K^+ -containing solutions on only one side of the membrane; however, its stability is slightly bigger with K^+ outside than inside the cell. On the other hand, G_K drops strikingly upon brief exposure to 0 K^+ on both sides of the membrane.

We have several hypotheses:

1. There are two sites where K^+ keeps G_K stable: one internal and the other(s) located outside the selectivity filter. The external site(s) explain(s) the readiness with which G_K is lost in 0 K^+ and 0 Na^+ solutions, with the channels closed at -80 mV. At a location external to the selectivity filter, the stabilizing K^+ ions would not be held in place by the negative voltage, or by any physical barrier that could be posed by the closed conformation of the channels, and further, they could leave the channels without having to be replaced by other suitable ions, such as Na^+ ions, as could be the case if they were bounded to the selectivity filter (e.g., 5., below). The observation that the extent of drop of G_K without opening the channels is similar to that observed when the channels are opened in 0 K^+ also supports this hypothesis.

The hypothesis of internal K^+ site(s) is supported by the following observations:

- (a) G_K is much more stable in Na_o/K_i than in Na_o/Na_i , so internal K^+ alone yields a substantial stability
- (b) Two micromolar K^+_o did not change the rate of decline of G_K observed with only Na_o/K_i (i.e., G_K did not reach the stability observed in K_o/Na_i), indicating that the affinity of the external site for K^+ is low (affinity > 2 mM). Therefore, if the stability in Na_o/K_i were afforded by the leakage of internal K^+ to the external site(s), the leak should build $[K^+_o]$ above 2 mM, which, in the absence of factors that could restrict the

diffusion of ions, seems unlikely. Shab presents gating currents, under conditions that rapidly drop G_K [8], and so by analogy with Shaker, we further hypothesize that:

2. After exposure to 0 K^+ , Shab can move among closed (non-inactivated) states but without being able to finally conduct, as Shaker channels do [4]. Finally, considering the fact that the addition of K^+ (2 mM) to the external solution did not recover the current lost after recording in Na_o/K_i , we propose that:
3. The slow decline of G_K with K^+ present on only the internal side of the membrane (Na_o/K_i) may be due to a mechanism similar to that by which G_K drops rapidly with 0 K^+ on both sides of the membrane (Na_o/Na_i). Finally, regarding Shaker channels, we have shown that even after numerous pulses in NMG^+ solutions, the Shaker G_K still collapses as soon as there is Na^+ , and the pulses are delivered. Taking into account the fact that the rate of entry into slow (C-type) inactivation is faster in NMG^+ than in either Na^+ or K^+ external solutions [13], we propose that:
4. After having pulsed in NMG^+ solutions, the Shaker G_K probably collapses from the C-inactivated state.

Several features of the response of Shab to 0 K^+ solutions depart markedly from that of Shaker channels [e.g. 4-6, 14-16, 18, 19]:

1. Shab G_K drops rapidly in 0 K^+ while the channels are kept closed at the holding potential of -80 mV. In contrast, Shaker channels are stable in 0 K^+ solutions as long as they are not gated by the delivery of activating pulses (i.e., as long as they are kept closed at the holding potential).
2. The Shaker G_K is quite stable in 0 K^+ solutions lacking Na^+ ions, whereas Shab G_K drops rapidly, regardless of the Na^+ content of the 0 K^+ solutions.
3. The drop in Shab G_K cannot be reverted by adding back K^+ ions to the external solution nor by changes of the membrane potential (i.e., it seems that the fall of G_K is irreversible). In contrast, the Shaker G_K is recovered by prolonged depolarizations.
4. Regarding the stability of the conductance in K^+ containing solutions, in Na_o/K_i the Shaker G_K is stable for at least 1 h, whereas the Shab G_K drops slowly with the time of recording (approximately a 20% drop in 25 min).
5. There are no significant (measurable) Na^+ currents through Shab channels in 0 K^+ , whereas Shaker channels conduct small but measurable Na^+ currents, both from the open and the C-type inactivation states.

Shab also differs from the mammalian Shaker-related Kv1.4 channels, where conductance drops and then recovers upon removal and re-addition of only the extracellular K^+ respectively [9, 17].

On the other hand, the behavior of Shab in 0 K⁺ seems to be similar to that of the squid K⁺ channel [1], although it seems that there are some differences in their corresponding responses (e.g., Shab G_K seems to decline faster than that of the squid channel, and Shab continues to gate in response to membrane depolarizations [8]). Recent experiments by the group of Armstrong using intracellular TEA indicate that in the squid channels, the stabilizing K⁺ is externally located [10]; it remains to be determined if the same applies to Shab.

Regarding ion conduction, in contrast to Kv2.1 and to Shaker A463C, the Shab channels do not appreciably conduct Na⁺ in 0 K⁺ but, under the same conditions, they present a measurable G_{CS} . This suggests that the absence of an assessable Na⁺ current might not be due to the permanence of tightly bounded K⁺ ions in the pore of the channels (i.e., may not be due to a very high affinity of the pore for K⁺). One possibility is that I_{Na} may be smaller than I_{CS} , and that this fact added to the drop of the conductance impeded its detection. Additionally, it could be that other residues besides those of the selectivity filter and of the 463 position determine the ability of Shab to conduct Na⁺.

Acknowledgements This work was supported by CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) 40690-Q and DGPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) grants IN216503 and IX224704.

References

- Almers W, Armstrong CM (1980) Survival of K⁺ permeability and gating currents in squid axons perfused with K⁺-free media. *J Gen Physiol* 75:61–78
- Block BM, Jones SW (1997) Delayed rectifier current of bullfrog sympathetic neurons: ion-ion competition, asymmetrical block and effects of ions on gating. *J Physiol* 499:403–416
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner A, Kuo JM, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69–76
- Gomez-Lagunas F (1997) Shaker B K⁺ conductance in Na⁺ solutions lacking K⁺ ions: a remarkably stable non-conducting state produced by membrane depolarizations. *J Physiol* 449:3–15
- Gomez-Lagunas F (2001) Na⁺ interaction with the pore of Shaker B K⁺ channels: zero and low K⁺ conditions. *J Gen Physiol* 118:639–648
- Gomez-Lagunas F, Batista CVF, Olamendi-Portugal T, Ramirez-Dominguez ME, Possani LD (2004) Inhibition of the collapse of the Shaker K⁺ conductance by specific scorpion toxins. *J Gen Physiol* 123:265–279
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 66:1061–1067
- Islas LD, Sigworth FJ (1999) Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *J Gen Physiol* 114:723–741
- Jäger H, Rauer H, Nguyen AN, Aiyar J, Chandy KG, Grissmer S (1998) Regulation of mammalian Shaker-related K⁺ channels: evidence for non-conducting closed and non-conducting inactivated states. *J Physiol* 506:291–301
- Khodakhah K, Melishchuk A, Armstrong CM (1997) Killing K channels with TEA⁺. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13335–13338
- Klaiber K, Williams N, Roberts TM, Papazian DM., Jan LY, Miller C (1990) Functional expression of Shaker K⁺ in a baculovirus-infected insect cell line. *Neuron* 5:221–226
- Korn SJ, Ikeda SR (1995) Permeation selectivity by competition in a delayed rectifier potassium channel. *Science* 269:410–412
- López-Barneo J, Hoshi JT, Heinemann SH, Aldrich RW (1993) Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker K channels. *Receptor Channel* 1:61–71
- Melishchuk A, Loboda A, Armstrong CM (1998) Loss of Shaker K channel conductance in 0 K⁺ solutions: role of the voltage sensor. *Biophys J* 75:1828–1835
- Loboda A, Melishchuk A, Armstrong CM (2001) Dilated and defunct K channels in the absence of K⁺. *Biophys J* 80:2704–2714
- Ogielska EM, Aldrich RW (1998) A mutation in S6 of Shaker potassium channels decreases K⁺ affinity of an ion binding site revealing ion-ion interactions in the pore. *J Gen Physiol* 112:243–257
- Pardo LA, Heinemann SH, Terlau H, Ludewig U, Lorra C, Pongs O, Stuhmer W (1992) Extracellular K⁺ specifically modulates a rat brain K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2466–2470
- Starkus JG, Kuschel L, Rayner M, Heinemann (1997) Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J Gen Physiol* 110:539–550
- Starkus JG, Heinemann S, Rayner M (2000) Voltage dependence of slow inactivation in Shaker potassium channels results from changes in relative K⁺ and Na⁺ permeabilities. *J Gen Physiol* 115:107–122
- Vergara C, Alvarez O, Latorre R (1999) Localization of the K⁺ lock-in and Ba²⁺ sites in a voltage-gated calcium-modulated channel. Implications for survival of K⁺ permeability. *J Gen Physiol* 114:365–376
- Zhu Y, Ikeda SR (1993) Anomalous permeation of Na⁺ through a putative K⁺ channel in rat cervical ganglion neurons. *J Physiol* 468:441–461
- Zhuren W, Xue Z, Fedida D (2000). Regulation of transient Na⁺ conductance by intra- and extracellular K⁺ in the human delayed rectifier K⁺ channel Kv1.5. *J Physiol* 523:575–591

BIBLIOGRAFÍA

1. Aggarwal SK, MacKinnon R. 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K channel. *Neuron*. 16:1169-1177.
2. Ahern CA, Horn R. 2004. Specificity of charge-carrying residues in the voltage sensor of potassium channels. *J Gen Physiol*. 123:205-216.
3. Almers W, Armstrong CM. 1980. Survival of K⁺ permeability and gating currents in squid axons perfused with K⁺-free media. *J Gen Physiol*. 75:61-78.
4. Ambriz-Rivas M, Islas LD, Gomez-Lagunas F. 2005. K⁺-dependent stability and ion conduction of Shab K⁺ channels: a comparison with Shaker channels. *Pflugers Arch*. 450:255-261.
5. Armstrong C M. 1975. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys*. 7:179-210.
6. Armstrong CM, Bezanilla F. 1973. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*. 242:459-461.
7. Armstrong CM, Binstock L. 1965. Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J Gen Physiol*. 48:859-872.
8. Armstrong CM, Matteson DR. 1986. The role of calcium ions in the closing of K channels. *J Gen Physiol*. 87:817-832.
9. Armstrong CM. 1971. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J Gen Physiol*. 58:413-437.
10. Armstrong CM. 2003. Voltage-gated K channels. *Sci STKE*. 188: re10.
11. Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. 1994. The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 202:586-605.
12. Baculovirus expression vector system manual, sixth edition. 1999. Farmingen. San Diego, CA, USA. pp 2, 22.
13. Baukowitz T, Yellen G. 1995. Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron*. 15:951-960.
14. Bezanilla F, Armstrong CM. 1972. Negative conductance caused by the entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J Gen Physiol*. 60:588-608.
15. Bezanilla F, Roux B. 2004. Mechanism of voltage sensor operation in voltage-dependent channels. *Biophys J*. 86:522a-522a.
16. Bezanilla F. 2002. Perspective: Voltage sensor movements. *J Gen Physiol*. 120:465-473.

17. Bezanilla F. 2005. Voltage-gated ion channels. *IEEE Trans Nanobioscience*. 4:34-48.
18. Block BM, Jones SW. 1997. Delayed rectifier current of bullfrog sympathetic neurons: ion-ion competition, asymmetrical block and effects of ions on gating. *J Physiol*. 499:403-416.
19. Brock MW, Lebaric ZN, Neumeister H, DeTomaso A, Gilly WF. 2001. Temperature-dependent expression of a squid Kv1 channel in Sf9 cells and functional comparison with the native delayed rectifier. *J Membr Biol*. 180:147-161.
20. Butler A, Wei A, Salkoff L. 1990. Shal, Shab, and Shaw: three genes encoding potassium channels in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*. 18:2173-2174.
21. Butler A, Wei AG, Baker K, Salkoff L. 1989. A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science*. 243:943-947.
22. Callahan MJ, Korn SJ. 1994. Permeation of Na⁺ through a delayed rectifier K⁺ channel in chick dorsal root ganglion neurons. *J Gen Physiol*. 104:747-771.
23. Catterall WA. 1986. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem*. 55:953-985.
24. Chandler WK, Meves H. 1970. Sodium and potassium currents in squid axons perfused with fluoride solutions. *J Gen Physiol*. 211:623-652.
25. Chandy KG, Gutman GA. 1993. Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci*. 14:434.
26. Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. 1999. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann NY Acad Sci*. 868:233-285.
27. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci*. 25:147-150.
28. Decher N, Chen J, Sanguinetti MC. 2004. Voltage-dependent gating of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated pacemaker channels. Molecular coupling between the S4-S5 and C-linkers. *J Biol Chem*. 279:13859-13865.
29. del Camino D, Holmgren M, Liu Y, Yellen G. 2000. Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature*. 403:321-325.
30. del Camino D, Yellen G. 2001. Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K⁺ channel. *Neuron*. 32:649-656.
31. Domingo DL, Trowbridge IS. 1988. Characterization of the human transferrin receptor produced in a baculovirus expression system. *J Biol Chem*. 263:13386-13392.

32. Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner A, Kuo JM, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 280:69-76.
33. Durell SR, Guy HR. 1992. Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. *Biophys J*. 62:238-250.
34. Durell SR, Shrivastava IH, Guy HR. 2004. Models of the structure and voltage-gating mechanism of the Shaker K channel. *Biophys J*. 87:2116-2130.
35. Fedida D, Maruoka ND, Lin S. 1999. Modulation of slow inactivation in human cardiac Kv1.5 channels by extra- and intra-cellular permeant cations. *J Physiol*. 515:315-329.
36. Frech GC, VanDongen AM, Schuster G, Brown AM, Joho RH. 1989. A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature*. 340:642-645.
37. Gandhi CS, Isacoff EY. 2002. Molecular models of voltage sensing. *J Gen Physiol*. 120:455-463.
38. Gardner P. 1990. Patch clamp studies of lymphocyte activation. *Annu Rev Immunol*. 8:231-252.
39. George ST, Arbabian MA, Ruoho AE, Kiely J, Malbon CC. 1989. High-efficiency expression of mammalian beta-adrenergic receptors in baculovirus-infected insect cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 163:1265-1269.
40. Gomez-Lagunas F, Armstrong CM. 1994. The relation between ion permeation and recovery from inactivation of ShakerB K⁺ channels. *Biophys J*. 67:1806-1815.
41. Gomez-Lagunas F, Batista CVF, Olamendi-Portugal T, Ramirez-Dominguez ME, Possani LD. 2004. Inhibition of the collapse of the Shaker K⁺ conductance by specific scorpion toxins. *J Gen Physiol*. 123:265-279.
42. Gomez-Lagunas F. 1997. Shaker B K⁺ conductance in Na⁺ solutions lacking K⁺ ions: a remarkably stable non-conducting state produced by membrane depolarizations. *J Physiol*. 499:3-15.
43. Gómez-Lagunas F. 1999. Barium inhibition of the collapse of the Shaker K⁺ conductance in zero K⁺. *Biophys J*. 77:2988-2998.
44. Gomez-Lagunas F. 2001. Na⁺ interaction with the pore of Shaker B K⁺ channels: zero and low K⁺ conditions. *J Gen Physiol*. 118:639-648.
45. Greenfield C, Patel G, Clark S, Jones N, Waterfield MD. 1988. Expression of the human EGF receptor with ligand-stimulatable kinase activity in insect cells using a baculovirus vector. *EMBO J*. 7:139-146.

46. Grissmer S, Cahalan M. 1989. TEA prevents inactivation while blocking open K channels in human T lymphocytes. *Biophys J.* 55:203-206.
47. Gubitosi-Klug RA, Yu SP, Choi DW, Gross RW. 1995. Concomitant acceleration of the activation and inactivation kinetics of the human delayed rectifier K⁺ channel Kv1.1 by Ca(2⁺)-independent phospholipase A2. *J Biol Chem.* 270:2885-2888.
48. Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. 2000. Structure of the cytoplasmic subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. *Science.* 289:123-127.
49. Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS. 2003. International union of pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: Potassium channels. *Pharmacol Rev.* 55:583-586.
50. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuehmer W, Wang X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57:473-508.
51. Hagiwara S, Saito N. 1959. Voltage-current relations in nerve cell membrane of onchidium verruculatum. *J Physiol.* 148:161-179.
52. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.
53. Harrap KA. 1972. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The inclusion body. *Virology.* 50:114-123.
54. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. 1994. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J.* 66:1061-1067.
55. Hille B, Schwarz W. 1978. Potassium channels as multi-ion single-file pores. *J Gen Physiol.* 72:409-442.
56. Hille B. 2001. Ionic Channels of excitable membranes 3rd edn. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA, USA.
57. Hink WF, Thomsen DR, Davidson DJ, Meyer AL, Castellino FJ. 1991. Expression of three recombinant proteins using baculovirus vectors in 23 insect cell lines. *Biotechnol Prog.* 7:9-14.

58. Hladky SB, Haydon DA. 1972. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin a. I. studies of the unit conductance channel. *Biochim Biophys Acta*. 274:294-312.
59. Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol*. 116:424-448.
60. Hodgkin AL, Huxley AF. 1952a. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 117:500-544.
61. Hodgkin AL, Huxley AF. 1952b. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol*. 116:449-472.
62. Hodgkin AL, Keynes RD. 1955. The potassium permeability of a giant nerve fiber. *J Physiol*. 128:61-88.
63. Holmgren M, Shin KS, Yellen G. 1998. The activation gate of a voltage-gated K⁺ channel can be trapped in the open state by an intersubunit metal bridge. *Neuron*. 21:617-621.
64. Holmgren M, Smith PL, Yellen G. 1997. Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K⁺ channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating. *J Gen Physiol*. 109:527-535.
65. Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. 1990. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*. 250:533-538.
66. Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. 1991. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*. 7:547-556 .
67. Ignoffo CM. 1975. Baculoviruses for Insect Pest Control: Safety Considerations. American Society for Microbiology, Washington, DC.
68. Ikeda SR, Korn SJ. 1995. Influence of permeating ions on potassium channel block by tetraethylammonium. *J Physiol*. 486:267-272.
69. Immke D, Laszlo K, LoTurco J, Korn SJ. 1998. Influence of non-P region domains on selectivity filter properties in voltage gated K⁺ channels. *Receptors Channels*. 6:179-188.
70. Islas LD, Sigworth FJ. 1999. Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *J Gen Physiol*. 114:723-742.
71. Jäger H, Rauerh H, Nguyen A, Aiyar J, Chandy KG, and Grissmer S. 1998. Regulation of mammalian Shaker-related K⁺ channels: evidence for non-conducting closed and non-conducting inactivated states. *J Physiol*. 506:291-301.

72. Jerng HH, Gilly WF. 2002. Inactivation and Pharmacological Properties of sqKv1A Homotetramers in *Xenopus* Oocytes Cannot Account for Behavior of the Squid "Delayed Rectifier" K⁺ Conductance. *Biophys J.* 82:3022-3036.
73. Jerng HH, Covarrubias M. 1997. K⁺ channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys J.* 72:163-174.
74. Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002a. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature.* 417:515-522.
75. Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002b. The open pore conformation of potassium channels. *Nature.* 417:523-526.
76. Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K channel. *Nature.* 423:33-41.
77. Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K channel. *Nature.* 423:42-48.
78. Kaji D. 1986. Volume-sensitive K transport in human erythrocytes. *J Gen Physiol.* 88:719-738.
79. Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA. 1987. Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell.* 50:405-413.
80. Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ, Naismith AL, Sun SZ, Ackerley CA, Reyes EF, Tsui LC, Rommens JM, Bear CE. 1991. Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell.* 64:681-691.
81. Keynes RD, Rojas E. 1974. Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J Physiol.* 239:393-434.
82. Khodakhah K, Melishchuk A, Armstrong CM. 1997. Killing K⁺ channels with TEA⁺. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:13335-13338.
83. Kidd IM, Emery VC. 1993. The use of baculoviruses as expression vectors. *Appl Biochem Biotechnol.* 42:137-159.
84. Klaiber K, Williams N, Roberts TM, Papazian DM, Jan LY, Miller C. 1990. Functional expression of Shaker K⁺ in a baculovirus-infected insect cell line. *Neuron.* 5:221-226.
85. Klemic KG, Kirsch GE, Jones SW. 2001. U-type inactivation of Kv3.1 and Shaker potassium channels. *Biophys J.* 81:814-826.
86. Klemic KG, Shieh CC, Kirsch GE, Jones SW. 1998. Inactivation of Kv2.1 potassium channels. *Biophys J.* 74:1779-1789.

87. Kool M, Vlak JM. 1993. The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Arch Virol.* 130:1-16.
88. Korn SJ, Ikeda SR. 1995. Permeation selectivity by competition in a delayed rectifier potassium channel. *Science.* 269:410-412.
89. Korn SJ, Trapani JG. 2005. Potassium channels. *IEEE Trans Nanobioscience.* 4:21-33.
90. Larsson HP, Baker OS, Dhillon DS, Isacoff EY. 1996. Transmembrane movement of the Shaker K⁺ channel S4. *Neuron.* 16:387-397.
91. Levy DI, Deutsch C. 1996. Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys J.* 70:798-805.
92. Li M, Jan YN, Jan LY. 1992. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science.* 257:1225-1230.
93. Liu Y, Holmgren M, Jurman ME, Yellen G. 1997. Gated access to the pore of a voltage-dependent K⁺ channel. *Neuron.* 19:175-184.
94. Liu Y, Jurman ME, Yellen G. 1996. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K channel during gating. *Neuron.* 16:859-867.
95. Loboda A, Melishchuk A, Armstrong C. 2001. Dilated and defunct K channels in the absence of K⁺. *Biophys J.* 80:2704-2714.
96. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. 2005a. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science.* 309:897-903.
97. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. 2005b. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science.* 309:903-908.
98. Longworth JL. 1983. A Critical Appraisal of Virus Taxonomy. CRC Press, Boca Raton, FL, p.123.
99. Loots E, Isacoff EY. 1998. Protein rearrangements underlying slow inactivation of the Shaker K channel. *J Gen Physiol.* 112:377-389.
100. Lopez-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. 1993. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels.* 1:61-71.
101. Lu Z, Klem AM, Ramu Y. 2001. Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature.* 413:809-813.
102. Lu Z, Klem AM, Ramu Y. 2002. Coupling between voltage sensors and activation gate in voltagegated K channels. *J Gen Physiol.* 120:663-676.

103. Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol.* 67:4566-4579.
104. MacKinnon R, Yellen G. 1990. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K channels. *Science.* 250:276-279.
105. MacKinnon R. 1991. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature.* 350:232-235.
106. MacKinnon R. 2003. Potassium channels. *FEBS Lett.* 555:62-65.
107. Matteson DR, Swenson RP. 1986. External monovalent cations that impede the closing of K channels. *J Gen Physiol.* 87:795-816.
108. Matthews REF. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology.* 17:1-199.
109. Melishchuk A, Loboda A, Armstrong CM. 1998. Loss of Shaker K channel conductance in 0 K⁺ solutions: role of the voltage sensor. *Biophys J.* 75:1828-1835.
110. Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJ. 2000. Investigation of the molecular assembly of beta-cell K(ATP) channels. *FEBS Lett.* 482:59-64.
111. Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. 2001. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature.* 414:37-42.
112. Murrell-Lagnado RD, Aldrich RW . 1993b. Energetics of Shaker K⁺ channels block by inactivation peptides. *J Gen Physiol.* 102:977-1003.
113. Murrell-Lagnado RD, Aldrich RW. 1993a. Interactions of amino terminal domains of Shaker K channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. *J Gen Physiol.* 102:949-975.
114. Muto S. 2001. Potassium transport in the mammalian collecting duct. *Physiol Rev.* 81:85-116.
115. Nakamura Y, Nakajima S, Grundfest H. 1965. The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons. *J Gen Physiol.* 48:985-996.
116. Narahashi T, Moore JW, Scott WR. 1964. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J Gen Physiol.* 47:965-974.
117. O'Reilly D, Miller LK, Luckow VA. 1992. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. WH Freeman and Company, New York, NY.

118. Ogielska EM, Aldrich RW. 1998. A mutation in S6 of Shaker potassium channels decreases K⁺ affinity of an ion binding site revealing ion-ion interactions in the pore. *J Gen Physiol.* 112:243-257.
119. Ortega-Saenz P, Pardal R, Castellano A, Lopez-Barneo J. 2000. Collapse of conductance is prevented by a glutamate residue conserved in voltage-dependent K⁺ channels. *J Gen Physiol.* 116:181-190.
120. Panyi G, Sheng Z, Deutsch C. 1995. C-type inactivation of a voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J.* 69:896-903.
121. Pardo LA, Heinemann SH, Terlau H, Ludewig U, Lorra C, Pongs O, Stuhmer W. 1992. Extracellular K⁺ specifically modulates a rat brain K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:2466-2470.
122. Perozo E, MacKinnon R, Bezanilla F, Stefani E. 1993. Gating currents from a nonconducting mutant reveal open-closed conformations in Shaker K⁺ channels. *Neuron.* 11:353-358.
123. Pongs O, Kecskemethy N, Muller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, and Ferrus A. 1988. Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of Drosophila. *EMBO J.* 7:1087-1096.
124. Rasmusson RL, Morales MJ, Castellino RC, Zhang Y, Campbell DL, Strauss HC. 1995. C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K⁺ channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 489:709-21.
125. Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O. 1994. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature.* 369:289-94.
126. Rosenthal JJC, Liu TI, Gilly WF. 1997. A family of delayed rectifier Kv1 cDNAs showing cell type-specific expression in the squid stellate ganglion/giant fiber lobe complex. *J Neurosci.* 17:5070-5079.
127. Rosenthal JJC, Vickery RG, Gilly WF. 1996. Molecular identification of sqKv1A: a candidate for the delayed rectifier K⁺ channel in squid giant axon. *J Gen Physiol.* 108:207-219.
128. Roux B. 2005. Ion conduction and selectivity in K⁺ channels. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 34:153-171.
129. Salvador C, Mora SI, Ordaz B, Antaramian A, Vaca L, Escobar LI. 2003. Basal activity of GIRK5 isoforms. *Life Sci.* 72:1509-1518.

130. Schneider MF, Chandler WK. 1973. Voltage-dependent charge movement of skeletal muscle, a possible step in excitation contraction coupling. *Nature*. 242:244-246.
131. Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. 1992. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science*. 255:1712-1715.
132. Schwalbe RA, Wingo CS, Xia SL. 2002. Mutations in the putative pore-forming segment favor short-lived wild-type Kir2.1 pore conformations. *Biochemistry*. 41:12457-12466.
133. Seoh SA, Sigg D, Papazian DM, Bezanilla F. 1996. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K channel. *Neuron*. 16:1159-1167.
134. Shen NV, Pfaffinger PJ. 1995. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K channel subunit proteins. *Neuron*. 14:625-633.
135. Smith GE, Ju G, Ericson BL, Moschera J, Lahm HW, Chizzonite R, Summers MD. 1985. Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:8404-8408.
136. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol*. 3:2156-2165.
137. Starace DM, Bezanilla F. 2004. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*. 427:548-552.
138. Starkus JG, Heinemann S, Rayner M. 2000. Voltage dependence of slow inactivation in Shaker potassium channels results from changes in relative K⁺ and Na⁺ permeabilities. *J Gen Physiol*. 115:107-122.
139. Starkus JG, Kuschel L, Rayner M, Heinemann. 1997. Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J Gen Physiol*. 110:539-550.
140. Summers MD, Anderson DL. 1972. Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed, double-stranded molecule. *J Virol*. 9:710-713.
141. Summers MD, Smith GE. 1987. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555, Texas A&M University.
142. Swenson RP, Armstrong CM. 1981. K⁺ channels close more slowly in the presence of external K⁺ and Rb⁺. *Nature*. 291:427-429.
143. Tazawa M, Sutou E, Shibasaka M. 2001. Onion root water transport sensitive to water channel and K⁺ channel inhibitors. *Plant Cell Physiol*. 42:28-36.

144. Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, Jan YN, Jan LY. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science*. 237:770-775.
145. Thompson JD, Higgins DG, Gibson, TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22:4673-4680.
146. Tristani-Firouzi M, Chen J, Sanguinetti MC. 2002. Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating in HERG K⁺ channels. *J Biol Chem*. 277:18994-19000.
147. Tsunoda S, Salkoff L. 1995. Genetic analysis of *Drosophila* neurons: Shal Shaw and Shab encode most embryonic potassium currents. *J Neurosci*. 15:1741-1754.
148. Van Driessche W, Zeiske W. 1985. Ionic channels in epithelial cell membranes. *Physiol Rev*. 65:833-903.
149. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*. 13:213-217.
150. Wang Z, Zhang X, Fedida D. 2000. Regulation of transient Na⁺ conductance by intra- and extracellular K⁺ in the human delayed rectifier K⁺ channel Kv1.5. *J Physiol*. 523:575-591.
151. Yellen G, Sodickson D, Chen TY, Jurman ME. 1994. An engineered cysteine in the external mouth of a K channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J*. 66:1068-075.
152. Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. 1990. Restoration of inactivation in mutants of Shaker K⁺ channels by a peptide derived from ShB. *Science*. 250:568-571.
153. Zhou Y, Morais Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. 2001a. Chemistry of ion hydration and coordination revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0Å resolution. *Nature*. 414:43-48.
154. Zhou Y, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. 2001b. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature*. 411:657-661.
155. Zhu Y, Ikeda SR. 1993. Anomalous permeation of Na⁺ through a putative K⁺ channel in rat superior cervical ganglion neurones. *J Physiol*. 468:441-461.