



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOFÍSICA

**ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS DETERMINANTES MOLECULARES  
DE LA INACTIVACIÓN Y LA SELECTIVIDAD DEL PORO DE  
CANALES DE K<sup>+</sup>.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA: ELISA CARRILLO FLORES

TUTOR: FROYLÁN GÓMEZ LAGUNAS (FACULTAD DE MEDICINA-UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DR. LEÓN D. ISLAS SUAREZ (FACULTAD DE MEDICINA-UNAM)

DR. RICARDO FELÍX GRIJALVA (CINVESTAV)

MÉXICO, D.F. OCTUBRE DE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

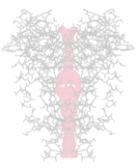


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.



**AGRADEZCO EL APOYO APORTADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) A TRAVÉS DE LA BECA QUE RECIBÍ DURANTE MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO (CON NÚMERO: 202101, REGISTRO: 209720).**

**AGRADEZCO AL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS POR EL APOYO ATORGADO MEDIANTE EL PROYECTO: MEJORA DE LA TASA DE GRADUACIÓN.**

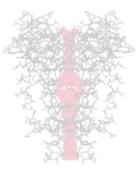
**ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR LOS DONATIVOS: CONACYT 153504 Y DGAPA-UNAM IN229712.**

2

**EL TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOFISICA DE CANALES IÓNICOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, A CARGO DEL DR. FROYLÁN GÓMEZ LAGUNAS.**

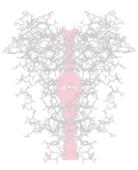
**AGRADEZCO A MI COMITÉ TUTOR POR EL APOYO A ESTE TRABAJO: DR. FROYLÁN GÓMEZ LAGUNAS, DR. LEÓN D. ISLAS SUÁREZ Y AL DR. RICARDO FELIX GRIJALVA.**

**AGRADEZCO A LOS MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN: DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA, DR. FROYLÁN GÓMEZ LAGUNAS, DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ, DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ Y AL DR. AGUSTÍN GUERRERO HERNÁNDEZ.**



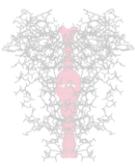
## Índice

Abreviaturas	4
Resumen	5
Abstract	7
Introducción	9
Canales de Potasio (K <sup>+</sup> )	10
Estructura de canales de K <sup>+</sup>	10
Estructura de canales de K <sup>+</sup> activados por voltaje	12
Principales dominios funcionales de los canales de K <sup>+</sup>	14
Selectividad de canales de K <sup>+</sup>	18
Mecanismos de la selectividad de canales de K <sup>+</sup>	20
Mecanismos de Gating	21
Activación de los canales de K <sup>+</sup> dependientes del voltaje	21
Mecanismos de apertura	21
Inactivación de canales de K <sup>+</sup>	22
Canales de K <sup>+</sup> de <i>Drosophila melanogaster</i>	29
Antecedentes	32
Objetivo General	36
Hipótesis	36
Objetivos particulares	36
Métodos	37
Resultados	39
Selectividad de Shab	39
Caracterización de la inactivación de Shab	44
Inactivación tipo U	46
La inactivación de Shab no es tipo C	49
Inactivación de estados cerrados	52
Inhibición de la inactivación por el bloqueador intracelular Quinidina	54
Recuperación de la inactivación.	56
Modelo cinético de la inactivación de Shab.	61
Efecto del K <sup>+</sup> intracelular en la inactivación.	63
K <sub>i</sub> <sup>+</sup> normal en la inactivación.	67
Discusión	68
Conclusiones	77
Bibliografía	78



### **Abreviaturas**

<b>X TM</b>	X segmentos transmembranales
<b>CI</b>	Inactivación de estados cerrados
<b>COX1</b>	Ciclooxigenasa 1
<b>COX2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>HP</b>	Potencial de sostenimiento
<b>OI</b>	Inactivación de estado abierto
<b>Qd</b>	Quinidina
<b>TEA<sup>+</sup></b>	Tetraetilamonio

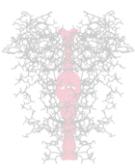


## Resumen

La familia de canales de  $K^+$  se caracteriza porque sus miembros presentan una gran diversidad tanto en su estructura molecular, como en su cinética y mecanismos de apertura, cierre e inactivación (o “gating”). En contraste a esta diversidad, los canales de  $K^+$  tienen la característica común de ser altamente selectivos al  $K^+$  sobre el  $Na^+$ . La estructura molecular de esta selectividad reside en una secuencia de aminoácidos conservada, conocida como la secuencia característica, la cual forma el filtro de selectividad del poro. Sin embargo pese a que presentan la secuencia característica conservada se conoce que las propiedades de conducción de los canales de  $K^+$  no son uniformes. Las bases moleculares y funcionales de esta variabilidad no se conocen bien. En el presente trabajo presentamos un estudio funcional de los determinantes moleculares de la estabilidad y selectividad de los canales de  $K^+$  tipo Shab. Nuestro interés en este tema proviene del trabajo previo sobre el papel de los iones  $K^+$  en la estabilidad y la selectividad de la conductancia de  $K^+$  ( $G_K$ ) del canal tipo Shaker, donde se ha demostrado que el  $K^+$  es un cofactor crítico indispensable para mantener la estabilidad y la selectividad de la  $G_K$ . Aunado a esto, durante el progreso de este trabajo resultó claro que la comprensión completa de la dinámica del poro requería de un conocimiento básico del mecanismo de la inactivación de Shab. Por lo que en este trabajo también presentamos la primera caracterización del mecanismo de inactivación de Shab, y discutimos dentro de este contexto la función del ion  $K^+$  para mantener la estabilidad y la selectividad de la  $G_K$ .

Los resultados mostraron que:

- 1) Shab es un canal de  $K^+$  típico, presentó una relación de permeabilidad de  $P_{Na}/P_K < 10^{-3}$ , en condiciones bi-iónicas. Sin embargo
- 2) La sustitución iso-osmolar de  $K^+_i$  por  $Cs^+_i$  generó un cambio en la geometría del poro que permitió el paso de  $Cs^+$  y  $Na^+$ . Esta observación no concuerda con el modelo “snug-fit” (la cerradura y la llave) de selectividad; favoreciendo al modelo de ajuste inducido de Koshland como el mecanismo de selectividad.



3) Los iones permeantes inhibieron el colapso de  $G_K$  de Shab, con una potencia que siguió la secuencia:  $K^+ \sim Rb^+ > Cs^+ > NH_4^+ > Na^+$ . Esta secuencia difiere de la selectividad típica de los canales de  $K^+$ , y posiblemente reflejó la selectividad del sitio de unión a  $K^+$  más externo (s1) del poro. Esto provee evidencias empíricas que muestran que los cuatro sitios de unión a  $K^+$  en el poro no son funcionalmente equivalentes.

5) La inactivación lenta de Shab presentó dos constantes de tiempo, del orden de segundos e independientes del voltaje.

6) La inactivación de Shab no fue del tipo U. Mostramos además que la llamada inactivación tipo U de Kv2.1 y otros canales, es un artefacto que resulta del registro de las curvas de activación en condiciones alejadas de la inactivación en estado estacionario.

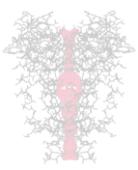
7) En contraste a la inactivación clásica tipo C, la cual se desarrolla solo desde el estado abierto, la inactivación de Shab se desarrolló tanto desde el estado abierto como de los estados cerrados.

8) La inactivación de Shab fue favorecida por  $TEA^+$  y  $K^+$ . Esto contrasta con el efecto de estos iones sobre la inactivación tipo C, en donde inhibe la inactivación. Por lo que se demostró que la inactivación lenta de Shab no es tipo C. De acuerdo con estas conclusiones también encontramos que:

9) El  $K^+_i$  favoreció la inactivación de Shab.

10) La quinidina, un compuesto antiarrítmico, inhibió la inactivación de Shab uniéndose a la cavidad central del poro.

11) En condiciones de  $K^+_i$  fisiológicos, utilizando al  $NH_4^+$  como reportero, se encontró que la selectividad del poro cambia durante la inactivación. Además, otros trabajos son necesarios para correlacionar el cambio de selectividad con la generada por una disminución de la  $[K^+_i]$ .

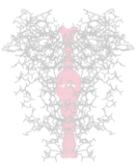


## **Abstract**

K<sup>+</sup> channels are a family of proteins endowed with variable molecular structures, kinetics, and mechanisms of opening, closing and inactivation (collectively termed as gating). In contrast to this variability, K<sup>+</sup> channels have the common characteristic of being highly selective for K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup> ions. The molecular framework of this selectivity resides in a conserved amino-acid sequence, known as the signature sequence, which forms the selectivity filter of the pore. However, in spite of this conserved signature sequence it is known that the conduction properties of K<sup>+</sup> channels are not uniform. The molecular, and functional, basis of this variability is still not well understood. Here we present a functional study of the molecular determinants of the stability and the selectivity of Shab K channels. It is pertinent to mention that our interest on this subject comes from our previous work regarding the role of K<sup>+</sup> ions in the stability and selectivity of the Shaker K<sup>+</sup> conductance ( $G_K$ ), where we demonstrated that K<sup>+</sup> ions are a critical cofactor needed to keep both the stability and the selectivity of Shaker  $G_K$ .

On the other hand, during the progression of the present work we realized that a comprehensive understanding of the pore dynamics required a basic understanding of the mechanism of channels inactivation. Therefore, herein we also present the first characterization of the mechanism of Shab inactivation and discuss it within the context of the role of K<sup>+</sup> ions in keeping the stability and selectivity of  $G_K$ . Here we report that:

- 1) Shab behaves as a typical K<sup>+</sup> channel, since it presents a permeability ratio  $P_{Na}/P_K < 10^{-3}$ , under bi-ionic conditions. Nonetheless:
- 2) The iso-osmolar replacement of internal K<sup>+</sup> by Cs<sup>+</sup> ions generates a change in the pore geometry that allows the passage of both Cs<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> ions. This observation does not agree with the prevailing snug-fit (or lock-and key) model of selectivity, instead it favors the Koshland induced-fit model as the mechanism of selectivity.
- 3) Permeable ions prevent the collapse of the Shab conductance with a potency that follows the sequence: K<sup>+</sup> ~ Rb<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. This sequence differs from the overall selectivity sequence of K channels, and hence it likely reflects the selectivity



of the most external  $K^+$  binding site of the pore or s1. In other words: this result provides empirical evidence showing that the four  $K^+$ -binding sites of the pore are not functionally equivalent.

5) Shab slow inactivation follows a two-exponential time course with voltage-independent time constants.

6) Shab inactivation is not U-type. Moreover, here we demonstrate that, the reported, so called U-type inactivation of Kv2.1 and other  $K^+$  channels is an artifact that results from assessing the inactivation curve in far from steady state conditions.

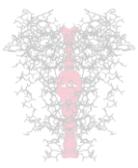
7) In contrast to the classical C-type inactivation, which develops only from the open state, Shab inactivation develops both from the open and closed states.

8) Shab inactivation is facilitated by both  $K^+$  and  $TEA^+$  ions. This is in contrast to C-type inactivation, which indeed it is defined by the inhibitory effect that these ions exert on it. In other words, this observation demonstrates that Shab slow inactivation is not C-type. In agreement with this conclusion we also found that:

9) Internal  $K^+$  also facilitates Shab inactivation.

10) The anti-arrhythmic compound Quinidine inhibits Shab inactivation upon binding to the central cavity of the pore, which suggests that the conformational change associated with inactivation affects the central cavity of the pore.

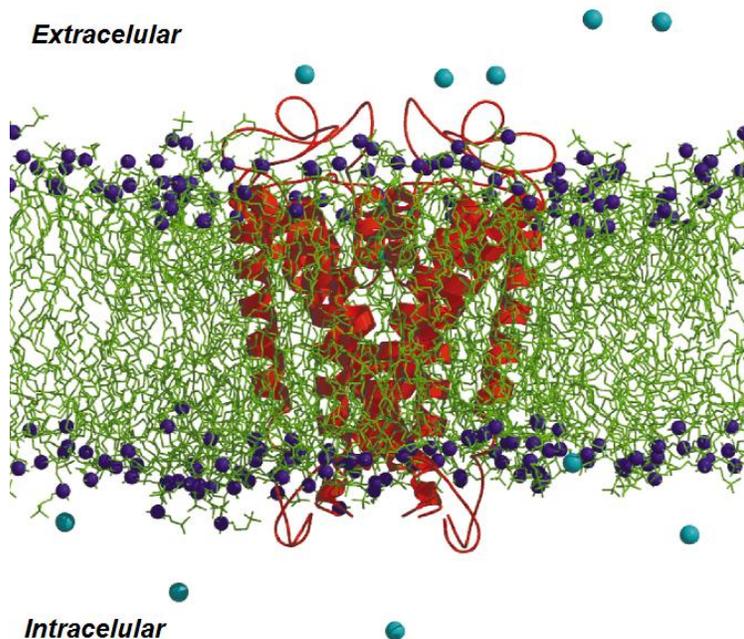
11) With physiological  $[K^+]_i$ , and using  $NH_4^+$  as a reporter ion, it was found that the pore selectivity changes during the onset of inactivation. Further work is needed to correlate this change of selectivity with the one that is triggered by a decrease of the internal  $[K^+]$ .



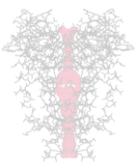
## INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son proteínas de membrana que permiten el flujo de iones a través de la membrana celular, de forma selectiva y a favor de su gradiente electroquímico. Estas proteínas fueron propuestas por Hodgkin y Huxley (1952) como poros o acarreadores selectivos, los cuales participan en la generación y conducción del potencial de acción (el potencial de acción es el resultado del flujo entrante de sodio ( $\text{Na}^+$ ) de manera transitoria, el cual es seguido por el flujo saliente transitorio del ión potasio ( $\text{K}^+$ ), en el axón gigante de calamar) (Hodgkin y Huxley, 1952).

Los canales iónicos generan señales eléctricas a través de las membranas. Existen una gran diversidad de canales iónicos, como: canales de sodio, de potasio, de calcio, de cloro, o no selectivos, y pueden ser activados a través de una diversidad de estímulos, por ejemplo: ligandos, voltaje, etc. (Figura 1). En este caso nos centraremos en los canales de  $\text{K}^+$ .



**Figura 1.** Representación de un canal iónico en la membrana plasmática. Modificado de Sansom et al., 2000.



## **Canales de Potasio ( $K^+$ )**

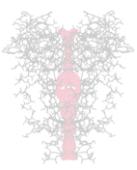
Los canales de  $K^+$  se encuentran presentes en todos los tipos celulares. En el humano existen más de 90 genes que codifican para la subunidad principal de los canales de  $K^+$  llamada subunidad  $\alpha$  (Tian et al., 2014). En las células la regulación de la concentración de potasio intracelular es una función importante para la supervivencia. En el caso de los eucariontes los canales de  $K^+$  participan en una gran diversidad de funciones celulares, como por ejemplo: su participación en vías de señalización, en la regulación de la actividad eléctrica cardíaca, de la frecuencia cardíaca, de la liberación de neurotransmisor, en la secreción de la insulina, en el control de la excitabilidad neuronal, de la contracción de músculo liso, en la regulación del proceso de balance electrolítico y osmótico, en regulación del volumen celular, además de modular la mitogénesis de las células T y B, etc. (Biggin, et al. 2000; Gardner, 1990; Kaji, 1986; Muto, 2001; Tazawa 2001; Tian et al., 2014; Van Driessche y Zeiske, 1985).

El papel principal en las células excitables se encuentra en la repolarización de los potenciales de acción, donde se observa que los canales permiten el flujo de  $K^+$  hacia el medio extracelular, a través de las membranas, y juegan un papel importante en el mantenimiento del potencial de reposo. Las corrientes de estos canales modulan la duración, forma y frecuencia de disparo de los potenciales de acción (Shieh et al., 2000; Tian et al., 2014).

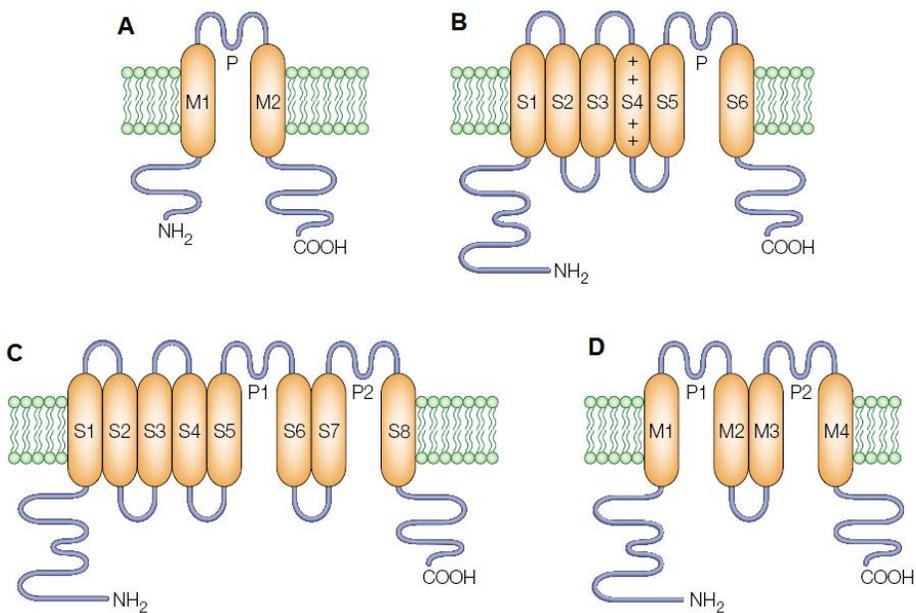
Los canales de  $K^+$  permiten el flujo pasivo de los iones  $K^+$ , a favor de su gradiente electroquímico, a una velocidad de  $10^6$  a  $10^8$  iones por segundo (Hille, 1992).

### *Estructura de canales de $K^+$*

Los canales de potasio presentan una subunidad principal la **subunidad  $\alpha$** , la cual determina la estructura del canal, y subunidades auxiliares llamadas subunidades  $\beta$ , las cuales pueden modificar las propiedades del canal. (Tian et al., 2014; Yellen et al., 2002).

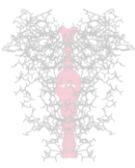


Los canales de  $K^+$ , presentan una arquitectura diversa (Figura 2): existen subunidades de los canales de  $K^+$  que están formados por 2 segmentos transmembranales (2TM, e.g., Kir, KCsA), 4 (4TM, e.g., TWIK), 6 (6TM, e.g., familia Kv, KCNG, eag), 7 (7TM, e.g., BK) y por 8 (8TM, e.g., TOK de levadura) (Choe, 2002; Wei et al., 1996).



**Figura 2.** Estructura de canales de  $K^+$ . A, Canales con 2 segmentos transmembrana; B, canales con 6 segmentos transmembrana; C, canales con 8 segmentos transmembrana; D, canales con 4 segmentos transmembrana. Tomado de Choe, 2002.

La familia de canales de  $K^+$  se caracteriza porque sus miembros presentan una gran diversidad en su estructura molecular, pero también en su cinética y mecanismos de apertura, de cierre y de inactivación (o “gating”), pero todos ellos tienen la característica común, que los define, la de ser altamente selectivos al  $K^+$  (radio iónico de 1.33 Å) sobre el más pequeño (0.95 Å) ión  $Na^+$  (el catión más abundante en el medio extracelular).

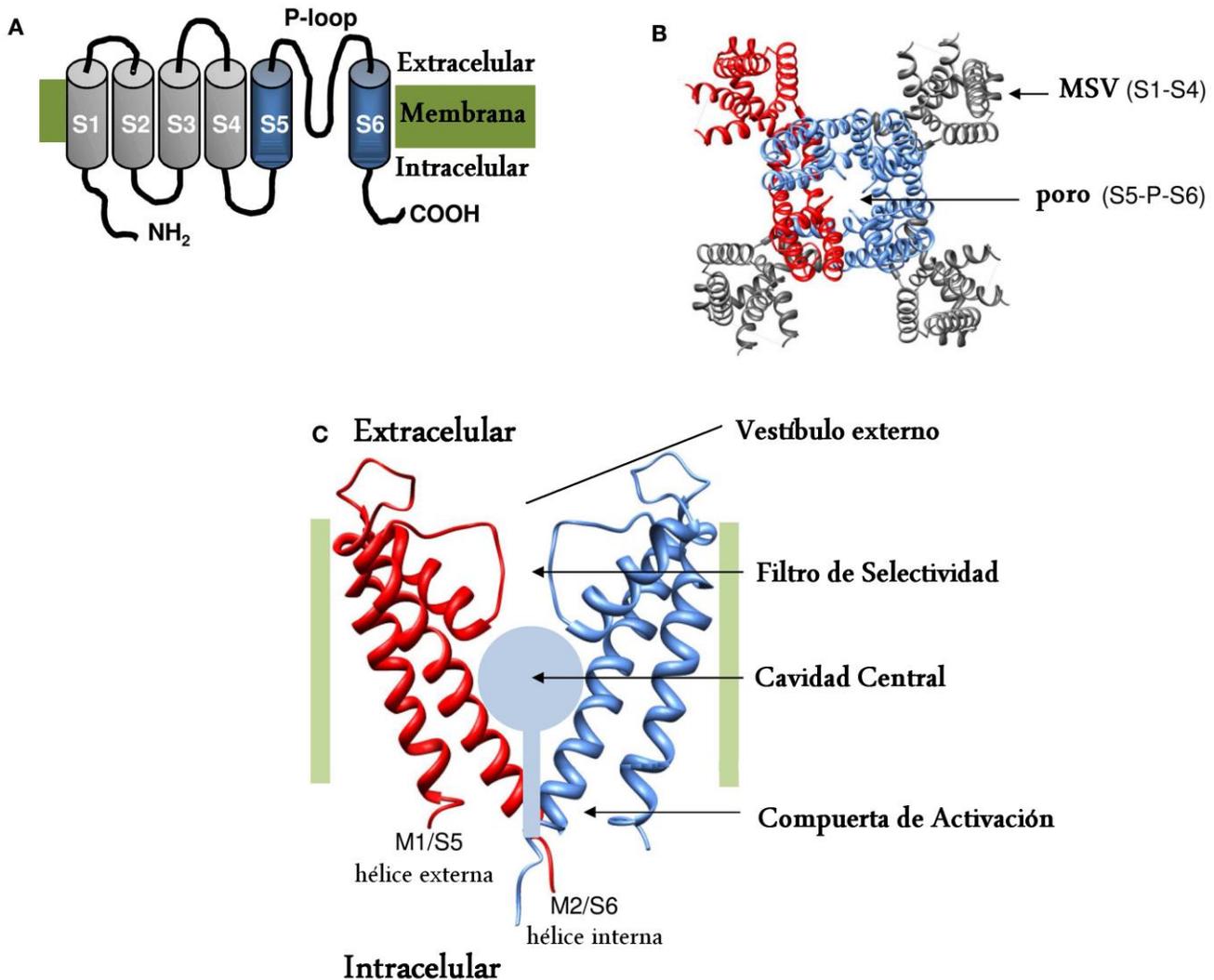
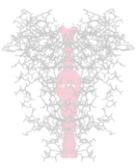


### *Estructura de los canales de $K^+$ activados por voltaje:*

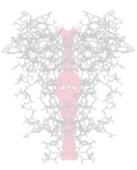
Los canales de potasio activados por voltaje (Kv) representan un gran grupo dentro de la familia de los canales de  $K^+$ , los cuales en humanos son codificados por 40 genes y son divididos en 12 subfamilias. Entre los canales de  $K^+$  humanos se incluyen: Kv1 (KCNA), Kv2 (KCNB), Kv3 (KCNC), Kv4 (KCND), Kv7 (KCNQ, también llamado KQT), Kv8, Kv9, Kv10 (KCNH también llamado EAG), Kv11 y Kv12. En el caso de los canales Kv5, Kv6, Kv8, y Kv9 no son funcionales como homómeros y generalmente se coensamblan con la subunidad Kv2 lo que puede modificar su función (Tian et al., 2014).

Los canales de  $K^+$  activados por voltaje (Kv) están formados por cuatro subunidades  $\alpha$ , que confluyen en el plano de membrana con simetría tetramérica alrededor del poro (Figura 3). Las subunidades  $\alpha$  confieren todas las propiedades funcionales de los canales, además pueden asociarse con subunidades auxiliares, como la subunidad  $\beta$ , las cuales modifican su inactivación (Gómez-Lagunas y Armstrong, 1995; Hille, 2001).

Cada subunidad  $\alpha$  consta de ~500 aminoácidos que forman 6 segmentos transmembranales (6TM), denominados segmentos S1 al S6. Tanto el amino inicial como el carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  son citoplásmicos. El segmento S4 tiene carga positiva neta, por presentar el motivo repetido de un aminoácido básico separado por dos aminoácidos neutros, lo que les permite responder a cambios en el potencial de membrana ( $V_m$ ), constituyendo así el principal componente del llamado sensor de voltaje. El dominio que abre y cierra el poro (compuerta de activación) es un dominio citoplásmico, que ahora se sabe está formado por el cruce del carboxilo terminal de los S6 (Armstrong, 1971; Aggarwal et al., 1996; Bezanilla, 2008; Doyle et al., 1998; Labro y Snyders, 2012; Long et al. 2005; Seoh et al., 1996).

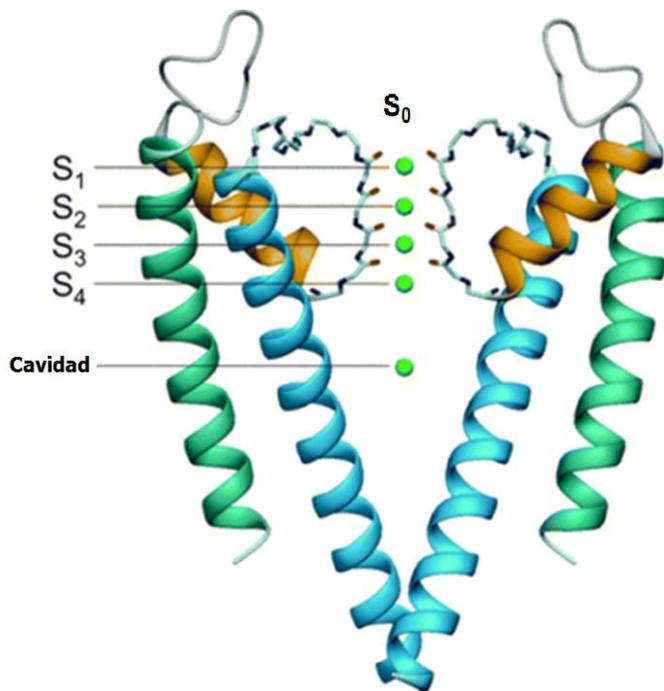


**Figura 3.** Topología de los canales de Kv. A, Los canales Kv cuentan con 6 TM en la subunidad  $\alpha$ , el poro se encuentra formado por los segmentos S5 y S6. B, Los canales Kv son proteínas tetraméricas, aquí se visualiza una imagen 3D del canal Kv2.1, desde arriba. C, poro del canal de 2TM KcsA, el cual fue cristalizado en estado cerrado, donde se muestra el vestíbulo externo, la cavidad central, el vestíbulo interno y el cruce de los segmentos S6, que forman la compuerta de activación. Modificado de Labro y Snyders, 2012.



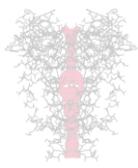
## Principales dominios funcionales de los canales de $K^+$

El poro: está formado por los segmentos transmembranales S5 y S6 conectados por el asa del poro (o asa P). La función de esta región es la de seleccionar y ser la vía de permeación de los iones (Figura 4). El segmento S5 está localizado en la periferia del poro, es una hélice que cruza desde el lado intracelular al lado extracelular y se conecta con una estructura llamada torreta. En el extremo carboxilo terminal de la torreta se encuentra el asa P (de ~ 20 residuos) que consta de 2 partes: a) la hélice del poro, que se extiende de modo entrante hasta un tercio de la longitud de la membrana y b) finalmente vuelve a dirigirse hacia el medio extracelular como una cadena extendida, la cual forma (en la estructura tetramérica del canal) el filtro de selectividad y se caracteriza por ser la porción más estrecha del poro (Doyle et al., 1998).

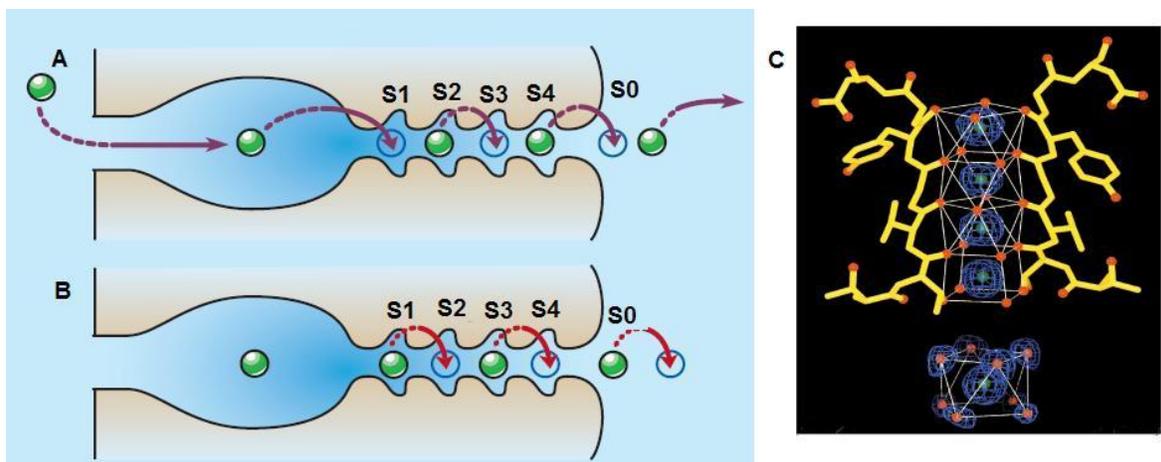


**Figura 4.** Poro del canal KcsA. Las esferas indican iones  $K^+$ , posicionados en los sitios de unión al  $K^+$  (S1, S2, S3, S4). Las hélices internas en azul corresponden a S6, y las externas en verde a S5. Tomado de Hille (2001).

El filtro de selectividad (FS): El FS contiene una secuencia conservada de aminoácidos (TXTVGYGD), denominada secuencia característica de los canales de  $K^+$  (Doyle et al., 1998; Heginbotham et al., 1994). Es una estructura cilíndrica

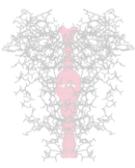


con 3 Å de diámetro en la que se encuentra 4 sitios de unión al  $K^+$ , denominados: s1 al s4, los cuales en condiciones saturantes de  $K^+$  empleadas para la obtención de cristales, están ocupados dos a dos por iones  $K^+$  (i.e., s2 y s4, o s1 y s3; Figura 5 A y 5B), con una molécula de agua entre ellos. Cada ion de  $K^+$  es coordinado por 8 oxígenos de los grupos carbonilos de la cadena principal (Figura 5C) y el  $O_2$  del grupo hidroxilo de la T, los cuales apuntan hacia el lumen del poro; en los sitios de unión al  $K^+$  los iones se encuentran deshidratados. La hélice que forma el filtro de selectividad, finalmente se dirige hacia el medio extracelular como una cadena extendida, la cual formara al segmento S6 que cruza del lado externo al interno (Doyle et al., 1998; Mackinnon, 2003; Roux, 2005; Yellen, 2002; Zhou et al., 2001a).



**Figura 5.** Configuración de la ocupación del poro por el ion  $K^+$  en el Filtro de Selectividad. A, Configuración de la ocupación del poro en S2 y S4. B, Configuración de la ocupación del poro en S1 y S3. C, Coordinación de los 8 oxígenos de los grupos carbonilos en los sitios de unión al  $K^+$ . Tomado de Choe, 2002 y Miller, 2001.

Vestíbulo externo: Éste es una región cóncava que se localiza en el lado extracelular del canal y se encuentra formado por varios residuos de la torreta y del asa P, entre los segmento S5 y S6 (Figura 3). En esta región se localiza el sitio de unión a toxinas y del bloqueador tetraetilamonio ( $TEA^+$ ). En el canal Shaker este sitio de unión se localiza en la posición 449, donde se encuentra una

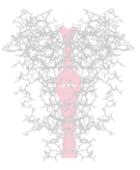


treonina (T), mientras que para el KcsA el residuo se localiza en la posición 82, con el aminoácido tirosina (Y). Además esta región se había propuesto que estaba involucrada en la inactivación tipo C (Hoshi y Armstrong, 2013; MacKinnon y Miller, 1988; MacKinnon et al. 1990; Pascual et al., 1995; Sansom et al., 2002; Shieh et al., 2000; Zhou et al., 2001b; Yellen et al., 1991).

Cavidad central: Está se encuentra inmediatamente después del FS, a la mitad de la membrana, es una cavidad hidrofóbica (~ 10 Å de diámetro), donde existe un ión  $K^+$  hidratado. En esta región se encuentra el sitio de bloqueo del  $TEA^+$  intracelular, de 4-aminopiridina y de quinidina (Choi et al., 1993; Gómez-Lagunas, 2010; Lopez et al., 1994; Roux, 2005; Shieh y Kirsch, 1994; Yeola et al., 1996; Zhou et al, 2001b).

Compuerta de activación: se encuentra en la porción citoplásmica del poro, delimitando a la cavidad central (Figura 3). En esta región se encuentra el cruce de las hélices S6 y forman una barrera al flujo de iones cuando está cerrada. Se ha propuesto que el cruce de las hélices S6, en el Shaker, se localiza en los residuos 478 (valina, V) y 484 (fenilalanina, F); mientras que para el KcsA se localiza en las posiciones 111 a la 114 (alanina, A; treonina, T; triptófano, W; fenilalanina, F). Cabe destacar que la compuerta de activación está bajo control directo del modulo sensor de voltaje (Hackos et al., 2002; Labro y Snyders, 2012; Zhou 2001b).

Sensor de voltaje: Está formado por el segmento S4 y posee residuos con carga positiva cada tercera posición (contiene entre 4 y 8 aminoácidos básicos – argininas o lisinas – cada una separada por residuos hidrofóbicos); este segmento S4 está unido a los segmentos S1-S3 formando el modulo sensor de voltaje (MSV) (Figura 3) (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Bezanilla, 2000; Fedida y Hesketh, 2001; Labro y Snyders, 2012; Seoh et al., 1996). Cada subunidad tiene su propio modulo sensor del voltaje, de tal forma que el poro conductor de  $K^+$  está rodeado de cuatro MSV. El segmento S4 es parcialmente accesible al medio lipídico, pero la



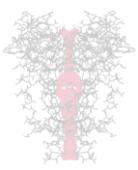
superficie cargada interacciona con otras hélices del MSV (S1-S3). El MSV y el dominio del poro están unidos de manera covalente por el conector S4-S5 (Labro y Snyder, 2012; Long et al., 2005, Long et al., 2007).

La membrana al ser despolarizada genera un cambio conformacional en el segmento S4, cargado positivamente, una vez que los cuatro sensores de voltaje son activados de forma independiente, el poro del canal se abre en un último paso cooperativo (Cha y Bezanilla, 1997; Mannuzzu et al., 1996; Smith-Maxwell et al., 1998; Zagotta et al., 1994).

El movimiento del sensor de voltaje eléctricamente puede ser detectado como corrientes capacitivas no lineales o de gating, las cuales son generadas por el desplazamiento de cargas electrostáticas con respecto al campo eléctrico. La transición de activación se refleja en las corrientes de gating como: la transición de estados cerrados y por el cambio conformacional que ocurre en el sensor de voltaje (Blunck y Batulan., 2012; Perozo et al., 1994).

Las cargas de gating positivas sobre S4 son estabilizadas por cargas aniónicas en S1-S3 alineadas a lo largo de la superficie de S4. Durante la activación, el S4 se mueve permitiendo un cambio conformacional en el sensor de voltaje. Se piensa que el movimiento de S4 es una combinación de: a) una inclinación de la hélice S4 en la membrana, b) una rotación alrededor del eje de la hélice, y c) una traslación pequeña radial y vertical. Estos movimientos desplazan el conector S4-S5 lo cual permite la apertura del poro (Blunck y Batulan., 2012; Labro y Snyder, 2012).

*Dominio de Tetramerización:* La región N-terminal forman una estructura globular citoplásmica (de ~ 130 aminoácidos) que cuelga abajo del poro del canal, denominada dominio T1. Este dominio es el responsable del ensamble correcto del canal tetramérico, es decir que permite solo el ensamble de heterotetrámeros formados por subunidades de la misma familia, además es el sitio de unión de las subunidades  $\beta$  accesorias (Blunck y Batulan., 2012; Gulbis et al., 2000; Li et al., 1992).



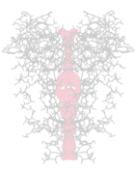
## **Selectividad de canales de $K^+$**

Los canales de  $K^+$  son altamente selectivos al ion  $K^+$  sobre el  $Na^+$ . Sin embargo también existen otros cationes monovalente que pueden permear a través de los canales  $K^+$ , siguiendo la secuencia:  $Tl^+ > K^+ \geq Rb^+ > NH_4^+ \gg Cs^+ \gg Na^+$  (Hille, 2001). En condiciones fisiológicas, la permeabilidad relativa  $P_{Na}/P_K$  es menor a  $10^{-4}$ .

Con base en imágenes cristalográficas del canal bacteriano KcsA se propuso que la región del poro que selecciona al ión  $K^+$  (filtro de selectividad, FS) presenta una estructura rígida (de templado fijo), en la que oxígenos de carbonilos de cadena principal estarían fijamente posicionados en una geometría tal que les permite remplazar, en forma energéticamente favorable, el agua de hidratación de los iones  $K^+$ , pero no la de los más pequeños iones  $Na^+$  el cual tiene un radio iónico solo 0.38 Å menor que el  $K^+$  (Doyle et al., 1998), y que además iones más grandes, como el  $Cs^+$  (1.69Å), serían excluidos mecánicamente, por impedimento estérico. Este modelo de selectividad fue propuesto por Clay Armstrong y es llamado de “ajuste ceñido” (snug-fit) (Armstrong, 1975).

Sin embargo, se conoce que las proteínas son moléculas flexibles y que sus fluctuaciones térmicas a temperatura ambiente exceden la pequeña diferencia que hay entre los radios iónicos del  $K^+$  y del  $Na^+$  (Allen et al., 2004; Nosokov et al., 2004), lo cual sugiere que la selectividad de los canales de  $K^+$  no puede ser explicado por el modelo de “snug-fit”, y actualmente existen evidencias experimentales que contradicen dicho modelo.

Por ejemplo, en diferentes canales de  $K^+$  se retiró el  $K^+$  de las soluciones (soluciones intracelulares y extracelulares) que bañan a las células ( $0K^+$ ) y se observó que: en el caso del canal Kv2.1 (el homólogo de mamífero del Shab de *Drosophila*) permite el flujo estable de  $Na^+$  (Zhu e Ikeda, 1993); mientras que en el Shaker (Kv de *Drosophila*) la conductancia sufre una caída (colapso), la cual se genera después de abrir y cerrar a los canales en soluciones con  $0K^+$ . El colapso



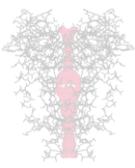
de la conductancia del Shaker es totalmente reversible, despolarizaciones prolongadas generan la recuperación de la conformación conductora del poro.

Se ha demostrado también que cuando la  $[K^+]$  interno disminuye, el perfil energético del poro de Shaker va cambiando (lo cual indica que el FS no se mantiene rígido), aumentando gradualmente su permeabilidad a  $Na^+$  hasta que en el límite de  $0K^+$  se colapsa (Gómez-Lagunas, 1997, 1999, 2001; Gómez-Lagunas et al., 2004). Estos resultados demuestran la flexibilidad del poro de los canales Kv.

En la ausencia de  $K^+$ , los canales Shab (de *Drosophila*) y los canales de  $K^+$  del axón gigante de calamar, se colapsa de manera irreversible, lo cual ocurre aun y cuando los canales se mantienen cerrados durante la exposición a  $0K^+$  (Ambriz-Rivas et al, 2005). En el caso del Shab esto resulta paradójico con respecto a lo observado en el homólogo de mamífero, el canal Kv2.1, ya que comparten un FS idéntico y sin embargo los Kv2.1 en  $0K^+$  permite el flujo estable de  $Na^+$  (Almers y Armstrong, 1980; Ambriz-Rivas et al, 2005; Gomez-Lagunas, 2001).

El colapso irreversible de la conductancia en los canales de  $K^+$  Shab presenta una compleja dependencia del potencial de membrana (Gomez-Lagunas, 2007). Esto demuestra que la estabilidad (y la selectividad)  $K^+$ -dependiente del poro es un proceso dinámico, que no puede entenderse solo con base en las estructuras cristalográficas estáticas, en las que se pierde la contribución del campo eléctrico de la membrana.

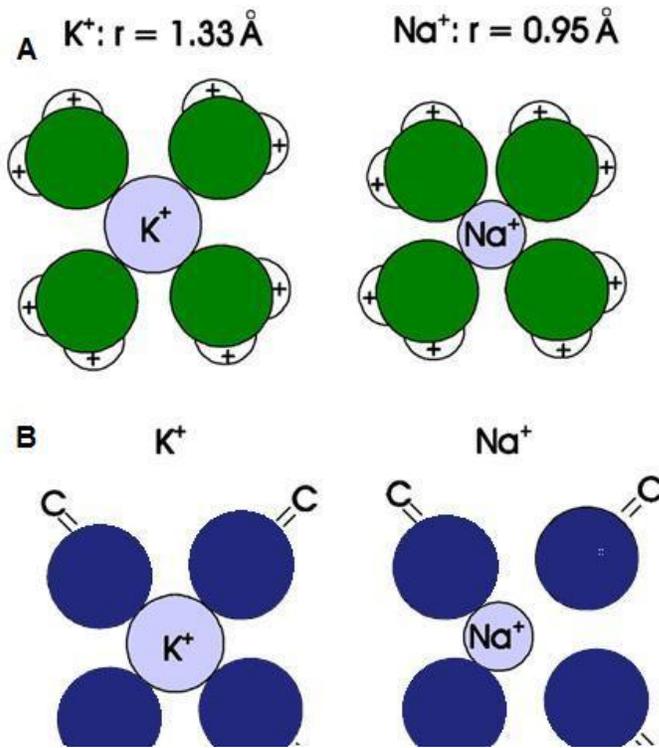
Las estructuras cristalográficas han permitido tener una alta resolución de los canales de  $K^+$  en estados de ocupación iónica, lo que ha contribuido a un mejor entendimiento sobre su selectividad. También, estudios de mutagénesis, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y de estudios cristalográficos han aportado información estructural importante de los canales de  $K^+$  (Bhate et al., 2010; Derebe et al., 2011; Doyle, 1998; Heginbotham, 1994; LeMasurier, 2001; Shian et al., 2012; Ye et al., 2010; Zhou et al., 2001a) sin embargo, aun no se ha podido determinar la estructura del poro en condiciones de  $0K^+$ , lo cual demuestra que el  $K^+$  es un importante elemento en la estabilidad de la estructura de la proteína. Los estudios que se han realizado en diferentes canales de  $K^+$  indican



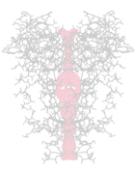
que si bien existen regiones altamente conservadas en sus estructuras existen otros factores que modulan su actividad, generando modificaciones dinámicas.

### **Mecanismo de la selectividad de los canales de $K^+$**

Como se indicó, Clay Armstrong de manera original (Armstrong, 1975), propuso que la selectividad de los canales de  $K^+$  se comportaba como el modelo de Fisher, llamándolo modelo de “ajuste ceñido” (Figura 6). Este modelo contempla que el FS, es una estructura rígida complementaria a la estructura del sustrato, y que esto era el principio de selección de los iones cuando se encuentran deshidratados. Los primeros estudios cristalográficos de los canales de  $K^+$  apoyaron esta propuesta (Doyle et al., 1998).



**Figura 6.** Modelo de Selectividad (modelo de “ajuste ceñido”. A, Se muestran a los iones ( $K^+$  y  $Na^+$ ) con su esfera de hidratación. B, Se muestran a los iones dentro del Filtro de Selectividad, con los cuatro oxígenos superiores. El Modelo propone que: El FS es una estructura fija con los carbonilos de cadena principal del filtro rígidamente posicionados en la geometría que les permite reemplazar de forma energéticamente favorable el agua de hidratación del  $K^+$  pero no la del  $Na^+$  (Armstrong, 1975; Armstrong, 2003; Doyle et al., 1998)



## **Mecanismos de Gating**

Los canales de  $K^+$  regulan la permeabilidad de los iones  $K^+$  a través de tres mecanismos: activación, cierre e inactivación. Mientras que la activación y el cierre del canal son controladas por la misma compuerta, la inactivación es modulada por compuertas específicas diferentes a las de la activación (Kurata y Fedida, 2006).

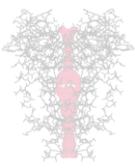
### ***Activación de los canales de $K^+$ dependientes del voltaje.***

Los canales iónicos dependientes del voltaje responden a cambios en el campo eléctrico a través de la membrana, con cambios conformacionales que permiten la apertura del poro y el consecuente paso de iones permeables. Los procesos de activación requieren un número de cambios conformacionales en la proteína. La dependencia del voltaje en la activación se produce por el rearrreglo de cargas asociadas con las transiciones conformacionales (Armstrong, 1981; Bezanilla, 1985; Bezanilla, 2000).

La activación de canales de  $K^+$  involucra movimientos idénticos e independientes de las cuatro subunidades del canal, descritos originalmente por Hodgking y Huxley (1952b), estudios posteriores muestran que la compuerta del canal presenta transiciones independientes y existen más de una transición por subunidad, involucrando 2 ó 3 transiciones (Zagotta et al., 1994; Schoppa y Sigworth, 1998).

### ***Mecanismo de apertura***

Diferentes aproximaciones se han realizado para entender el mecanismo por el cual el cambio de potencial de la membrana provoca un cambio de conformación en el canal de  $K^+$  generando su apertura. El responsable de censar los cambios en el potencial de membrana es el sensor de voltaje S4. En este proceso se genera una corriente previa a la conducción de iones, llamada *corriente de compuerta*, ésta se relaciona con el movimiento de cargas o dipolos

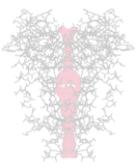


dentro de un campo eléctrico, lo que produce una corriente eléctrica capacitiva (Armstrong y Bezanilla, 1973; Bezanilla, 2008). Durante el proceso de apertura de *Shaker* se mueven 13 cargas netas ( $13e_0$ ) a través del campo eléctrico, y corresponde con las cuatro cargas positivas más exteriores del segmento S4 de cada subunidad, las que participan en el *gating current* (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Seoh et al., 1996; Schoppa et al., 1992); mientras que el resto de cargas del segmento S4 estarían implicadas en participar en la estabilidad estructural de la proteína. Existen evidencias del movimiento de S4 hacia el exterior durante la despolarización de la membrana (Larsson et al., 1996; Yusaf et al., 1996; Baker y cols., 1998; Bezanilla, 2008), sin embargo los detalles aún son motivo de discusión.

### ***Inactivación de canales de $K^+$ .***

Tras la activación, algunos canales de  $K^+$  se inactivan, es decir, pasan a un estado no conductor desde el cual el canal no puede volver a activarse. Se distinguen 2 tipos de inactivación, clasificadas como: rápida y lenta. La inactivación rápida también se le conoce como tipo N, mientras que la inactivación lenta incluye distintos tipos de inactivación, como: tipo C y tipo U. Además de la inactivación de estados cerrados en los canales Kv4. Mientras que la inactivación rápida ocurre en los primeros milisegundos después de la apertura, la inactivación lenta ocurre después de varios segundos de la activación (Hoshi et al., 1990; Klemic et al., 1998; Kurata y Fedida, 2006).

*Inactivación tipo N:* Consiste en la oclusión del poro desde el lado intracelular (Figura 7), de esta manera se bloquea el paso de los iones, cuando el canal se encuentra abierto. En el caso del canal *Shaker*, los residuos de la región N-terminal (6 – 46 aminoácidos) se mueven al vestíbulo interno para ocluir el poro. La parte distal de esta región, llamada “bola”, bloquea el paso de iones a través del canal, mientras que la región proximal actúa como una cadena de la parte distal (la estructura “bola y cadena”, también llamada “dominio de inactivación”)

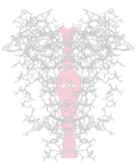


(Hoshi et al., 1990, Isacoff et al., 1991, Shieh et al., 2000). Esta oclusión ocurre en el orden de milisegundos y solo se requiere de un dominio de inactivación para que ocurra la oclusión (Gomez-Lagunas y Armstrong, 1995; Zhou et al., 2001b). La estructura de la bola y la cadena consiste de 11 residuos hidrofóbicos o no cargados y de 8 residuos hidrofílicos. Entre las diversas mutaciones dirigidas que se han realizado en esta región, la mutación de la leucina en la posición 7 por un residuo polar o cargado, provoca la remoción de la inactivación, lo cual indica que la interacción que existe para la inactivación tipo N es de tipo hidrofóbico (Hoshi et al., 1990).

El sitio hidrofóbico, L-7, Y-8, donde la superficie hidrofóbica de la bola puede realizar un contacto, es inaccesible cuando el canal se encuentra en el estado cerrado y solo es expuesto cuando el canal se abre, i.e., la unión de la bola a la cavidad interna del canal de  $K^+$  es posible cuando los segmentos S6 se mueven generando la apertura del poro del canal. Esta inactivación puede ser también removida de manera enzimática, y puede ser restaurada por un péptido sintético (Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993; Hoshi et al., 1990; Zagotta et al., 1990).

Otra característica de la inactivación tipo N es su sensibilidad a bloqueadores intracelulares tales como los iones amonio cuaternarios, en mayor potencia el  $TEA^+$ . En este caso el dominio de inactivación y los iones amonio cuaternarios (en el citosol) compiten por sitios de unión idénticos o cercanos, generando una ocupación del poro mutuamente excluyente (Baukrowitz y Yellen, 1996; Choi et al., 1991, 1993; Zhou et al., 2001b)

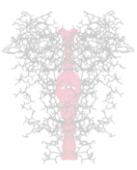
*Inactivación tipo C:* Estudios realizados en el Shaker demuestran que la eliminación del dominio de inactivación rápida revela un proceso de inactivación lenta (Hoshi et al., 1990) (Figura 7). A esta inactivación lenta se le conoce como inactivación tipo C. La cual se caracteriza por ser inhibida por concentraciones elevadas de  $K^+$  y de  $TEA^+$  en el medio extracelular; generando un enlentecimiento de los cambios conformacionales requeridos para la inactivación tipo C (Choi et al., 1991; Fedida et al., 1999; Hoshi et al., 1990; Lopez-Barneo et al., 1993; Rasmusson et al., 1995). Estas observaciones son explicadas por el modelo de



pie en la puerta (“foot in the door”) (Rasmusson et al., 1998), con un mecanismo que está asociado con alteraciones de la boca extracelular y con la cooperatividad de las cuatro subunidades del canal (Larsson y Elinder, 2000; Hoshi y Armstrong, 2013; Yellen et al., 1994).

La compuerta de inactivación de los canales de  $K^+$  provee una forma de memoria a corto plazo, que puede modular el patrón de disparo de las neuronas en una escala de tiempo de segundos (Aldrich et al., 1979; Roeper et al., 1997). En el caso del canal HERG en células cardíacas ventriculares, el canal inactiva rápidamente a voltajes despolarizantes y lleva a cabo su función principal durante la repolarización de la meseta del potencial de acción, debido a que la apertura de los canales dirigen el  $V_m$  al potencial de reposo evitando arritmias de esta manera (Keating y Sanguinetti, 2001; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006; Schönherr y Heinemann, 1996).

Durante la inactivación tipo C, existen cambios conformacionales a nivel de la boca extracelular del canal, en un inicio el mecanismo que se propuso para la inactivación tipo C era una constricción de la boca extracelular (Liu et al., 1996), sin embargo recientemente, Hoshi y Armstrong (2013) proponen que la inactivación tipo C es debida a una dilatación del poro. Entre las observaciones que fundamentan esta nueva propuesta se encuentran los estudios a nivel cristalográfico (Cuello et al., 2010), donde no encuentran cambios significativos a nivel de la boca externa del poro para argumentar que existe un cierre del lado extracelular, como lo propuesto por el grupo de Yellen (Yellen et al., 1994); aunado a esto se considera que en la inactivación tipo C el sitio externo del FS es dilatado de tal manera que el ión  $K^+$  no puede ser coordinado. En estas condiciones el canal se vuelve permeable al  $Na^+$  y la permeabilidad es bloqueada al adicionar 1 mM de  $K^+$ , por lo que con soluciones fisiológicas el canal no conduce, en otras palabras el cambio de selectividad sería, de acuerdo con esta propuesta, el responsable de la falta de conducción de iones que caracteriza al estado



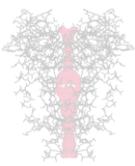
inactivado (Starkus et al., 1997, 1998; Kiss y Korn, 1998; Ogielska y Aldrich, 1999).

### **Características de la inactivación tipo C**

Para dilucidar cuales son los residuos que juegan un papel de mayor importancia en la inactivación tipo C, se han realizado diversas mutaciones dirigidas. Entre los residuos de mayor importancia se ha identificado al residuo T449 (Shaker), cuya sustitución provoca los siguientes efectos: a) La sustitución de T449 por arginina, lisina, glutamato o alanina, acelera la inactivación (Lopez-Barneo et al., 1993), mientras que b) si T449 es sustituida por valina o tirosina la inactivación se ve inhibida (Rasmusson et al., 1995). Sin embargo, los efectos de dichas mutaciones difieren en otros Kv1, ya que en el canal Kv1.4 y 1.5 (que en la posición 449 tienen una lisina y una arginina respectivamente) presentan una inactivación más lenta que en las mutantes del Shaker T449R o T449K; además al mutar a los residuos del Kv1.4 y Kv1.5 por valina o tirosina los efectos sobre la inactivación fueron pequeños (Fedida et al., 1999; Rasmusson et al., 1995). Estos resultados mostraron que el papel de T449 en la inactivación tipo C de Shaker no era general para los canales Kv.

Sin embargo para el caso del Shaker está claro que existe un rearreglo conformacional alrededor del residuo T449 durante la inactivación tipo C; por ejemplo, observaciones del grupo de Yellen y colaboradores (1996), realizando sustituciones de los residuos 448, 449 y 450 por cisteínas, muestran que los movimientos moleculares provocados afectan la inactivación y sugieren que los efectos están asociados a una mayor cercanía de los aminoácidos lo que genera una constricción del poro (Liu et al., 1996).

Otro residuo importante en la regulación de la inactivación del Shaker es el residuo E418. Estudios de mutación dirigida muestran que la sustitución de E418 (segmento S5) y V451 (en la región del poro) por cisteínas estabilizan la inactivación tipo C. Sin embargo, la sustitución de E418 y G452 favorece una inactivación lenta y el estado abierto del canal. A partir de estas observaciones, se realizó un modelo molecular, donde se sugiere que la inactivación tipo C requiere



de la ruptura de puentes de hidrogeno entre E418 y los átomos de nitrógeno de V451 y G452, permitiendo una rotación de residuos, lo cual sugiere un cambio conformacional que podría desestabilizar el filtro de selectividad (Larsson y Elinder, 2000). Otros de los residuos que pueden desestabilizar el filtro de selectividad es el residuo D447 el cual interactúa con W435 (Kirsch et al., 1995).

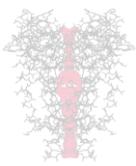
Además, experimentos en Shaker y Kv1.3 sugieren que la transición de inactivación tipo C es una transición cooperativa de las cuatro subunidades. Usando quimeras o la coexpresión de canales con diferentes velocidades de inactivación tipo C (Shaker A463 o V463, y equivalentes mutaciones en Kv1.3), diversos grupos demostraron que las cuatro subunidades de un canal contribuyen a (un rearrreglo cooperativo en la inactivación tipo C) la energía de activación de la transición de inactivación tipo C (Larsson and Elinder, 2000; Ogielska et al., 1995; Panyi et al., 1995).

Es importante también mencionar que existe un antagonismo entre el  $K^+$  extracelular y los iones  $H^+$ , los cuales parecen estar relacionadas en la inactivación y en los cambios en la disponibilidad del canal. Y podrían estar participando en la regulación del canal de  $K^+$  durante periodos de anoxia o hiperexcitabilidad donde el pH y el  $K^+$  extracelular pueden cambiar (Bowlby et al., 1997).

#### El filtro de selectividad durante la inactivación tipo C

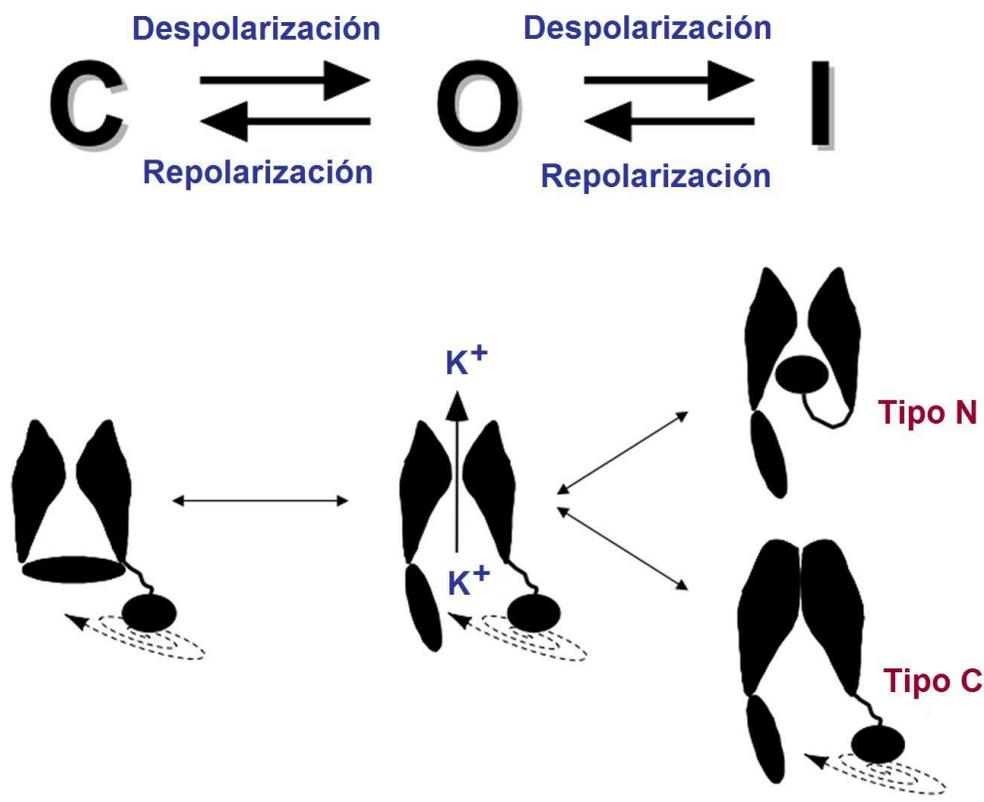
En el Shaker también se ha estudiado la permeabilidad relativa al  $K^+$  y  $Na^+$ , que se ve modificada durante la inactivación tipo C (Starkus et al., 1997), indicando que la inactivación induce cambios conformacionales que influyen en la selectividad iónica.

Además se ha observado que la adición de concentraciones en el rango micromolar de  $K^+$  en el medio extracelular genera una reducción de la corriente de  $Na^+$  a través del canal, indicando que existe una competición por los sitios de unión en el filtro de selectividad; la unión que existe entre el ion  $K^+$  y el sitio de

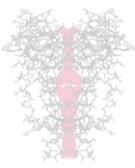


unión es más fuerte y excluye al ion  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, cuando la solución extracelular es adicionada con alto  $\text{K}^+$  la inactivación del canal se enlentece (Korn e Ikeda, 1995; Kiss et al., 1998).

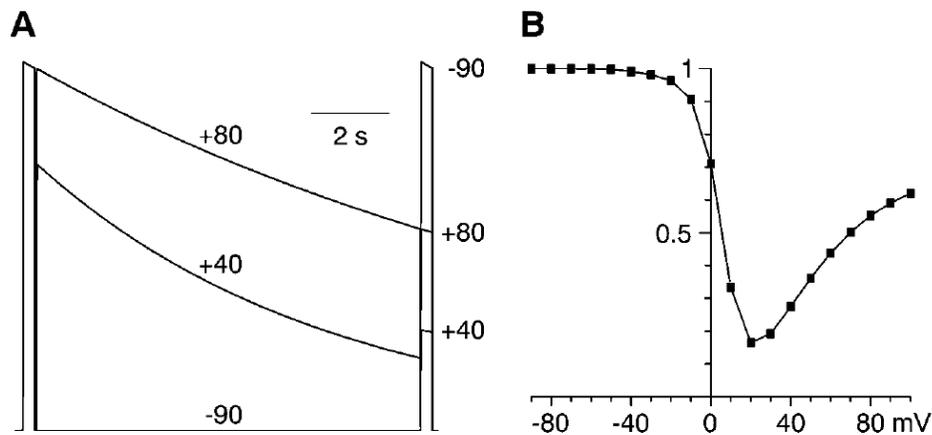
Durante mucho tiempo se había manejado que la inactivación tipo C se debía a una constricción del poro (Yellen et al., 1994), sin embargo actualmente existe una nueva propuesta que la inactivación tipo C se debe a una pequeña dilatación del sitio más externo del FS (Hoshi y Armstrong, 2013).



**Figura 7.** Gating de las compuertas de Activación e Inactivación. En la parte superior se representa en forma de esquema cinético los estados: Cerrado (C), Abierto (O) e Inactivado (I). En la parte inferior, se presenta el esquema en forma de cartoon. La primera imagen (de izquierda a derecha) representa el estado Cerrado del canal. La segunda representa el estado Abierto y la última imagen representa la Inactivación de los canales de  $\text{K}^+$ : la Inactivación tipo N y C, como se indica. Tomado de Barros et al., 2012.



**Inactivación tipo U:** Esta forma de inactivación se describió en el canal Kv2.1 y presenta una inactivación en forma de U (figura 8). Es una inactivación que es acelerada por altas concentraciones de  $K^+$  y por  $TEA^+$  extracelular (Klemic, et al., 1998). Ocurre desde el estado abierto (OI) y desde los estados cerrados (CI), donde el canal se inactiva más rápidamente desde el estado cerrado. Este tipo de inactivación también ha sido observada en otros canales de  $K^+$  (Kv3.1, Kv1.5, Kv4) (Klemic et al. 1998; Klemic et al., 2001; Kurata et al. 2001); sin embargo cabe señalar que en todos estos casos la inactivación no se midió en estado estacionario, lo cual por si mismo puede producir una curva de inactivación en forma de U artificial (Carrillo et al., 2013).

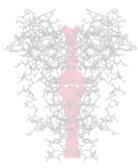


**Figura 8.** A Corriente de  $K^+$  despolarizada a diferentes voltajes, la duración del prepulso fue de 10 segundos. B La voltaje dependencia de la Inactivación del canal Kv2.1, medida en el tercer pulso de A. Tomado de Klemic et al., 2001.

### Inactivación de canales Kv4

Los canales Kv4 se expresan preferencialmente en el cerebro y el corazón. En los cuerpos neuronales y las dendritas del sistema nervioso central, los canales Kv4.2 y Kv4.3 participan en la corriente tipo A, la cual regula la excitabilidad neuronal (Serodio et al. 1994; Malin y Nerbonne, 2000).

Los Kv4 se caracterizan porque se inactivan preferencialmente desde estados cerrados. Altas concentraciones de  $K^+$  externo promueven la inactivación e inhiben la recuperación de la inactivación (Jerng y Covarrubias, 1997; Jerng et

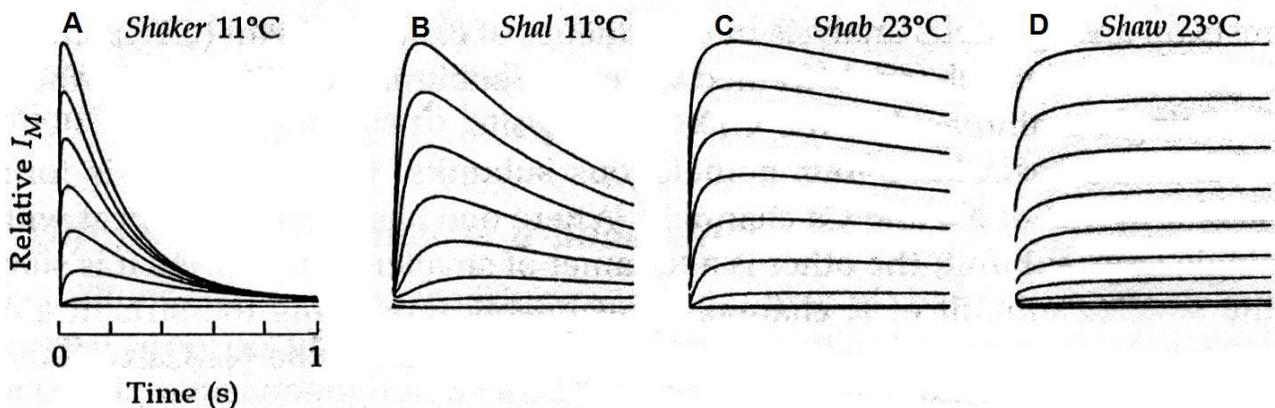


al., 1999, 2004). En el corazón, los canales Kv4.2 y Kv4.3 contribuyen de manera significativa a la corriente de  $K^+$  saliente transitoria, la cual causa una muesca en la repolarización temprana del potencial de acción (Guo et al. 1999).

### Canales de $K^+$ de *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta o la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, es un organismo modelo en la biología, ya que comparte con el ser humano muchos genes ortólogos; además de presentar un ciclo de vida corto lo que ha facilitado realizar estudios genéticos con este organismo.

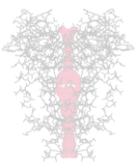
La mayoría de las especies tienen una gran diversidad de canales de  $K^+$ , en *Drosophila melanogaster* no es la excepción (Figura 9), expresa cuatro subfamilias de canales de  $K^+$  activados por voltaje: Shaker (Kv1), Shab (Kv2), Shaw (Kv3), y Shal (Kv4) (Butler et al., 1989; Jegla y Salkoff, 1995; Salkoff et al., 1992; Wei et al., 1996).



**Figura 9.** Cinética de las corrientes iónicas de los canales de  $K^+$  de *Drosophila melanogaster*. A, Shaker. B, Shal. C, Shab. D, Shaw. Tomado de Hille, 2001.

### Shaker

El Shaker fue el primer canal de  $K^+$  clonado (Figura 9A). Shaker presenta activación e inactivación rápidas (corriente tipo A) (Kamb et al., 1987; Papazian et al., 1988; 1987; Tempel et al., 1987; Salkoff y Wyman, 1981), y



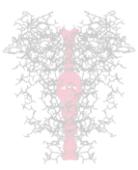
participa en la regulación del potencial de acción, involucrado en funciones importantes como la transmisión y plasticidad sinápticas, el procesamiento de la información en los fotorreceptores, y fenómenos más complejos como el sueño y la memoria (Cirelli et al., 2005; Davis, 1993, 1996; Dubnau y Tully, 1998; Frolov et al., 2012; Guan et al., 2011; Niven et al., 2003; Tanouye et al., 1981; Zhong et al., 1992).

Shaker es el canal iónico mejor caracterizado y ha sido un modelo en el estudio de las propiedades de los canales  $K^+$ . Así, de interés para el presente trabajo, el modelo ha sido de importancia en los estudios de la estabilidad de la conductancia ( $G_K$ ) que revelan que en condiciones de  $0K^+$ , el canal se mantiene estable; sin embargo cuando el canal se activa  $0K^+$  la conductancia disminuye (Gómez-Lagunas, 1997 y 2001). Esta disminución de la conductancia en condiciones de  $0K^+$  no corresponde con ninguna forma de inactivación, por lo tanto para distinguirla de otros estados no conductores se le denomina: colapso de la conductancia. El colapso de  $G_K$  ocurre de manera reversible, y la presencia de  $K^+$  y otros iones permeantes ( $Rb^+$ ,  $NH_4^+$  y  $Cs^+$ ), así como el  $TEA^+$  y  $Ba^{2+}$ , y algunas toxinas inhiben el colapso de  $G_K$  (Gómez-Lagunas, 1997, 1999, 2001, 2004).

### Shab

El canal Shab participa en la corriente de  $K^+$  sostenida en neuronas y en músculo (Figura 9C) (Chopra et al., 2000; Hegde et al., 1999; Singh y Singh, 1999; Tsunoda y Salkoff, 1995a). Entre los procesos fisiológicos en los que participa están: regulación de la excitabilidad neuronal, la duración de potenciales de acción, la regulación de los fotorreceptores, la transmisión sináptica, la contracción cardiaca, la locomoción y la apoptosis (Chopra et al., 2000; Redman et al., 2007; Peng y Wu, 2007; Vahasoyrinki et al., 2006; Ueda y Wu, 2006).

Los canales ortólogos de mamífero se expresan en cardiomiocitos, músculo esquelético, músculo liso vascular, placenta, células beta pancreáticas y retina (Ordog et al., 2006; Patel et al., 1997; Pinto y Klumpp, 1998; Wang et al., 2002; Wareing et al., 2006; Yan et al., 2004). En el caso de las neuronas los Kv2.1 se



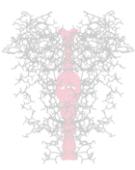
han detectado tanto en el cuerpo de la neuronas, así como en las dendritas (Antonucci et al., 2001).

### Shaw

Shaw es un canal de  $K^+$  del cual se conoce poco de sus propiedades biofísicas y funcionales (Figura 9D). El Shaw conduce una corriente que no inactiva y es poco sensible al voltaje, en comparación con el Shaker (Tsunoda y Salkoff, 1995b). Shaw ha sido reportado en algunas células no excitables durante el desarrollo embrionario y en pequeños grupos de neuronas en el sistema nervioso central, y su expresión se ha relacionado con el control del ciclo circadiano de *Drosophila* (Hodge et al., 2005; Hodge y Stanewsky, 2008).

### Shal

En *Drosophila*, Shal (Figura 9B) conduce una corriente de  $K^+$  tipo A en neuronas (Yu et al., 1999). Sin embargo, en contraste al Shaker que es expresado en los axones neuronales, Shal se localiza en cuerpos celulares y dendritas (Rivera et al., 2003), además que su activación ocurre a voltajes más negativos que Shaker mientras que su inactivación es más lenta (Tsunoda y Salkoff, 1995a, 1995b).



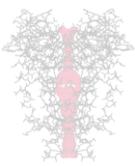
## **Antecedentes**

Dado que Shaker ha sido el modelo preferente para el estudio de los canales de  $K^+$ , se ha restringido el estudio de los canales tipo Shab, suponiendo que las propiedades son idénticas a su homólogo de mamífero (Kv2.1), o bien que tiene propiedades similares al Shaker sin inactivación rápida.

El interés de estudiar al Shab nace a partir de los estudios de estabilidad-selectividad de Shaker (Gómez-Lagunas, 2001), donde se observó que  $K^+$  es un cofactor indispensable para la estabilidad y la selectividad de la  $G_K$ . En este sentido se conoce que:

Sin embargo, se sabe que los canales tipo Shab en condiciones de  $0K^+$  presentan colapso de la  $G_K$  de manera irreversible, contrariamente a su homólogo de mamífero (Kv2.1) (Gomez-Lagunas, 2007; Ogielska y Aldrich, 1998) el cual en condiciones de  $0K^+$  permite el flujo de  $Na^+$  de manera estable. El colapso de la  $G_K$  de Shab ocurre aún cuando los canales se mantienen cerrados durante la exposición a  $0K^+$ , esto demuestra que el  $K^+$  que mantiene estable al poro de Shab se disocia fácilmente, de manera semejante a lo que ocurre en los canales de  $K^+$  del axón gigante de calamar (Almers y Armstrong, 1980; Ambriz-Rivas et al., 2005). Lo anterior sugiere que tan sólo es necesario que se disocie el  $K^+$  de los sitios más externos del FS (s1/s2) de Shab para que  $G_K$  se colapse, además de que el colapso de  $G_K$  presenta una fuerte y compleja dependencia del potencial de membrana (Gomez-Lagunas, 2007). El paso limitante en el colapso de  $G_K$  es el cambio conformacional que sigue a la salida del  $K^+$  estabilizante de los canales. Además se sabe que la inactivación lenta enlentece, pero no impide, el colapso de la  $G_K$  de Shab (Gomez-Lagunas, 2007).

Además aunque los canales de  $K^+$ : Shaker, Kv2.1 y Shab, presentan una secuencia característica idéntica, la cual forma el FS del poro, su respuesta a la eliminación de  $K^+$  es muy variable, por lo que se puede afirmar que el papel de los iones  $K^+$  en la estabilidad y los determinantes moleculares de ésta no son del todo conocidos. En este sentido es importante mencionar lo siguiente:



(1) Los canales Kv2.1 difieren de los canales Shaker en 3 residuos situados en el segmento S6, inmediatamente por debajo del FS.

(2) El grupo de Aldrich demostró que sólo uno de estos residuos, la Cisteína 463 del Kv2.1 es el responsable de la diferencia entre el Shaker que se colapsa y los canales Kv2.1 que permean  $\text{Na}^+$  en  $0\text{K}^+$  (Ogielska y Aldrich, 1998).

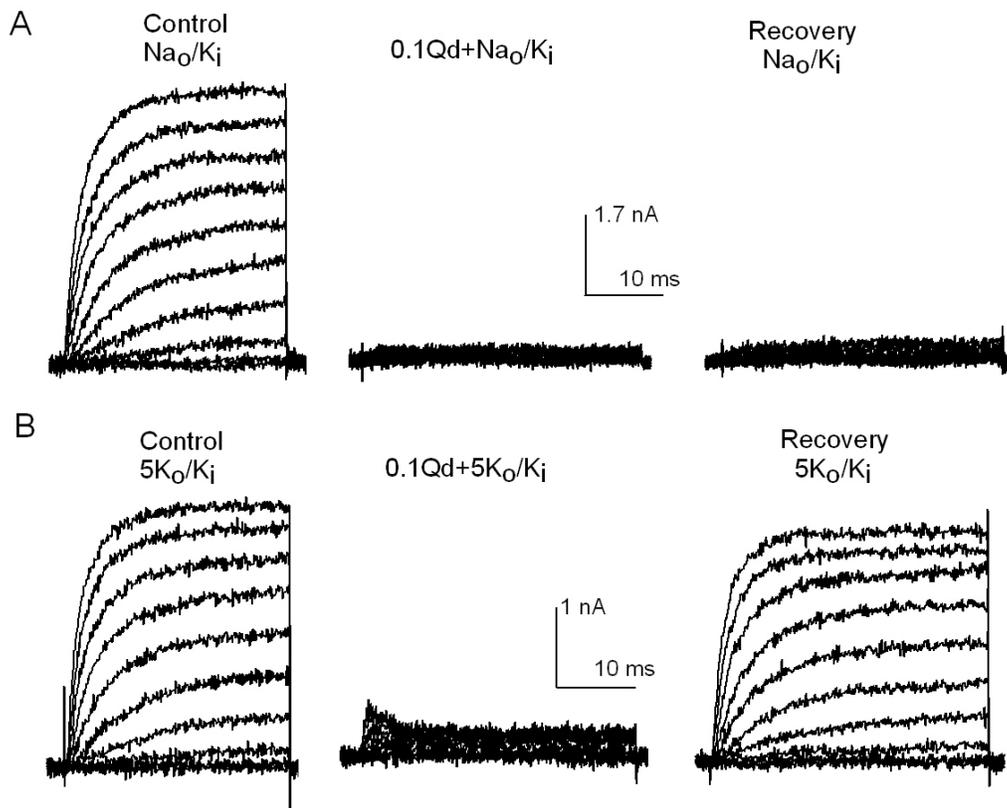
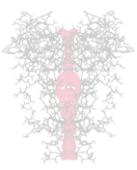
(3) Específicamente la mutación A463C en Shaker permite el paso de  $\text{Na}^+$  en  $0\text{K}^+$  (Ogielska y Aldrich, 1998). Los autores concluyen que dicha mutación disminuye la afinidad al  $\text{K}^+$  del poro de Shaker permitiendo entonces el paso de  $\text{Na}^+$ , y proponen que este cambio de afinidad ocurriría a través de la interacción del residuo 463 con la valina del FS (Ogielska y Aldrich, 1999).

Con base en este último punto, se debe señalar que ésta interpretación puede ser incorrecta, ya que:

(1) Shab, al igual que Kv2.1 presenta una cisteína 463, y sin embargo, el Shab se colapsa en  $0\text{K}^+$  en vez de conducir el  $\text{Na}^+$  de manera estable como el Kv2.1, además de que,

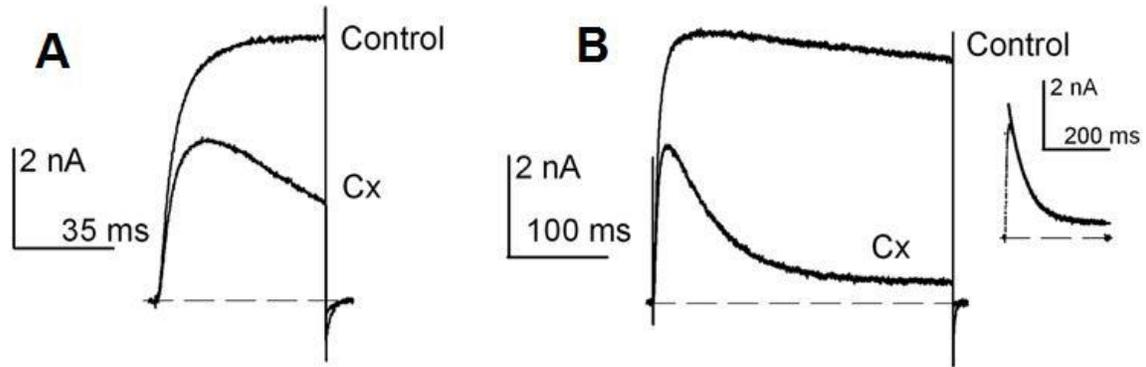
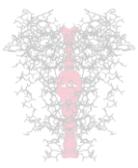
(2) En sus trabajos, el grupo de Aldrich no discutió el problema de la estabilidad del poro en función del  $\text{K}^+$ , un punto que es de gran interés en el campo y en particular para nuestra línea de investigación.

En cuanto a los estudios farmacológicos realizados en Shab, se sabe que la quinidina, una droga antiarrítmica (Figura 10B), bloquea el poro del canal desde el lado intracelular cuando éste se encuentra abierto, con una estequiometría de 1. Este efecto es dependiente del voltaje, además de que el incremento de la concentración de  $\text{K}^+$  inhibe de forma competitiva la unión de quinidina al poro; en condiciones de  $0\text{K}^+$  la quinidina bloquea el poro y el Shab se colapsa de manera irreversible (Figura 10A), donde se observó que  $\text{K}^+$  es un cofactor indispensable para la estabilidad de la conductancia (Gomez-Lagunas, 2010).

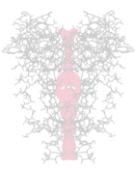


**Figura 10.** Bloqueo de la corriente de  $K^+$  por quinidina, en presencia de 0 y 5 mM de  $K^+$ . En A, se observa que en ausencia de  $K^+$  externo la corriente es bloqueada por quinidina, de manera irreversible, ya que al lavar no hay recuperación de la corriente. En B, la corriente de  $K^+$  en condiciones fisiológicas, la quinidina bloquea al canal, generando un colapso reversible.

Por otro lado, el celecoxib, una sustancia antiinflamatoria no esteroidea, diseñada para inhibir a la COX2, en concentraciones terapéuticas, también promueve una inactivación rápida de Shab (desde estados abierto y cerrados), sin bloquear el poro (Figura 11). Para que este efecto se lleve a cabo es necesario que al menos dos moléculas de celecoxib se unan al canal (Arias-Olguín et al., 2011).



**Figura 11.** Corriente de  $K^+$  en condiciones Control y en presencia de  $10 \mu\text{M}$  de Celecoxib (Cx), fueron generadas por un pulso despolarizante a  $0 \text{ mV}$ , con un HP =  $-80 \text{ mV}$ . A, pulso con una duración de  $50 \text{ ms}$ . B, pulso con una duración de  $300 \text{ ms}$ . (Arias-Olguín et al., 2011).



### **Objetivo general:**

Realizar un estudio funcional de los determinantes moleculares de la selectividad-estabilidad del canal Shab de *Drosophila*, y de la relación de este parámetro con el “gating” de inactivación de los canales de  $K^+$ .

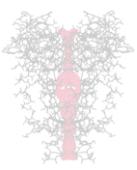
### **Hipótesis.**

(1) Aún y cuando la selectividad y la estabilidad del poro pueden variar en forma paralela, los determinantes moleculares de ambos parámetros no son idénticos.

(2) Los cambios de selectividad no son el parámetro que dispara la inactivación lenta de canales de  $K^+$ , sino que ésta ocurre como resultado del tiempo que permanece despolarizada la membrana.

### **Objetivos Particulares:**

- ❖ Determinar la selectividad de la estabilidad de la conductancia de Shab y comparar ésta con la selectividad mostrada por el poro.
- ❖ Determinar los probables efectos provocados por las manipulaciones empleadas en el objetivo anterior (cambios en la composición iónica del medio en particular de  $K^+$ ) sobre la inactivación lenta de Shab.
- ❖ Estudiar la inactivación del Shab modificando las condiciones iónicas.



## **Métodos**

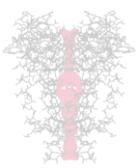
### ***Cultivo celular y expresión de canales Shab***

La línea celular de insecto Sf9, comprada de ATCC, fue utilizada para expresar el canal Shab. Las células Sf9 son de origen endotelial del ovario de la oruga *Spodoptera frugiperda*. Las células fueron mantenidas en cultivo a 27 °C en medio Grace's (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino. De manera previa a su infección las células fueron colocadas sobre vidrio (2x3 mm), posteriormente fueron infectadas con el baculovirus recombinante *Autographa californica sp* el cual contiene el cDNA de los canales dShab11, usando una multiplicidad de infección de ~10, de acuerdo a lo reportado (Gomez-Lagunas, 2007). Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo 48 horas después de la infección (con este método se logro que del 80 al 90% de las células expresaran a los canales de interés, por lo que no fue requerido el uso de marcadores de expresión).

### ***Registros electrofisiológicos***

Las corrientes macroscópicas fueron monitoreadas empleando la técnica de control de voltaje en microáreas (patch-clamp), en la modalidad de célula-completa (whole-cell), empleando para esto un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments). Las corrientes fueron filtradas, y fueron digitalizadas para su almacenamiento, dependiendo del experimento, a frecuencias que cumplen el teorema de Nyquist, empleando un convertidor A/D Digidata 1322 (Axon Instruments). Se usaron electrodos de vidrio de borosilicato (Kimax 52) con una resistencia de ~1M $\Omega$ , de acuerdo a lo reportado previamente (Gomez-Lagunas, 2007).

Entre el 70 al 80 % de la resistencia en serie fue compensada de manera electrónica, y los componentes pasivos de la membrana (transiente capacitivo y corriente de fuga) fueron sustraídos mediante un protocolo de pulsos tipo P/4. El potencial de mantenimiento (HP) fue por lo general de -80 mV, o si así lo requirió



el experimento fue cambiado tal y como se indica. Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente (20-25 °C).

### **Soluciones de registro**

Las soluciones fueron preparadas usando agua ultrapura MilliQ, y su composición dependió del tipo de experimento.

#### Soluciones Internas (en mM)

K<sub>i</sub>: 90 KF, 30KCl, 2MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES-KOH.

70K<sub>i</sub>: 52.5 KF, 17.5 KCl, 37.5 NaF, 12.5 NaCl, 2MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES-KOH.

Na<sub>i</sub>: 90 NaF, 30NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES-NaOH

#### Soluciones externas (en mM):

Na<sub>o</sub>: 145NaCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-NaOH.

XK<sub>o</sub>: X KCl, 145-X NaCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-NaOH.

15 TEA<sub>o</sub>: 15 TEA-Cl, 130 NaCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-NaOH

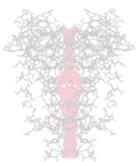
NH<sub>4o</sub>: 100 NH<sub>4</sub>, 45 NMG, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES-HCl.

La Quinidina se adiciono a la solución de 5K<sup>+</sup><sub>o</sub>. (Gomez-Lagunas, 2010).

### Análisis de los Datos

El modelo que se muestra en la Figura 23 fue resuelto usando la integración Runge-Kutta, implementado en Igor Pro (Wavemetrics).

Los puntos en las gráficas correspondieron con la media ± el error estándar de experimentos independientes (n= mínima de 4). Las curvas se compararon con la prueba F utilizando GraphPadPrism versión 5.00 (GraphPad Software, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) y SigmaPlot 10. El nivel de significación se estableció en 0.05.



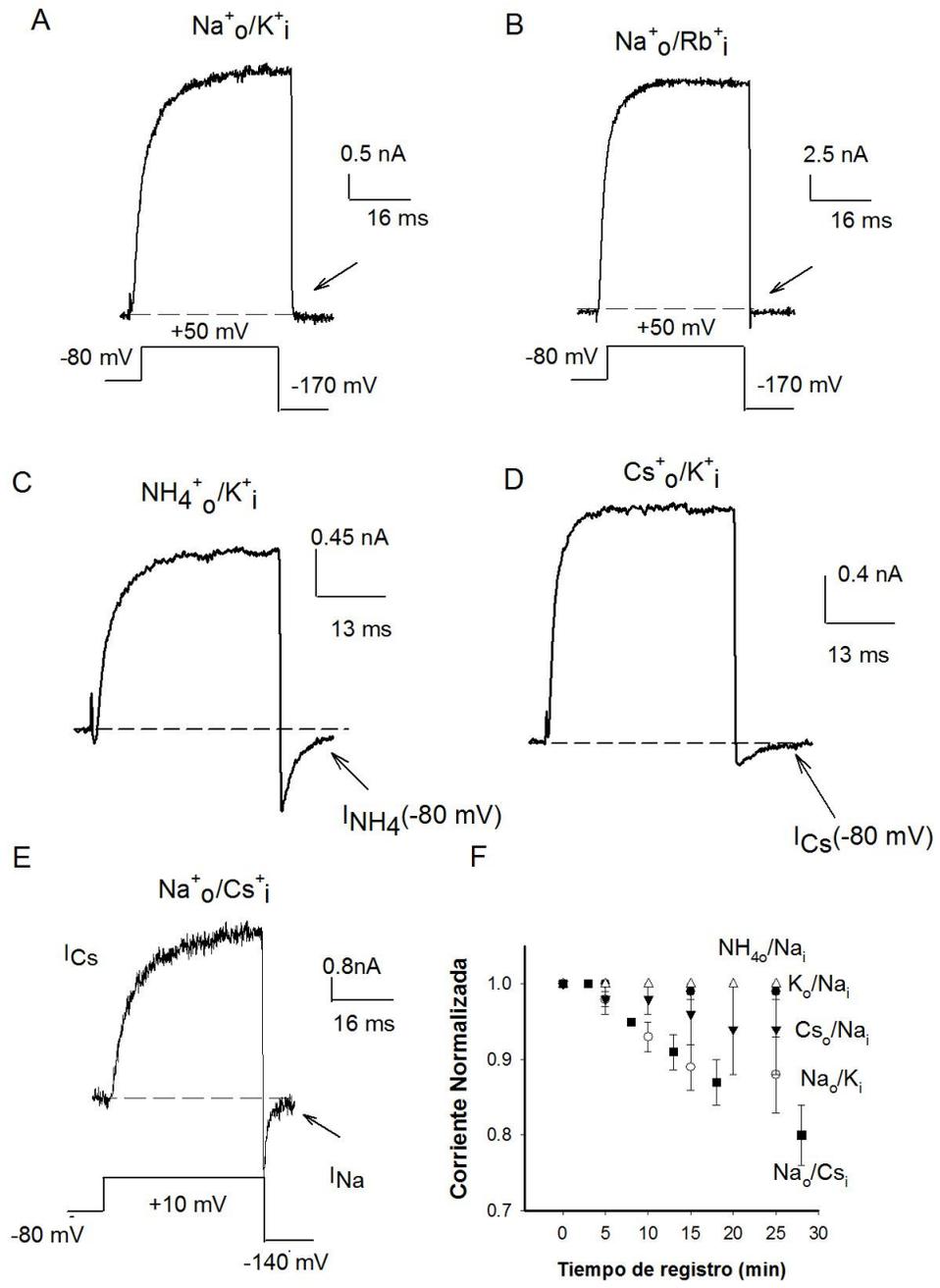
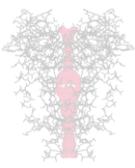
## **RESULTADOS**

Siendo uno de nuestros objetivos realizar un estudio funcional de los determinantes de la selectividad del poro de los canales Shab, comenzamos esta tesis estudiando el papel del  $K^+$  en la relación selectividad-estabilidad de Shab.

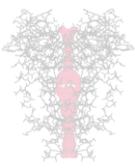
39

### ***Selectividad de Shab***

Como un primero objetivo determinamos la relación de la selectividad  $Na^+/K^+$  ( $P_{Na}/P_K$ ), en condiciones bi-iónicas estándar ( $Na^+_o/K^+_i$ ). En la Figura 12A, se muestra la  $I_K$  generada por un pulso despolarizante a +50 mV / 30 ms, seguido por una fuerte hiperpolarización a -170 mV. En estas condiciones, se generó una corriente saliente de  $K^+$  durante la despolarización, y al final del pulso, a pesar de que existe un gradiente electroquímico altamente favorable para la entrada  $Na^+$ , la hiperpolarización a -170 mV no generó corriente entrante alguna. Esto muestra que el Shab es un canal de  $K^+$  típico, con una  $P_{Na}/P_K < 10^{-3}$ . Un resultado semejante fue obtenido cuando el  $K^+_i$  (Figura 12B) fue sustituido equimolarmente por  $Rb^+_i$  (1.48Å), y fue utilizado el mismo protocolo de estimulación. Claramente se observa que tampoco existe una corriente entrante de  $Na^+$ . Esto reforzó nuestra conclusión de que el Shab es un canal de  $K^+$  típico y está de acuerdo con el empleo común de  $Rb^+$  como un sustituto del  $K^+$ .



**Figura 12.** Permeabilidad de Shab. A,  $I_K$  generada por un pulso despolarizante a +50mV/30ms seguida por una hiperpolarización a -170 mV.  $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} < 0.001$ . B,  $I_{\text{Rb}}$  generada como en A.  $P_{\text{Na}}/P_{\text{Rb}} < 0.001$ . C,  $I_K$  generada por un pulso despolarizante a +50mV/30ms seguida por una hiperpolarización a -80 mV, en condiciones  $\text{NH}_4^+_{\text{o}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ . D,  $I_K$  generada como en C, en condiciones de  $\text{Cs}^+_{\text{o}}/\text{K}^+_{\text{i}}$ . E,  $I_{\text{Cs}}$  saliente, generada por un pulso a +10 mV/30ms. Al final del pulso la membrana fue hiperpolarizada a -140 mV, donde se puede observar la  $I_{\text{Na}}$  entrante. F, Estabilidad de la corriente durante el tiempo de registro, en las condiciones indicadas.



Decidimos entonces evaluar la permeabilidad al  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{Cs}^+$  en la presencia de  $\text{K}^+$ . Utilizando un protocolo de estimulación semejante fue observado que tanto en  $\text{NH}_4^+$  (Figura 12C) como en  $\text{Cs}^+$  (Figura 12D) en el medio extracelular provocaron una corriente entrante al repolarizar la membrana a -80 mV. Lo cual indicó que a diferencia de  $\text{Na}^+$ , ambos iones permearon a través del Shab.

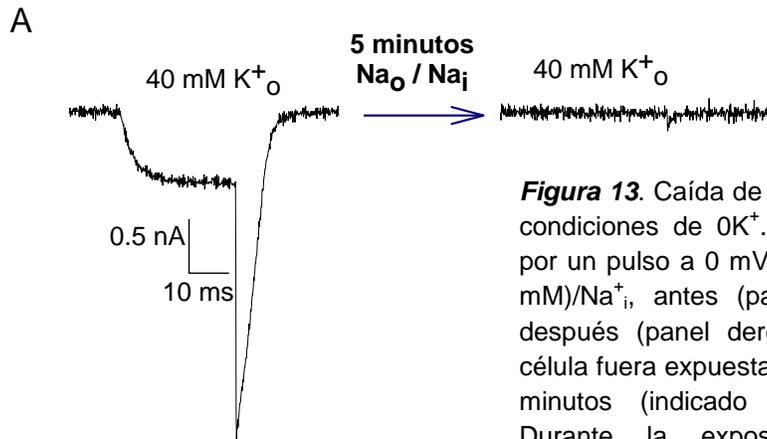
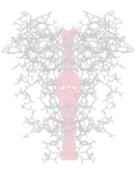
Al ser el  $\text{NH}_4^+$  y el  $\text{Cs}^+$  iones permeantes, decidimos sustituir al  $\text{K}^+$  por uno de estos iones, y explorar si en estas condiciones el  $\text{Na}^+$  continuaba siendo no permeable a través de Shab. Debido a que en condiciones de  $\text{NH}_4^+$  no pudimos obtener registros estables solo presentamos  $I_{\text{Cs}}$ .

En condiciones de  $\text{Na}^+/\text{Cs}^+$  fue observada una corriente saliente macroscópica, que llamamos  $I_{\text{Cs}}$  (Figura 12E), seguida por una corriente entrante acarreada por  $\text{Na}^+$  cuando la membrana fue hiperpolarizada a -140 mV. Esto sugirió, que en estas condiciones, existió un cambio conformacional en el poro de Shab que permitió el flujo de ambos iones.

Utilizando estas condiciones bi-iónicas estudiamos la estabilidad del canal durante el tiempo de registro (Figura 12F). La corriente fue estable cuando existió un ión permeante de un solo lado de la membrana, pero fue más estable con los iones  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{K}^+$  en la solución extracelular.

Sin embargo, cuando el Shab fue sometido a condiciones de  $0\text{K}^+$  la estabilidad de  $G_{\text{K}}$  fue modificada abruptamente.

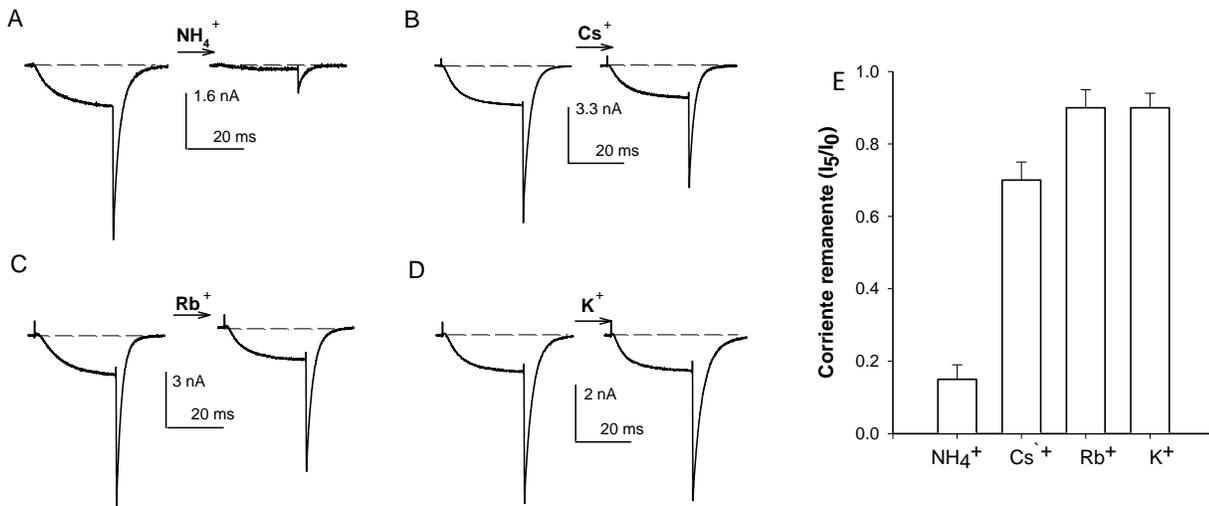
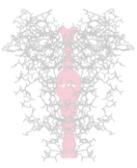
Se ha reportado que la conductancia de Shab se colapsa en condiciones de  $0\text{K}^+$  (Ambriz-Rivas et al., 2005). Aquí exploramos el comportamiento del Shab cuando se estimulo la membrana en presencia de 40 mM  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , antes y después de un tratamiento por 5 minutos en solución  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$ , i.e., en condiciones de  $0\text{K}^+$ , mientras la célula fue mantenida en -80 mV (Figura 13). Bajo estas condiciones fue observado que el canal Shab sufrió colapso de la conductancia. Esto indicó que el ión  $\text{K}^+$  que confiere la estabilidad al Shab se localiza en el sitio de unión más externo, de tal manera que bastó con sustituirlo por completo de la solución para que este se disociara.



**Figura 13.** Caída de la  $G_K$  de Shab en condiciones de  $0K^+$ .  $I_K$  fue generada por un pulso a 0 mV/30 ms en  $K^+_o$ (40 mM)/ $Na^+_i$ , antes (panel izquierdo) y después (panel derecho) de que la célula fuera expuesta a  $Na^+_o$  durante 5 minutos (indicado por la flecha). Durante la exposición el canal permaneció cerrado a -80 mV.

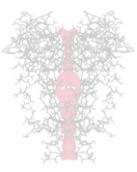
Experimentos similares fueron realizados para explorar si a bajas concentraciones (5 mM) de los iones permeantes podrían inhibir el colapso de la  $G_K$  (Figura 14). Debido a que a altas concentraciones (145 mM) todos los iones permeantes mantuvieron la estabilidad del Shab, inhibiendo el colapso del poro (Figura 12F). La  $I_K$  fue entonces generada aplicando un pulso a 0 mV desde -80 mV por 30 ms, en 40 mM  $K^+_o/Na^+_i$ , antes y después del tratamiento por 5 min con soluciones extracelulares (5 mM) conteniendo ya sea  $NH_4^+$ ,  $Cs^+$ , o  $Rb^+$ , y fueron comparados sus efectos con el obtenido en presencia de  $K^+$  (Figura 14 A-D).

Conforme la concentración de los iones disminuyó, algunos fueron más eficientes que otros en mantener la estabilidad, y en una concentración de 5 mM fue observado que el ion  $Rb^+$  inhibió el colapso del poro con la misma potencia que el  $K^+$ , seguido del  $Cs^+$ , mientras que el  $NH_4^+$  fue el menos eficiente. En la Figura 14E, se muestra de manera gráfica la corriente que no fue colapsada en cada una de las condiciones.



**Figura 14.** Potencia con la que cationes distintos al  $K^+$  inhiben el colapso de la conductancia de Shab. Durante el cierre de los canales y la exposición del ión, el canal permaneció cerrado a  $-80$  mV. Panel izquierdo de los incisos corresponde a la  $I_K$  que antecede la exposición del ión permeante, en condiciones de  $40$  mM  $K^+_o/Na^+_i$ . Panel derecho  $I_K$  posterior a la exposición del ion. Los iones permeantes fueron evaluados a una concentración de  $5$  mM. A,  $NH_4^+_o$ . B,  $Cs^+_o$ . C,  $Rb^+_o$ . D,  $K^+_o$ . E, La potencia de inhibición del colapso de Shab por los iones permeantes, sigue la secuencia:  $K^+ \sim Rb^+ > Cs^+ > NH_4^+ > Na^+$ .

Ha sido reportado previamente que aumentos similares en la selectividad a  $Na^+$ , como los descritos en la primera parte de esta tesis, se presentan durante el “gating” de inactivación lenta, tipo C, de Shaker (Starkus et al., 1997). En esta inactivación, hasta hace muy poco (Hoshi y Armstrong, 2013) se asumía que además ocurría un cierre o estrechamiento de la porción extracelular del poro (Liu et al., 1996). Por otro lado nuestro laboratorio ha demostrado que la velocidad de colapso de la  $G_K$  de Shab en  $0K^+$  a  $-80$  mV, potencial al cual los canales están cerrados, es similar a la que se obtiene a  $0$  mV, potencial al cual los canales estarían inactivados, esto claramente discrepa con un mecanismo de inactivación que implique un cierre del lado externo del poro (Gomez-Lagunas, 2007). Por lo tanto, resultó claro que para comprender la dinámica ion-dependiente del poro de Shab se requiere estudiar el mecanismo de inactivación de estos canales, por lo que este tema fue abordado en la segunda parte de esta tesis.

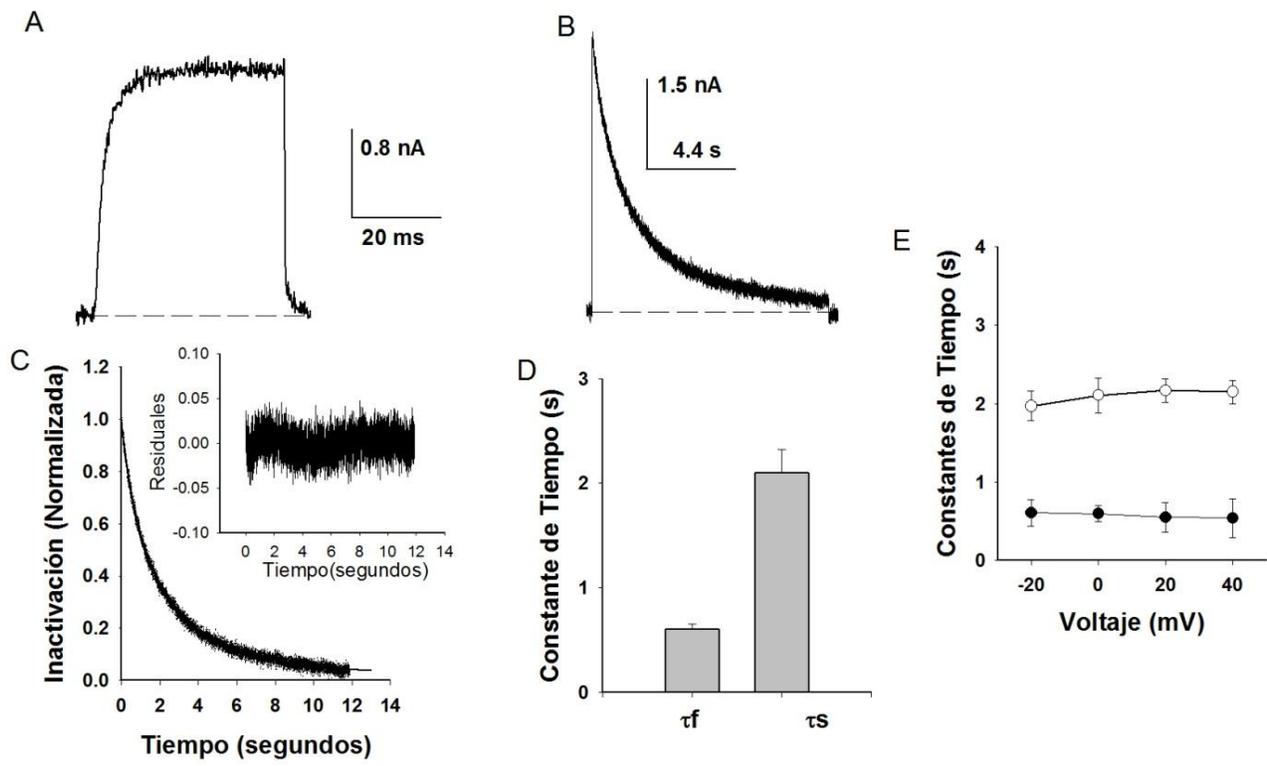
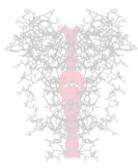


## **Caracterización de la inactivación del Shab.**

*Mecanismos de Inactivación Lenta: El papel de los iones  $K^+$ .*

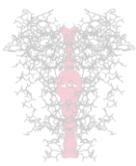
El Shab presentó una inactivación lenta, la cual se desarrolló en el orden de segundos. En la Figura 15A se muestra la  $I_K$ , generada por un pulso despolarizante de 30 ms, mientras que en la Figura 15B el pulso de estimulación fue de 12 segundos. Se puede observar que la  $I_K$  se mantuvo durante los pulsos breves mientras que cayó de manera gradual durante la estimulación prolongada; esto es debido a que el canal Shab inactivó lentamente desde el estado abierto.

El curso temporal de la inactivación en el estado abierto del Shab (OI) se ajustó mejor a la suma de dos exponenciales ( $p < 0.001$ ). La Figura 15C, ilustra el ajuste de la corriente normalizada mostrada en la Figura 15B (línea sólida), obteniendo una constante de tiempo rápida de  $\tau_{f,OI,Na} = 0.84$  s (promedio = 0.6 s, Figura 1D), y una constante de tiempo lenta  $\tau_{s,OI,Na} = 3.3$  s (promedio 2.1 s), mientras que en el inserto se muestran los residuales del ajuste. En la Figura 15E fueron graficados los valores para las correspondientes constantes de tiempo obtenidas en diferentes potenciales despolarizantes entre -20 a +40 mV, mostrando que las constantes de tiempo de inactivación no fueron dependientes del voltaje. La constante de tiempo lenta ( $\tau_{s,OI,Na}$ ) de Shab fue similar a la de la inactivación tipo C del Shaker en condiciones iónicas equivalentes, y más rápida que la de su homólogo Kv2.1.



**Figura 15.** Inactivación del estado abierto (OI). A,  $I_K$  generada por un pulso de 30 ms a 0 mV ( $Na^+ / K^+$ ). B,  $I_K$  generada por un pulso de 12 segundos como en A. C, Inactivación normalizada de  $I_K$  en B, ajustada con la ecuación (línea sólida):  $I_K(t)/I_0 = AfNa \cdot \exp(-t/\tau_f, OI, Na) + AsNa \cdot \exp(-t/\tau_s, OI, Na) + CNa$ ; donde  $I_0$  es el pico de  $I_K$ ;  $AfNa = 0.42$  (promedio 0.3),  $\tau_f, OI, Na = 0.84$  (promedio 0.6) s;  $AsNa = 0.6$  (promedio 0.68),  $\tau_s, OI, Na = 3.3$  s (promedio 2.1); y  $CNa = 0.03$  (promedio =.05). La imagen inserta en C, muestra los residuales del ajuste. D, Constantes de tiempo de la Inactivación a 0 mV, obtenidas como en B,  $\tau_f$  = constante rápida,  $\tau_s$  = constante lenta. E, Constantes de tiempo Rápida (círculos negros) y Lenta (círculos blancos) contra voltaje (n = 8). (Carrillo et al., 2013).

Shab presenta una secuencia característica idéntica (TXTVGYGD) al Kv2.1 y a Shaker, por lo que a continuación exploramos si Shab comparte ciertas características de su inactivación con estos canales.

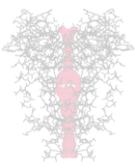


### **Inactivación tipo U:**

Para estudiar esta inactivación reportada en el Kv2.1, aplicamos pulsos despolarizantes de duración variable, utilizando ya sea un protocolo de tres pulsos o un protocolo estándar de dos pulsos. El protocolo de tres pulsos consta de: un primer pulso control ( $V_{\text{control}} = +40 \text{ mV} / 30 \text{ ms}$ ), un pulso (prepulso) de amplitud y duración variable y finalmente, un pulso de prueba igual al control. La inactivación fue evaluada como la proporción de las corrientes evocadas por el último y el primer pulso,  $I_{K,\text{prueba}}/I_{K,\text{control}}$ .

El protocolo estándar de dos pulsos, a diferencia del protocolo de tres pulsos, no incluyó el primer pulso control, y la inactivación fue evaluada como  $I_K(V)/I_{K,\text{max}}$ , donde  $I_{K,\text{max}}$  es la  $I_K$  máxima medida durante el segundo pulso de prueba que fue aplicado inmediatamente después del primer pulso (prepulso) de amplitud y duración indicadas. Con los dos tipos de protocolos se obtuvieron los mismos resultados.

En la Figura 16A se muestra la gráfica de la fracción de canales no inactivados, utilizando pulsos despolarizantes de diferente duración (0.05, 0.9, 3 y 5 s, tal y como se indica). Se observó que para pulsos de corta duración (0.05 s) se produjo una pequeña inactivación en todos los voltajes explorados. Al incrementar la duración del prepulso (0.9 s) la fracción de los canales que inactivan se incrementó, y los puntos en la curva IV adquirieron una forma de tipo U (Cheng et al., 2011; Klemic et al., 1998, 2001). En la Figura 16B, se muestra un registro con prepulsos de duración de 0.9 s a voltajes de -20 y +20 mV, en este caso se observó en la curva que la  $I_{K,\text{prueba}}$  a +40 mV, siguiendo al prepulso de +20 mV, fue más grande que la  $I_{K,\text{prueba}}$  que sigue al prepulso de -20 mV. Sin embargo con una duración de 0.9 s se pudo observar que la duración del pulso no es suficiente largo para que la corriente alcance el estado estacionario. Cuando fue incrementada la duración del pulso a 3 s y 5 s, la inactivación se aproximó de manera progresiva a un estado estacionario, en estas condiciones la forma U de la curva de inactivación fue menos evidente (Figura 16A).

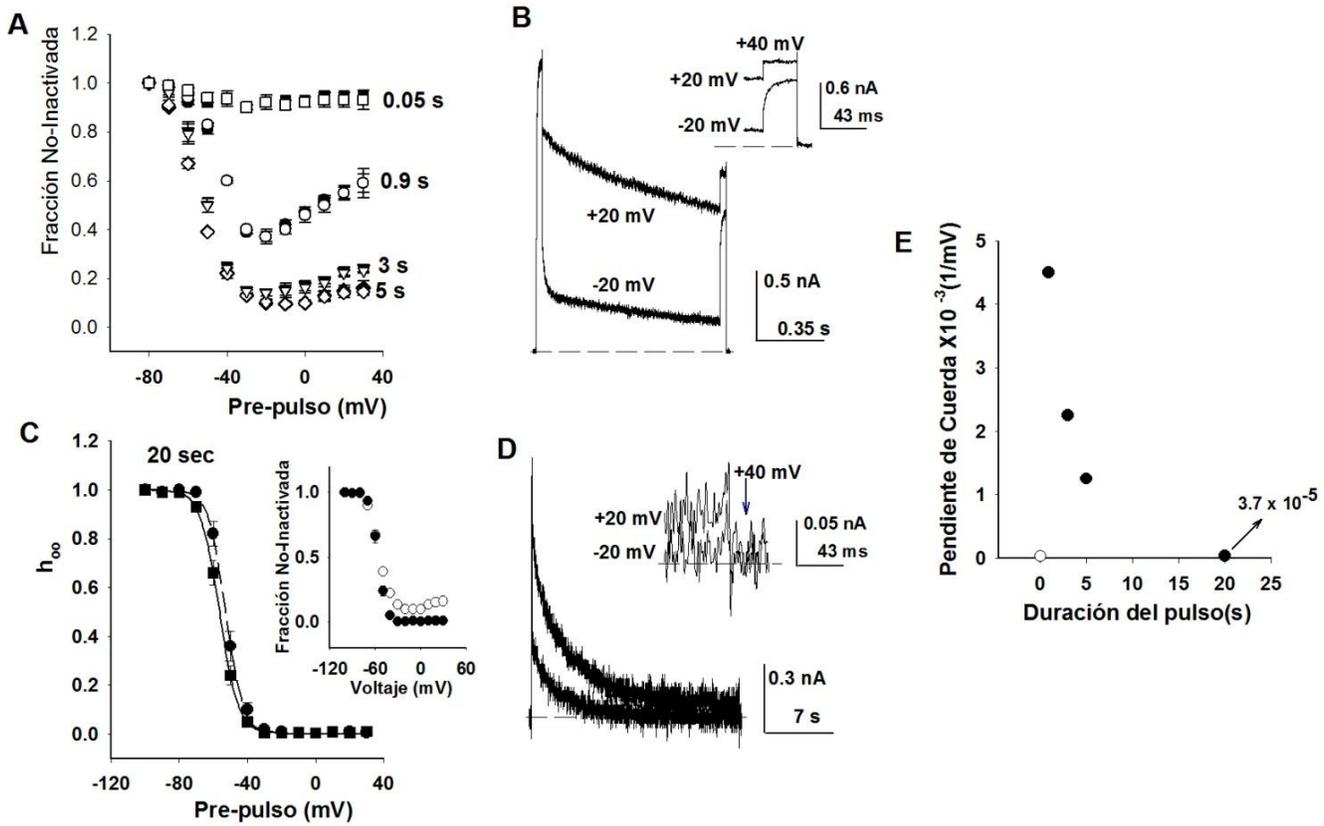
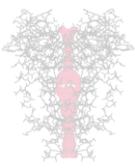


La forma de U durante la curva de inactivación desaparece cuando la duración del pulso fue lo suficientemente largo (20 s, Figura 16C), generando condiciones cercanas al estado estacionario, y donde la curva de inactivación siguió la ecuación de Boltzmann ( $h_{\infty}$ ). En el inserto de la Figura 16C también se pueden observar las curvas obtenidas con 3 y 20 s de duración del prepulso. La misma curva de Boltzmann fue obtenida utilizando soluciones de  $\text{Na}^+$  y 100 mM de  $\text{K}^+$  (Gomez-Lagunas 2007).

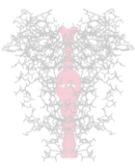
47

En la Figura 16D se muestra  $I_K$  con un prepulso de 20 s, a dos voltajes diferentes, uno a -20 mV y el otro a +20 mV. La corriente al final del tercer pulso del protocolo, a +40 mV, tiene una amplitud que apenas se distingue del ruido (ver inserto).

Las curvas tipo U que se obtienen con pulsos breves ( $\leq$  constante de tiempo), presentaron una pendiente positiva a potenciales positivos, Figura 16A; mientras que cuando los pulsos son prolongados ( $\gg$  constante de tiempo), Figura 16C, la curva de inactivación de Shab se ajustó bajo condiciones cercanas al estado estacionario, es decir la  $I_K$  se aproximó a 0 cuando  $V \gg V_{1/2}$ . Esto se ilustra en la Figura 16E, donde se graficó la pendiente de cuerda obtenida con el promedio relativo de las corrientes seguidas del prepulso de -20 y +20 mV  $\{[I_{rel}(+20 \text{ mV}) - I_{rel}(-20 \text{ mV})]/40\}$ , a diferentes duraciones. La magnitud de la pendiente nos indica que tan marcada es la curva en forma de U. El incremento de la duración del prepulso, acercándose al estado estacionario, la pendiente cae abruptamente hacia 0, así como en la ecuación de Boltzmann. El círculo blanco presenta un alejamiento de la tendencia general (círculos negros), lo cual se debe a que el pulso es demasiado corto (0.05 segundos) para producir una inactivación significativa (Figura 16A).



**Figura 16.** Curvas de Inactivación. A, La Inactivación se exploró a diferentes tiempos, como se indica, utilizando un protocolo de tres (círculos negros) o 2 (círculos blancos) pulsos. B,  $I_K$  obtenida con el protocolo de tres pulsos, con un prepulso de 0.9 segundos de -20 o +20 mV. En el inserto, se observa la  $I_K$  al final del pulso de forma expandida. C, Curva de Inactivación  $h_\infty$ , obtenida a partir de un prepulso de 20 segundos de duración. La línea es el ajuste de los puntos con la ecuación de Boltzmann  $h_\infty = 1/(1+\exp[(zF/RT)(V_m-V_{1/2}])$ , con parámetros  $V_{1/2} = -56.3$  mV,  $z = 4.6$ . Inserto: Inactivación después de 3 (círculos blancos) o 20 (círculos negros) segundos. D,  $I_K$  obtenida como en B, con un pulso de duración de 20 segundos. En el inserto se muestra la  $I_K$  al final del pulso a +40 mV. E, Pendiente de cuerda, entre -20 y +20 mV, como una función de la duración prepulso. Los puntos son el promedio  $\pm$  ER de al menos 4 experimentos. (Carrillo et al., 2013).



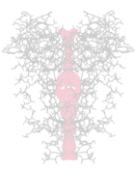
Resultó claro entonces que el canal Shab presentó curvas de inactivación en forma de U cuando el proceso no se encontró cerca del estado estacionario. Sin embargo cuando la inactivación estuvo cerca del estado estacionario las curvas en forma de U se desvanecieron. Por tal razón las curvas tipo U podría considerarse como un fenómeno incompleto de inactivación, que cursa durante la inactivación de los canales al no estar en estado estacionario. Con base en esto consideramos que el Shab no presenta una inactivación en forma de U.

### ***La inactivación de Shab no es tipo C***

Efectos del  $\text{TEA}^+$  y  $\text{K}^+$  en la inactivación de estado abierto.

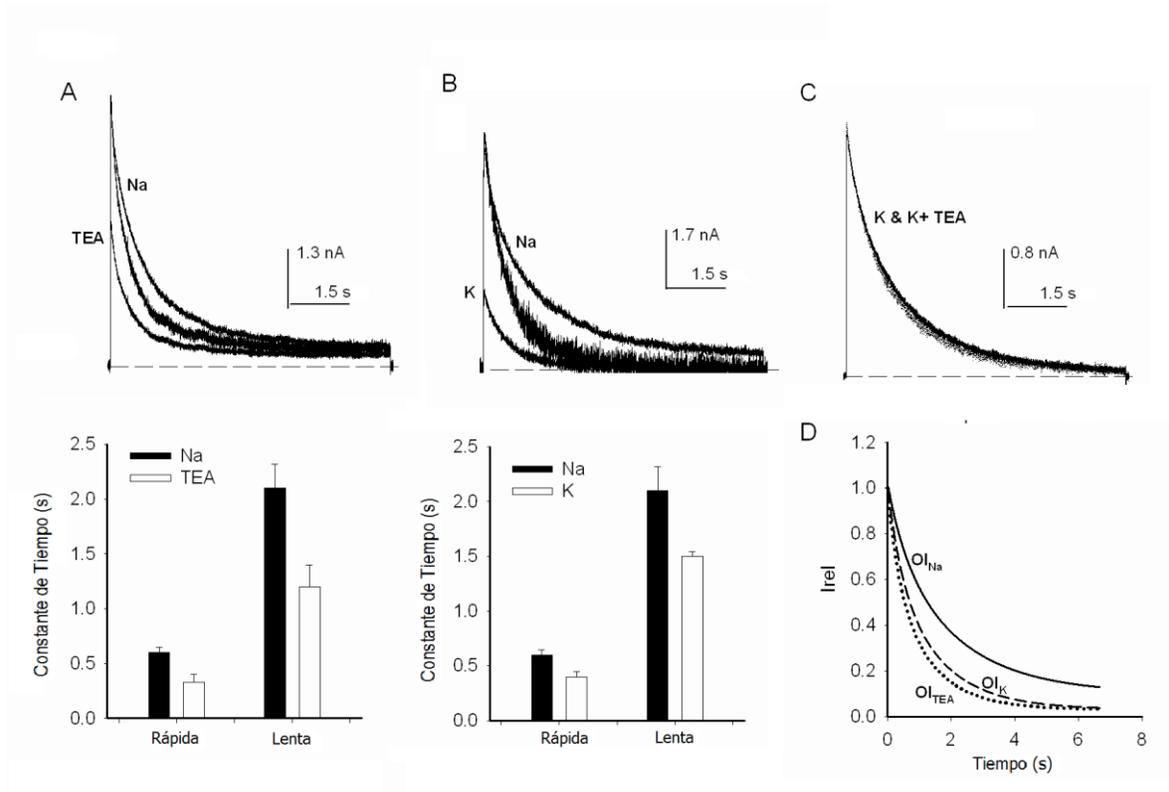
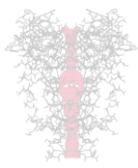
Los determinantes moleculares que se han estudiado en otros canales y que tienen que ver con el sitio de unión al  $\text{TEA}^+$  (T449 en el Shaker) y  $\text{K}^+$  (Y373/Y445 en la quimera Kv1.2-2.1), también fueron estudiados en el canal Shab.

Para determinar si el canal Shab sigue un mecanismo de inactivación tipo C, probamos  $\text{TEA}^+$  y  $\text{K}^+$  en la inactivación de estado abierto (OI) con pulsos despolarizantes de 7 s de duración. En la Figura 17A (izquierda) se puede observar que la adición de  $\text{TEA}^+$  (15 mM) inhibió ~50 % de los canales. Durante la inactivación las corrientes en condiciones control ( $I_K$  en  $\text{Na}^+$ ) y en presencia de el  $\text{TEA}^+$  presentaron dos constantes de tiempo (Figura 17A, derecho), se observó que el proceso se hizo más rápido en presencia de  $\text{TEA}^+$ , disminuyendo por lo tanto las constantes de tiempo (~44%, constante rápida ( $p = 0.02$ ,  $n = 4$ ) y lenta ( $p = 0.023$ ,  $n = 4$ )), pero sin cambiar significativamente sus amplitudes relativas. Para una mejor comparación, en la Figura 17A se escaló la  $I_K$  en presencia de  $\text{TEA}^+$  con respecto al pico de la  $I_K$  en  $\text{Na}^+$ . Se observó que el  $\text{TEA}^+$  facilitó la inactivación del canal Shab, presentando un efecto opuesto del  $\text{TEA}^+$  durante la Inactivación tipo C.



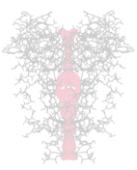
A continuación exploramos el efecto del  $K^+_o$  en la inactivación del Shab. En la Figura 17B del lado izquierdo, se comparo las  $I_K$  activadas a +20 mV con pulsos de 7 s, en condiciones control ( $Na^+_o$ ) y con 100 mM de  $K^+_o$ , se pudo observar que la  $I_K$  en 100 mM  $K^+_o$  es menor que en  $Na^+_o$ , debido a que en 100mM de  $K^+_o$  el voltaje de estimulación es cercano al potencial de equilibrio de  $K^+$ . Para comparar su cinética, fue escalada la  $I_K$  en 100 mM  $K^+_o$  con respecto al pico de la  $I_K$  en  $Na^+_o$  (registro intermedio). Como puede observarse el  $K^+_o$  aceleró la inactivación, en Figura 17B (derecha) se muestra que las constantes de tiempo disminuyeron (~30%), tanto la rápida ( $p = 0.027$ ) como la lenta ( $p = 0.019$ ). En el caso del  $TEA^+_o$ , el bloqueo no se modifica en presencia o ausencia de  $K^+_o$ . En la Figura 17C, se encuentran superpuestas las  $I_K$  en 100 mM  $K^+_o$  y en 100 mM  $K^+_o + 15$  mM  $TEA^+_o$ , mostrando que los efectos de  $K^+_o$  y  $TEA^+_o$  no fueron aditivos. En la Figura 17D se graficó la curva de los mínimos cuadrados que ajustan la OI, como se indica.

El  $TEA^+_o$  y  $K^+_o$  facilitó la inactivación, lo cual sugirió que su mecanismo no involucró modificaciones de la boca extracelular del poro.



**Figura 17.** Efecto de  $TEA^+$  y  $K^+$  sobre OI. A, Superior,  $I_K$  generada por un pulso despolarizante a 0 mV / 7 s, en condiciones control (Na) y en presencia de 15 mM de TEA. El trazo intermedio es  $I_K$  con TEA escalada a  $I_K$  control. OI sigue el mismo curso temporal que la figura 1C:  $lk(t)/I_0 = Af \cdot \exp(-t/\tau_f, OI) + As \cdot \exp(-t/\tau_s, OI) + C$ ;  $I_0$  es  $I_K$  pico;  $\tau_{f, OI, TEA} = 0.33 \pm 0.07$ ,  $\tau_{s, OI, TEA} = 1.2 \pm 0.22$ ,  $Af_{TEA} = 0.28 \pm 0.07$ ,  $As_{TEA} = 0.65 \pm 0.07$ ,  $C_{TEA} = 0.06 \pm 0.02$ . Inferior, Constantes de tiempo promedio en  $Na^+$  y en 15 mM  $TEA^+$ .  $TEA^+$  disminuye significativamente ambas constantes ( $p < 0.05$ ). B, Superior,  $I_K$  generada a +20 mV/7 s en condiciones control (Na) y en presencia de 100 mM de  $K^+$ . El trazo intermedio es  $I_K$  escalada al pico de  $I_K$  control. Inferior, constantes de tiempo en presencia de 100 mM de  $K^+$  y en  $Na^+$ . C,  $I_K$  superpuestas en condiciones de 100 mM de  $K^+$  y en 15 mM de  $TEA^+$ . D, Curso temporal de OI. La línea es el ajuste de mínimos cuadrados de OI con: ( $n = 6$ )  $\tau_{f, OI, K} = 0.4 \pm 0.05$  s,  $\tau_{s, OI, K} = 1.5 \pm 0.04$  s,  $Af_K = 0.34 \pm 0.13$ ,  $As_K = 0.64 \pm 0.12$ ,  $C_K = 0.02 \pm 0.008$ ;  $Na^+$   $\tau_{f, OI, Na} = 0.6 \pm 0.05$  s,  $\tau_{s, OI, Na} = 2.1 \pm 0.22$ ,  $Af_{Na} = 0.3 \pm 0.02$ ,  $As_{Na} = 0.68 \pm 0.03$ ,  $C_{Na} = 0.05 \pm 0.01$ . (Carrillo et al., 2013).

Entonces evaluamos si el Shab presentaba inactivación de estados cerrados (CI), para así poder determinar si fue necesario que el poro tuviera que abrirse para que el  $K^+$  y el  $TEA^+$  afectaran la inactivación.



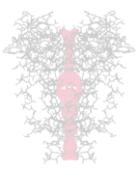
### **Inactivación de estados cerrados.**

Se utilizaron pulsos cortos (20 ms) despolarizantes (a 0 mV ó +20 mV) de forma repetitiva, con los que fueron activados los canales sin permitir el desarrollo significativo de OI, y aplicados con una frecuencia alta, esto excluyó la recuperación significativa de la inactivación que pudiera desarrollarse entre pulsos consecutivos ( $1.3 \times 10^{-4}$  Hz).

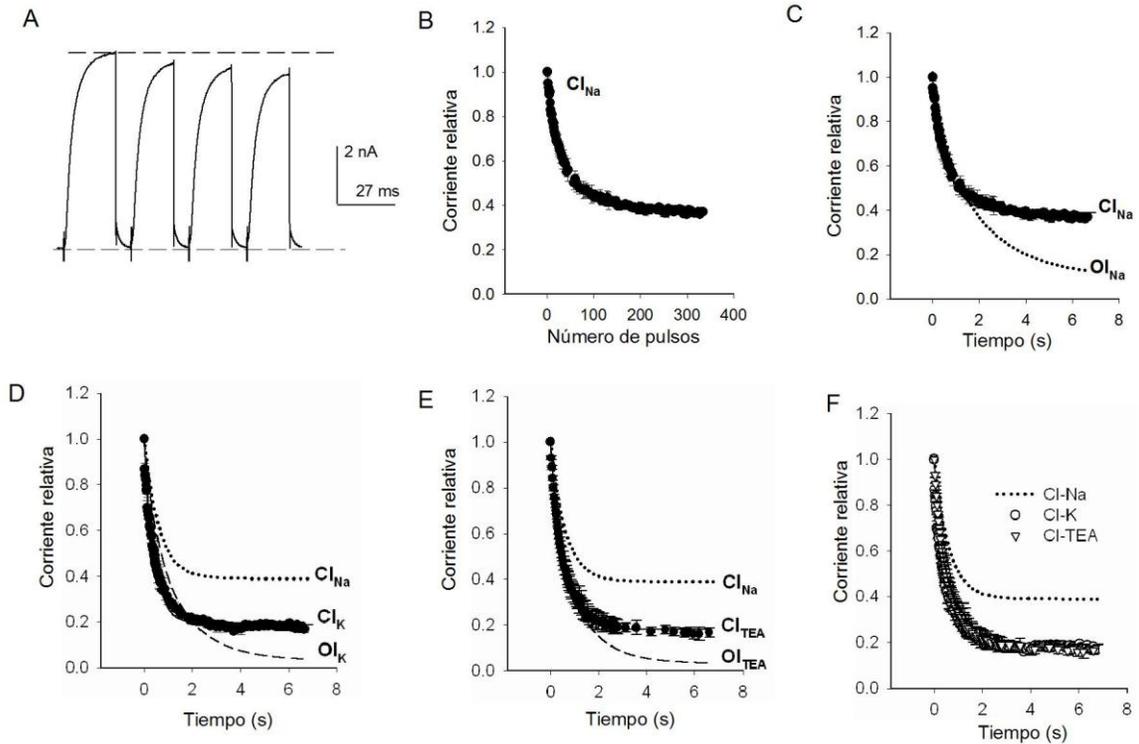
La Figura 18A ilustra la  $I_K$  evocada por los primeros cuatro pulsos. Se puede observar que aun cuando la corriente no presentó OI,  $I_K$  disminuyó con cada pulso consecutivo, indicando un proceso de inactivación de estados cerrados (CI). En la Figura 18B está graficada la corriente relativa  $I_K$  como una función del número de pulsos, y en la Figura 18C se muestra el curso temporal de  $I_K$ . La CI sigue un curso temporal que se ajustó a una sola exponencial (línea sólida), con una constante de tiempo de  $\tau_{CI,Na} = 0.61$  seg, y una constante  $C_{Na} = 0.39$ , la cual indica la fracción de canales que no inactivaron durante su transición a través de los estados cerrados, a ese voltaje. La  $\tau_{CI,Na}$  a  $-80$  mV, es similar a la constante de tiempo rápida de OI.

En la Figura 18D se muestran el curso temporal de  $I_K$ , durante la inactivación de estados cerrados en presencia de  $Na^+_o$  ( $CI_{Na}$ ) y en  $100$  mM  $K^+_o$  ( $CI_K$ ), en comparación con la inactivación de estado abierto ( $OI_K$ ) en presencia de  $100$  mM de  $K^+_o$ .  $I_K$  en  $100$  mM de  $K^+_o$  cae a lo largo del tiempo y se ajusta a una sola exponencial, donde los canales inactivan desde los estados cerrados, con constantes de tiempo:  $\tau_{CI,K} = 0.4$  seg,  $C_K = 0.2$ .  $CI_K$  es una inactivación más rápida y más completa ( $p < 0.01$ ) en comparación con  $CI_{Na}$ .

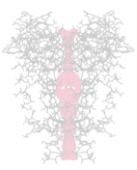
En la Figura 18E se muestra el efecto del  $TEA^+_o$  sobre la CI. Se observa que la caída de  $I_K$ , en presencia de  $TEA^+_o$ , sigue una sola exponencial,  $\tau_{CI,TEA} = 0.5$  seg y  $C_{TEA} = 0.19$ . Al igual que  $CI_K$ ,  $CI_{TEA}$  es más rápida y completa que en condiciones control ( $p < 0.01$ ). En la Figura 18F, se compara la CI en diferentes condiciones,  $CI_{Na}$ ,  $CI_K$ , y en presencia de  $15$  mM de  $TEA^+_o$  ( $CI_{TEA}$ ). La  $CI_K$  y la  $CI_{TEA}$  fueron más rápidas y completas que en  $CI_{Na}$ . Estos datos nos indican que el



$K^+$  y  $TEA^+$  facilitan la inactivación, tanto en estado abierto como en estados cerrados, y refuerza la idea que la inactivación del Shab no es del tipo C como en el Shaker.



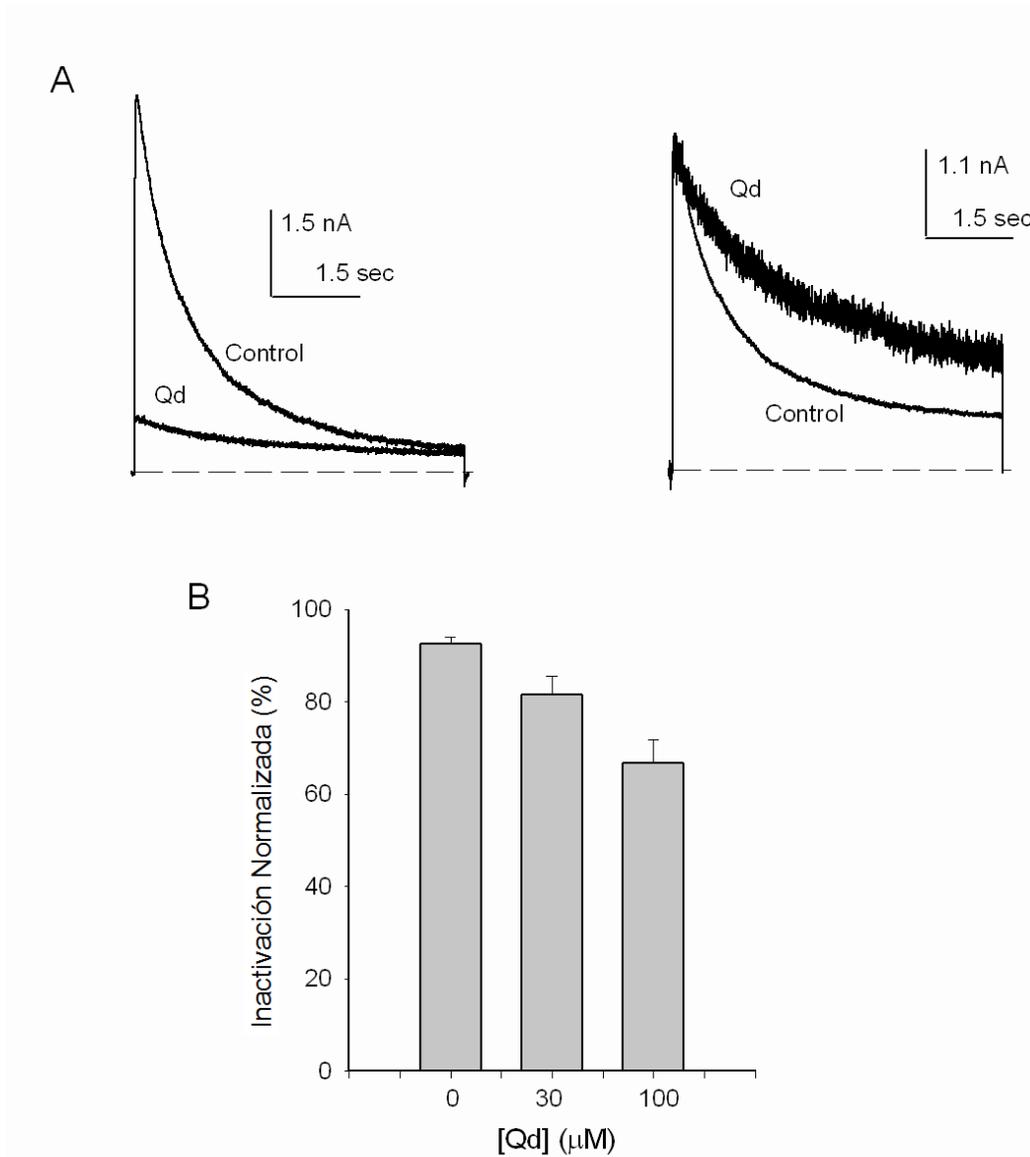
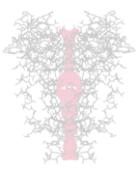
**Figura 18.** Inactivación de estados cerrados (CI). A,  $I_K$  generada por 4 pulsos consecutivos a 0 mv / 20 ms, aplicados a  $1.3 \times 10^{-4}$  Hz ( $Na^+_o/K^+_i$ ). B,  $I_K$  relativa como función del número de pulsos, obtenida como en A. C, Puntos de la gráfica en B, ahora graficados como  $I_K$  relativa contra tiempo ( $CI_{Na}$ , círculos negros). La línea sólida es el ajuste de los puntos con la ecuación:  $I/I_0 = A \exp(-t/\tau) + C$ , donde I es  $I_K$  al tiempo t, lo es  $I_K$  a  $t = 0$ ;  $\tau_{CI,Na} = 0.61$  s,  $A_{Na} = 0.61$ ,  $C_{Na} = 0.39$ . La línea punteada es la curva que ajusta el curso temporal de  $OI_{Na}$ . D, curso temporal de CI con 100 mM de  $K^+_o$  (círculos negros,  $CI_K$ ). La línea sólida es el ajuste de mínimos cuadrados de los puntos con  $\tau_{CI,K} = 0.4$  s,  $A_K = 0.8$  y  $C_K = 0.19$ . Línea troncada, representa el curso temporal de  $OI_K$ ; y la línea punteada representa el curso temporal de  $CI_{Na}$ . E,  $CI_{TEA}$ : Promedio de la  $I_K$  contra tiempo en presencia de 15 mM  $TEA^+_o$  (círculos negros). La línea es el ajuste de los puntos con  $\tau_{CI,TEA} = 0.5$  s,  $C_{TEA} = 0.18$  y  $A_{TEA} = 0.82$ . Línea troncada: curso temporal de  $OI_{TEA}$ ; Línea punteada muestra el curso temporal de  $CI_{Na}$ . F, Curso temporal de CI comparando condiciones control ( $Na^+_o$ ) contra  $K^+_o$  y  $TEA^+_o$ . HP = -80 mV. Los puntos son el promedio  $\pm$  el error estándar de al menos 4 experimentos en cada condición. (Carrillo et al., 2013).



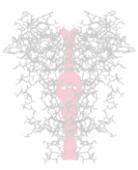
### ***Inhibición de la inactivación por el bloqueador intracelular Quinidina (Qd).***

El canal Shab no presentó inactivación tipo C, por lo cual decidimos explorar si su inactivación involucró cambios en regiones más internas del poro. Decidimos entonces utilizar a la droga quinidina. Esta droga al adicionarse a la solución extracelular permea la membrana bloqueando desde el lado intracelular al poro de Shab en su estado abierto.

Para evocar la  $I_K$  fue aplicado un pulso despolarizante a 0 mV con una duración de 7 s. La solución extracelular que se empleó fue 5 mM  $K^+$ , a la cual le fue adicionado 0.03 ó 0.1 mM de Qd. En la Figura 19A (izquierda), se ilustra una respuesta control y en la presencia de Qd (0.1 mM). La droga bloquea al Shab, reduciendo la amplitud de  $I_K$  y enlenteciendo la inactivación. También en la Figura 19A (derecha), se muestra la  $I_{K-Qd}$  escalada con la  $I_K$  control, mostrando la inhibición de la inactivación por Qd. En la Figura 19B fueron graficadas los porcentajes de la inactivación obtenidos en las diferentes condiciones: en el control (0 Qd;  $92.6 \pm 1.4\%$ ,  $n = 5$ ), en la presencia de 0.03 ( $81.6 \pm 4\%$ ,  $n = 5$ ;  $p = 0.0318$ ) y de 0.1 mM de Qd ( $66.8 \pm 5\%$ ,  $n = 5$ ;  $p = 0.0011$ ). Esto sugirió que la cavidad central del poro participó en la inactivación lenta de Shab.

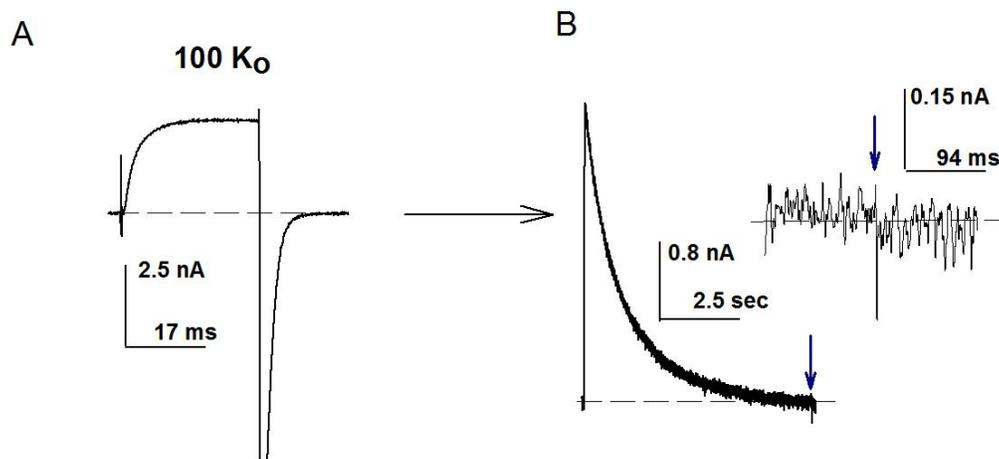


**Figura 19.** El bloqueo de  $I_K$  por Quinidina inhibe la inactivación. A, Izquierdo,  $I_K$  generada por un pulso despolarizante de 0 mV/7 segundos en condiciones control (5 mM de  $K^+_o$ ) y en presencia de Qd (5 mM de  $K^+_o$  + 0.03 mM de Qd). Derecha,  $I_K$  en presencia de Qd escalada a la corriente al pico de  $I_K$  control. B, Grafica de inactivación vs. [Qd]. (Carrillo et al., 2013).

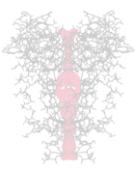


## Recuperación de la inactivación

Para investigar si la recuperación de la inactivación incluyó la reapertura del canal desde el estado inactivado, comparamos la corriente al final de un pulso corto (+20 mV/30 ms), que no provocó inactivación de los canales, con la corriente al final de un pulso largo (+20 mV/ 7 segundos) que inactivo la mayoría de los canales, en presencia de 100 mM de  $K^+_o$ . Durante la repolarización a -80 mV después del pulso corto fue generada una corriente de cola (Figura 20A). A diferencia del pulso largo, en el que al momento de la repolarización no fue apreciable la corriente de cola (Figura 20B). Esto indicó que el Shab no se abrió desde estados inactivados, o que la apertura fue muy lenta e  $I_K$  se confunde con el ruido.



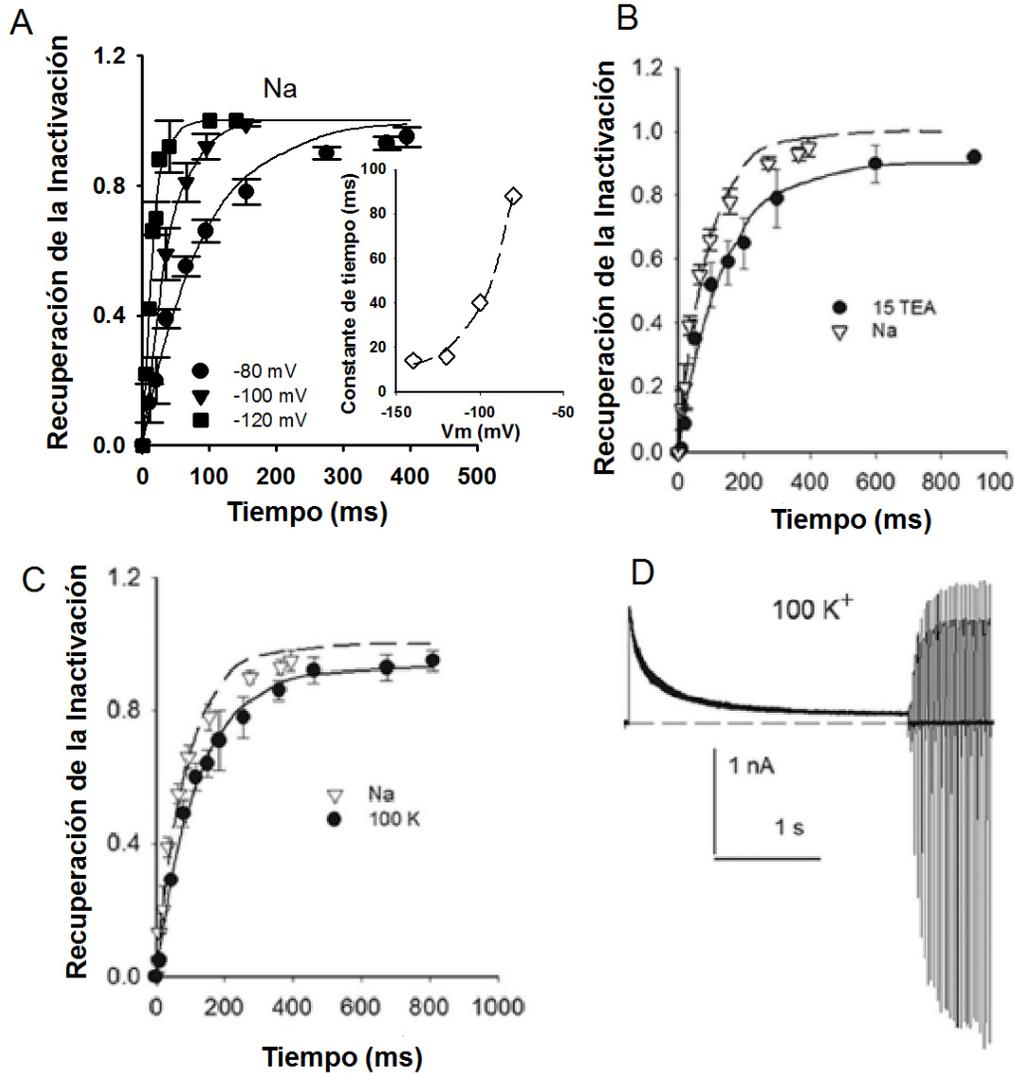
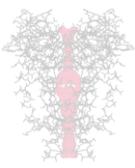
**Figura 20.** Recuperación de la Inactivación pasando por el estado abierto. A,  $I_K$  generada por un pulso a +20 mV/20 ms, en presencia de 100 mM de  $K^+_o/K^+_i$ . B,  $I_K$  generada en la misma célula por un pulso a +20 mV/7 segundos. En la figura inserta, se muestra la corriente al final del pulso a mayor ampliación. HP = -80 mV. (Arias-Olguín et al., 2013).



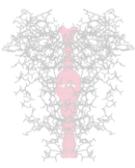
Para estudiar más a fondo los efectos de  $\text{TEA}^+$  y  $\text{K}^+$  en la inactivación y poner a prueba nuestra hipótesis de que Shab tiene la misma conformación inactivada de estados abierto y cerrados, a continuación exploramos la recuperación del proceso de inactivación.

Caracterizamos la cinética de recuperación de la OI aplicando un pulso de 7 a 12 s a +20 mV para abrir e inactivar a los canales, seguido por un pulso de prueba a +20 mV con duración de 30 ms (Figura 21D). En la Figura 21A se muestra que la recuperación de la inactivación siguió una sola fase exponencial que fue más rápida (ver inserto) conforme el voltaje de mantenimiento fue más negativo.

La recuperación de la inactivación en condiciones de  $\text{Na}^+$  presentó una constante de tiempo de 80 ms. En la presencia de 15 mM  $\text{TEA}^+$  fue de 132 ms (Figura 21B) y para 100 mM de  $\text{K}^+$  fue de 121 ms (Figura 21C). La recuperación de la inactivación fue más lenta en presencia de  $\text{TEA}^+$  o  $\text{K}^+$  en comparación con  $\text{Na}^+$ , incrementándose las constantes de tiempo ( $p < 0.05$ ). La comparación de las constantes de tiempo mostraron que la recuperación fue más rápida que la inactivación.



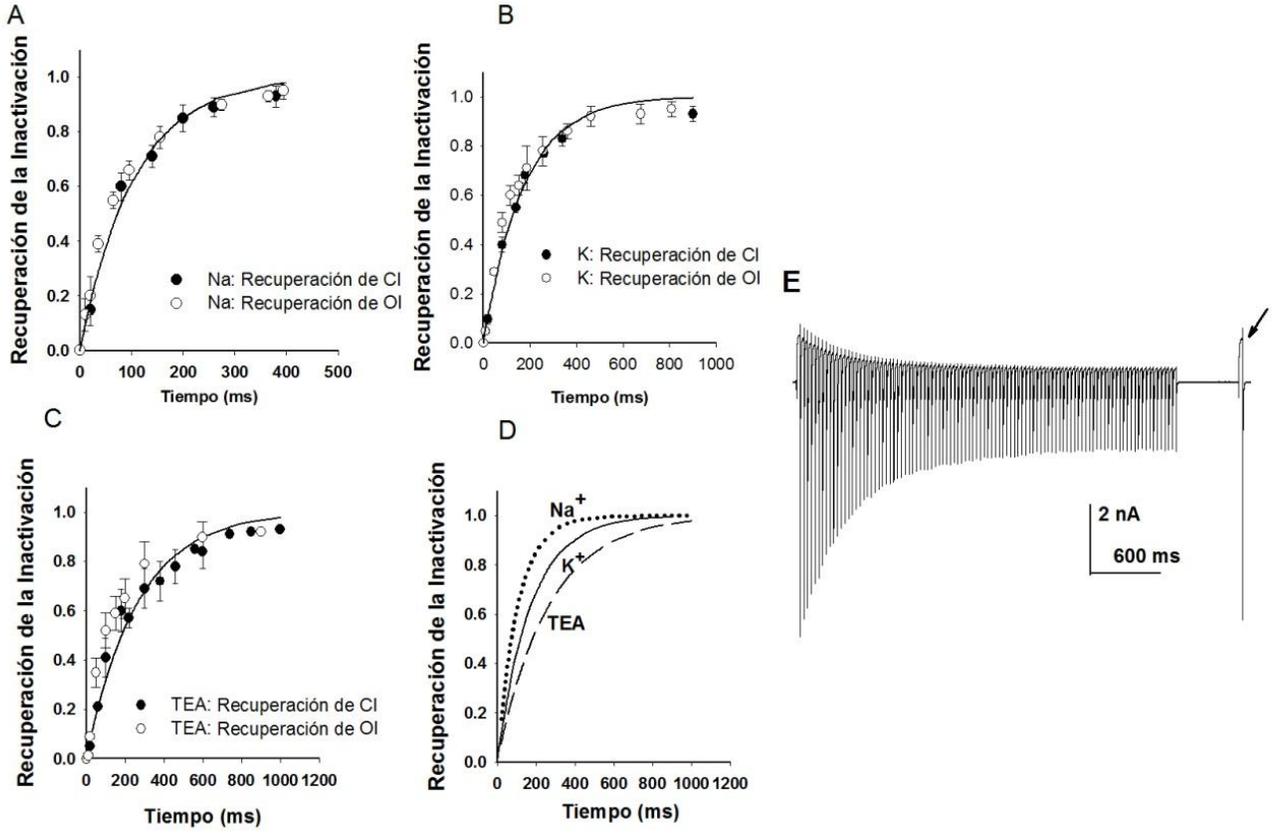
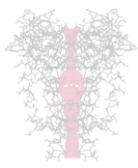
**Figura 21.** Recuperación de OI. A, Recuperación de la Inactivación en función del tiempo y mV. La recuperación de la Inactivación se evaluó como:  $y = (I_{pico1} - I_{final1}) / (I_{prueba} - I_{final1})$ , donde  $I_{pico1}$  y  $I_{final1}$  son  $I_K$  al pico e  $I_K$  al final del primer pulso;  $I_{prueba}$  es generada por un pulso de prueba. Las líneas son los ajustes de los puntos con la ecuación:  $y = 1 - \exp(-t/\tau_r, Na)$ ;  $\tau_r, Na$ : -80 mV: 76.3 ms; -100 mV: 40.1 ms; -120 mV: 16 ms. En el Inserto se muestra: grafica  $\tau_{r,Na}$  contra  $V_m$ . B, Efecto de 15 mM de  $TEA^+$  sobre la recuperación a -80 mV. C, Efecto de 100 mM de  $K^+$  a -80 mV. D,  $I_K$  en la recuperación de la Inactivación en presencia de 100 mM de  $K^+$ . (Arias-Olguín et al., 2013).



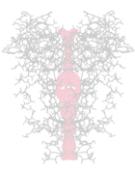
Por otro lado, para la recuperación de la CI, el primer pulso largo del protocolo utilizado para estudiar la recuperación de OI fue sustituido por 100 pulsos cortos (20 mV/20 ms) aplicados en  $1.3 \times 10^{-4}$  Hz. En la Figura 22E se ilustra la recuperación de la  $I_K$  (señalado por la flecha) en 100 mM de  $K^+_o$ , 500 ms después del tren de pulsos cortos.

El curso temporal de la recuperación de la CI, en condiciones de  $Na^+_o$ , (Figura 22A, círculos negros) se comparó con la recuperación de OI (círculos blancos), se observó que tanto la recuperación de CI ( $\tau_{rCI,Na} = 105$  ms) como de OI ( $\tau_{rOI,Na} = 90$  ms) siguieron el mismo curso temporal ( $p = 0.053$ ). En la Figura 22B se muestra la recuperación de la CI (círculos negros,  $\tau_{rCI,K} = 147$  ms) y de la OI (círculos en blanco,  $\tau_{rOI,K} = 121$  ms) en la presencia de 100 mM  $K^+_o$ , donde de manera similar al anterior, presentaron el mismo curso temporal de recuperación ( $p = 0.0767$ ).

Un caso diferente fue observado cuando realizamos el experimento en condiciones de 15 mM  $TEA^+_o$ , donde observamos que la recuperación de la CI ( $\tau_{rCI,TEA} = 207$  ms) y de la OI ( $\tau_{rOI,TEA} = 132$  ms) siguieron un curso temporal estadísticamente diferente ( $p = 0.0208$ ). En la Figura 22D se comparó únicamente la recuperación de la CI para las tres condiciones iónicas, mostrando que la recuperación de la inactivación se enlenteció con  $K^+_o$  y  $TEA^+_o$  ( $p < 0.05$ ), en comparación con la condición de  $Na^+_o$ . Esto es, el  $K^+_o$  y el  $TEA^+_o$  aceleraron la entrada a la inactivación y enlentecieron la salida de la misma.



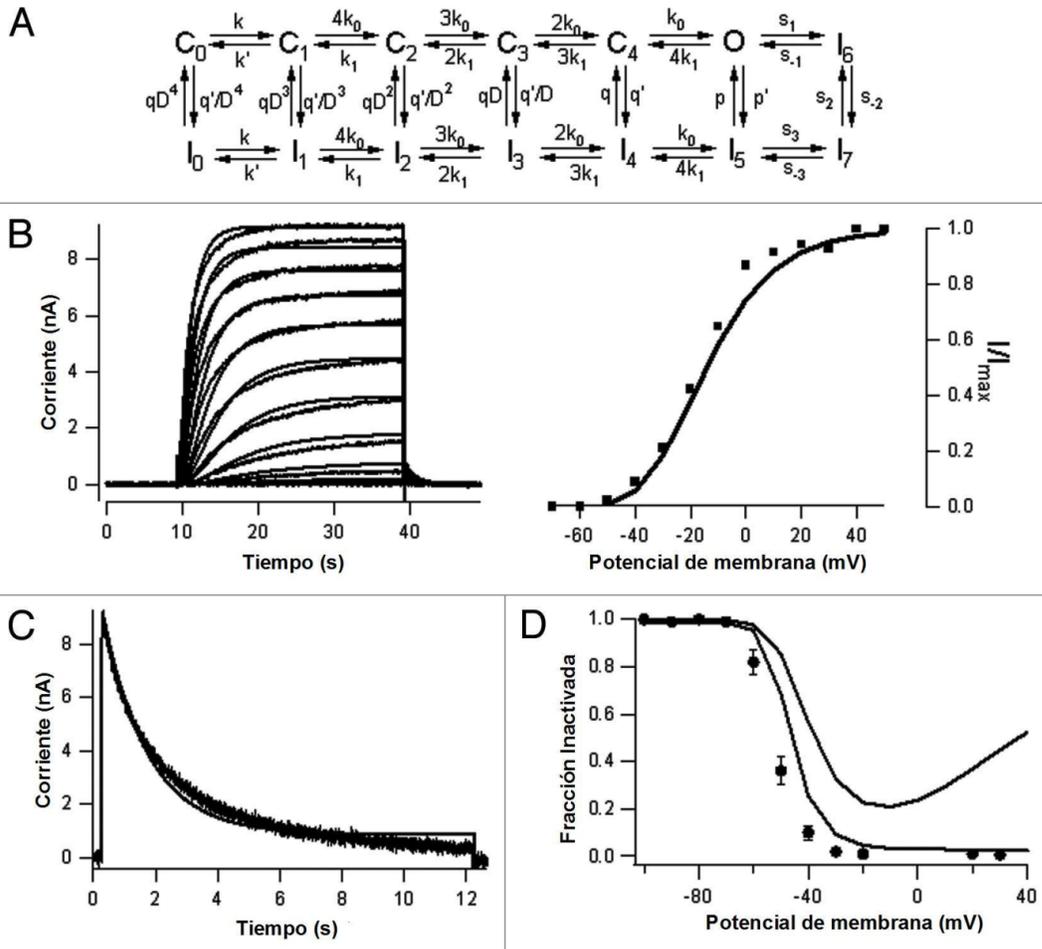
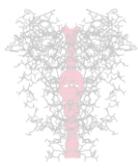
**Figura 22.** Recuperación de Inactivación desde estados cerrados (CI). A, Recuperación de la inactivación en CI (círculos negros) y OI (círculos blancos), en solución de Na<sup>+</sup><sub>o</sub>/ K<sup>+</sup><sub>i</sub>. La recuperación fue evaluada como:  $y = (I_{prueba} - I_{100}) / (I_1 - I_{100})$ , donde I<sub>1</sub> es I<sub>K</sub> en el primer pulso, I<sub>100</sub> – es el pulso inactivante número 100, y I<sub>prueba</sub> es la I<sub>K</sub> en el pulso de prueba. La línea es el ajuste de los puntos con la ecuación:  $y = 1 - \exp(-t/\tau_{CI})$ ,  $\tau_{CI,Na} = 119$  ms. B, Recuperación de la Inactivación de CI y OI en presencia de 100 mM de K<sup>+</sup><sub>o</sub>. C, recuperación de la Inactivación de CI y OI en presencia de 15 mM de TEA<sup>+</sup><sub>o</sub>. D, Curvas de ajustes de mínimos cuadrados en cada condición, Control (Na<sup>+</sup><sub>o</sub>), 100 mM de K<sup>+</sup><sub>o</sub>, 15 mM de TEA<sup>+</sup><sub>o</sub>. E, Registro de I<sub>K</sub> que ilustra la recuperación de la Inactivación después de 500 ms a -80 mV, en 100 mM de K<sup>+</sup><sub>o</sub>. (Arias-Olguín et al., 2013).



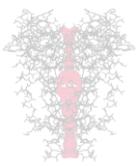
### **Modelo cinético de la Inactivación de Shab.**

Las observaciones reportadas en este estudio fueron resumidas en un modelo cinético (Figura 23, Tabla 1). El modelo usado, es una extensión de un esquema cinético desarrollado para explicar el efecto del fármaco antiinflamatorio celecoxib sobre la actividad del Shab (Arias-Olguin et al., 2011). El modelo consiste en cinco estados cerrados (C0 a C4) y un solo estado abierto (O). La inactivación se desarrolla desde estados abierto y cerrados, de manera acoplada. Como resultado de los diferentes valores de las constantes de velocidad de inactivación, a lo largo de la ruta de activación (Tabla 1), la probabilidad de que la inactivación se incremente depende de que los canales se aproximen a la conformación abierta.

En el modelo fueron etiquetados cada uno de los estados cinéticos con diferentes números, sin embargo en el estado I (inactivado) representa la misma conformación inactivada de la proteína, independientemente del subíndice que tenga en el esquema. También, como los canales no conducen durante la recuperación de la inactivación, a la transición de I6 a O se le asignó una velocidad pequeña (Tabla 1). El modelo reproduce la activación del canal (Figura 23B), así como la inactivación (Figura 23C). Además el modelo también reproduce la curva de inactivación en forma de U (Figura 23D), cuando las despolarizaciones son demasiado cortas para acercarse a las condiciones de estado estacionario (0.9 s), así como la curva  $h^\infty$  de Boltzmann, en condiciones cercanas al condiciones de estado estacionario.



**Figura 23.** Modelo cinético de la inactivación de Shab. A, Modelo cinético de la inactivación de Shab. B, Comparación de las predicciones del modelo con la activación dependiente de voltaje del Shab. Izquierda, se muestra un buen ajuste entre el modelo y los datos durante pulsos cortos de -50 a +50 mV. Derecha, La curva G-V, se graficó como la fracción de corriente activada. C, Predicción del modelo de inactivación lenta. Para pulsos largos, el modelo presenta un buen ajuste. D, Curva de inactivación. Para pulsos inactivantes largos (12 s, trazo negro) el modelo predice un incremento monótono incrementando la inactivación a potenciales despolarizantes, como en la curva de Boltzmann, mientras para pulsos cortos (5 s) la inactivación presenta una forma de U, como consecuencia de que es canal no se encuentra en estado estacionario. El modelo se resolvió usando la integración Runge-Kutta implementado en programas escritos como en Igor Pro (Wavemetrics). El tiempo y la probabilidad de apertura dependiente de voltaje del estado abierto ( $P_o$ ) fue transformada en corriente de acuerdo a:  $I(t,V) = p_o(t,V) \times N \times (V - V_{rev}) \times g_s$ . Donde V es el voltaje aplicado,  $V_{rev}$  es el potencial de inversión estimado a partir de la ecuación de Nernst para el potasio, N es el número de canales y  $g_s$  es la conductancia de un solo canal, el cual nosotros fijamos a 20 pS. (Arias-Olguín et al., 2013).



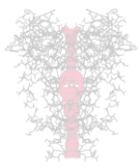
Constantes de velocidad en $s^{-1}$ 0 mV	Carga (en $e_0$ )
$k_0 = 700$	0.7
$k_1 = 50$	-0.9
$q = 2.2$	0.7
$q' = 0.1$	-0.6
$p = 0.05$	0.1
$p' = 0.06$	0.2
$s_2 = 35$	0
$s_{-2} = 0.3$	0
$k = 240$	0.5
$k' = 130$	-0.5
$s_1 = 0.03$	0.1
$s_{-1} = 0.1$	-0.1
$s_3 = 3$	0
$s_{-3} = 7$	0

Tabla 1. Constantes de velocidad del modelo de Shab. A, La voltaje dependencia de las constantes de velocidad es implementada en el modelo como ecuaciones exponencial de la forma:  $k_i(V) = k_i(0) \exp(z_i V / kT)$ , donde  $k_i(V) = k_i(0) \exp(Z_i V / kT)$ , donde  $k_i(V)$  es la constante de velocidad al voltaje  $V$ ,  $k_i(0)$  es 0 mV,  $z_i$  es la carga asociada con la transición y  $k$  y  $T$  son constantes de Boltzmann y la temperatura en  $^{\circ}K$ . B, El valor del factor de alostérico  $D$  se toma como 0,3. (Arias-Olguín et al., 2013).

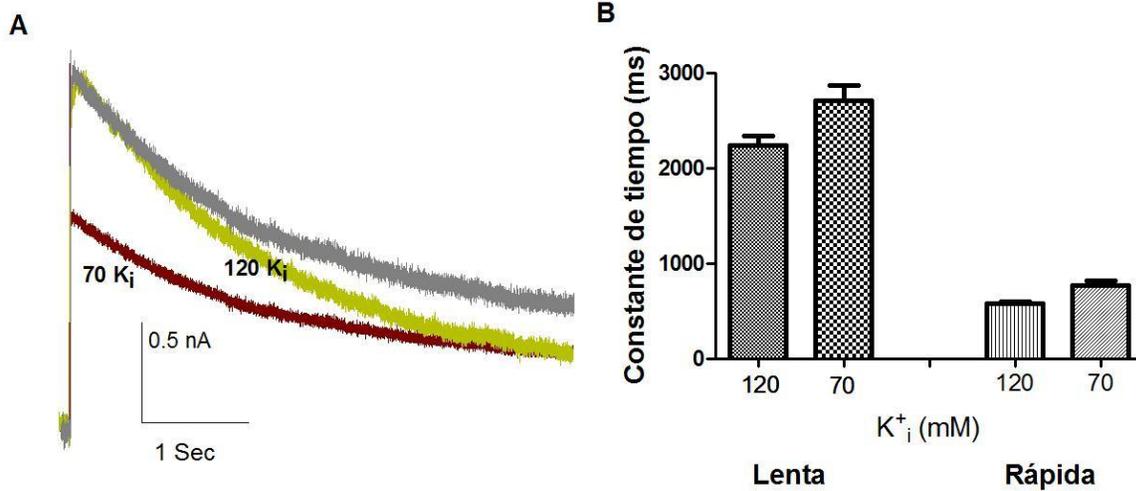
### Efecto del $K^+$ intracelular en la inactivación.

La generación de una CI significativa, así como el efecto del  $TEA^+$  y el  $K^+$  extracelular nos llevaron a concluir que la inactivación que presenta Shab no es del tipo C. Sin embargo, hasta el momento no habíamos evaluado el papel del  $K^+$  en la inactivación (Carrillo et al., 2013). Determinar este posible efecto era importante ya que se sabe que  $K^+$  inhibe la inactivación tipo C (Kiss et al., 1999). Por lo tanto a continuación decidimos evaluar el efecto de la reducción de la concentración del  $K^+$  sobre la inactivación de Shab.

En la Figura 24A, se muestra la  $I_K$  evocada a 0 mV, en condiciones de 120 mM  $K^+$  (trazo amarillo) o de 70 mM  $K^+$  (trazo café), para comparar el efecto en ambas condiciones, los trazos fueron escalados al pico de 120 mM  $K^+$ , se puede

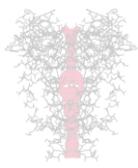


observar que la inactivación es inhibida en 70 mM  $K^+_i$ . Las constantes de tiempo para 120 mM  $K^+_i$  fueron de  $\tau_{f,OI,Na} = 600 \pm 51$  ms,  $\tau_{s,OI} = 2290 \pm 122$  ms; mientras que para 70 mM  $K^+_i$  fueron de  $\tau_{f,OI,K} = 746 \pm 162$  ms,  $\tau_{s,OI,K} = 2712 \pm 162$  ms.

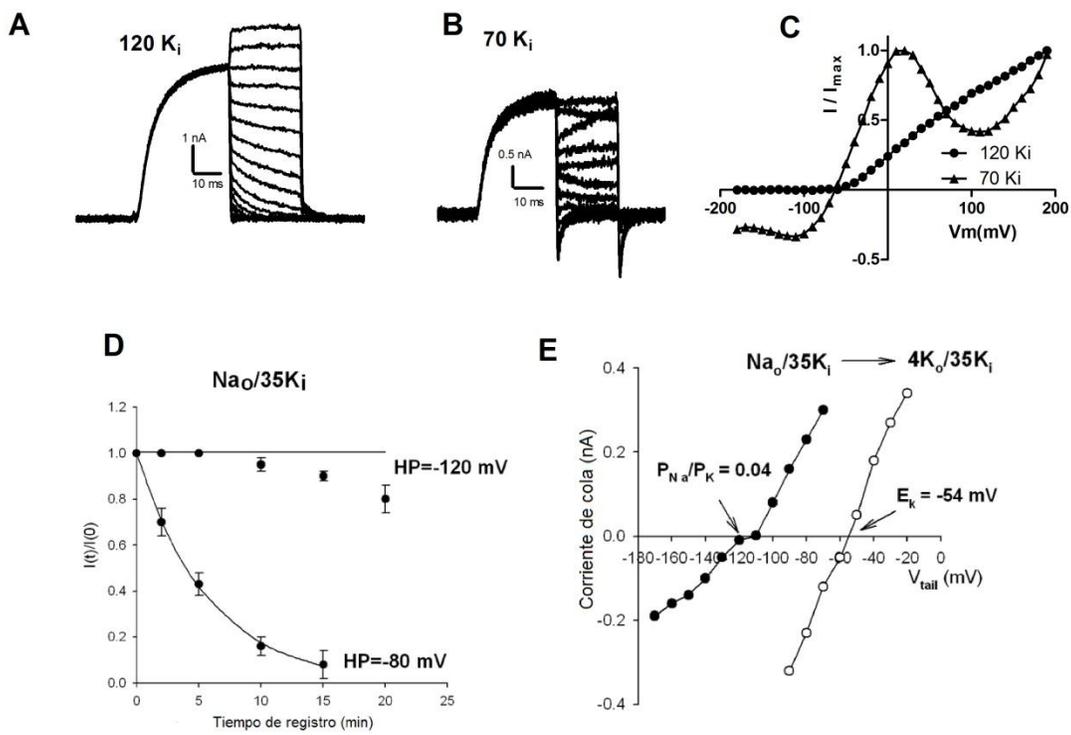


**Figura 24.** Efecto del  $K^+_i$  sobre la Inactivación de estado abierto. A,  $I_K$  generada por un pulso despolarizante a 0mV/5 segundos, en solución de  $Na^+_o$ , en 120 mM de  $K^+_i$  (registro en amarillo) y en 70 mM de  $K^+_i$  (registro en café). El registro en gris es la  $I_K$  escalada de 70 mM de  $K^+_i$  a la  $I_K$  al pico de 120 mM de  $K^+_i$ . B, Constantes de tiempo rápida y lenta, en condiciones normales (120 mM de  $K^+_i$ ) y en la reducción de  $K^+_i$  (70 mM de  $K^+_i$ ). (n=4) 70  $K^+_i$   $\tau_{f,OI,K} = 746 \pm 162$  s,  $\tau_{s,OI,K} = 2712 \pm 162$  s,  $A_f = 0.34 \pm 0.13$ ,  $A_s = 0.11 \pm 0.14$ ,  $C_K = 0.0759 \pm 0.0216$ ; 120  $K^+_i$   $\tau_{f,OI,Na} = 600 \pm 51$  s,  $\tau_{s,OI} = 2290 \pm 122$ ,  $A_f = 0.3 \pm 0.02$ ,  $A_s = 0.68 \pm 0.03$ ,  $C_{Na} = 0.05 \pm 0.0$ .

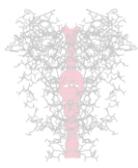
A continuación estudiamos la selectividad y la estabilidad de la  $G_K$  de Shab en condiciones de bajo  $K^+_i$ . En la Figura 25, la  $I_K$  fue generada por un pulso despolarizante de 0 mV/30 ms, seguido por un pulso de prueba a potenciales entre -180 y +180 mV, con incrementos de 10 mV. En la Figura 25A, la  $I_K$  fue registrada con 120 mM de  $K_i$ ; mientras que en la Figura 25B, la  $I_K$  fue generada con 70 mM de  $K^+_i$ . La relación I/V de estos experimentos se muestran en la Figura 25C. En la relación I/V para 120 mM de  $K^+_i$  se observó la  $I_K$  típica, mientras que para la I/V en 70 mM de  $K^+_i$  se observó en la parte inicial la entrada de  $Na^+$ , posteriormente la  $I_K$ , y a voltajes más positivos el bloqueo de la  $I_K$  por  $Na^+$ .



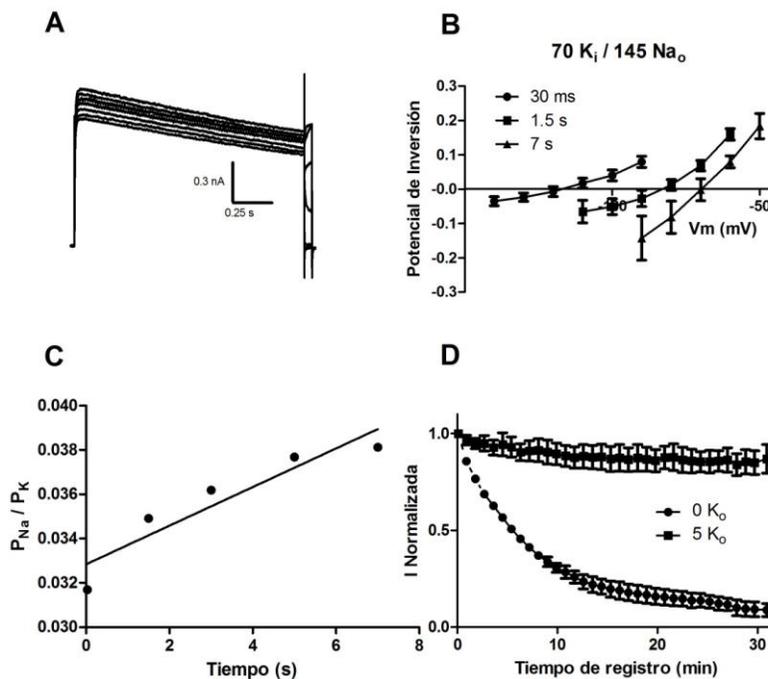
En la Figura 25D, se muestra el colapso irreversible de la  $G_K$  en función del HP y del tiempo, cuando el canal Shab fue expuesto a una solución de  $0K^+_o$  y registrado con  $35\text{ mM}$  de  $K^+_i$ . En un HP =  $-80\text{ mV}$  la  $I_K$  cayó de manera exponencial en función del tiempo, sin embargo a  $-120\text{ mV}$  el colapso de la  $G_K$  fue inhibido. En la Figura 25E, las curvas I/V ilustran el cambio la selectividad de Shab cuando el  $K^+_i$  es disminuido ( $35\text{ mM } K^+_i$ ). Sin embargo cuando le fue adicionado  $4\text{ mM } K^+_o$  a la solución externa ( $Na^+_o$ ), la selectividad fue por completo restaurada. Lo que sugirió que la ocupación de los sitios más externos (s1/s2) del FS son determinantes para la selectividad del canal.



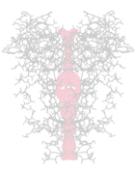
**Figura 25.** Cambios en la selectividad y estabilidad de la conductancia del Shab en concentraciones bajas de  $[K^+_i]$ . A,  $I_K$  generada por un pulso a  $0\text{ mV}/30\text{ ms}$ , seguida por una pulsos repolarizantes, en incrementos de  $10\text{ mV}$ , a diferentes potenciales entre  $-180$  y  $180\text{ mV}$ , en condiciones de  $120\text{ mM}$  de  $K^+_i$ . B, Se utilizó el mismo protocolo para generar la  $I_K$ , como en A, utilizando  $70\text{ mM}$  de  $K^+_i$ , donde se observa una corriente de  $Na^+_o$  entrante. C, Grafica corriente contra voltaje (IV) de experimentos como en A y B. D, Colapso irreversible de  $G_K$  como función de HP y del tiempo en condiciones de  $0K^+_o$ , utilizando  $35\text{ mM}$  de  $K^+_o$ . A  $-80\text{ mV}$  la caída de  $I_K$  es de manera exponencial en función del tiempo; mientras que a HP de  $-120\text{ mV}$  el colapso de  $G_K$  se inhibe. E, La caída de la selectividad es restaurada al adicionar  $4\text{ mM}$  de  $K^+_o$ .



Posteriormente decidimos evaluar si existen cambios en la selectividad durante el mecanismo de inactivación del Shab, para explorar una posible relación entre la selectividad-estabilidad y el gating de la inactivación. En la Figura 26A se muestra un registro de la  $I_K$  generada por un pulso a 0 mV/1.5 s, en condiciones de 70 mM de  $K^+_i$ . En el panel B se muestra la relación I/V de experimentos como los indicados en 26A con pulsos de diferente duración (30 ms, 1.5 s y 7 s, según se indica). Se puede observar que el potencial de inversión de la corriente, cambió de acuerdo con la duración del pulso. En el panel 26C, se muestra la permeabilidad del canal en  $Na^+_o / 70$  mM de  $K^+_i$ , que cambió con relación a la duración del pulso despolarizante a 0 mV. Además estudiamos la estabilidad de la  $G_K$  en condiciones de 70 mM  $K^+_i$ , ilustrado en la figura 26D, en la presencia y la ausencia de 5 mM de  $K^+_o$ . Se observó que el  $K^+_o$  es importante para mantener la  $G_K$  del Shab.

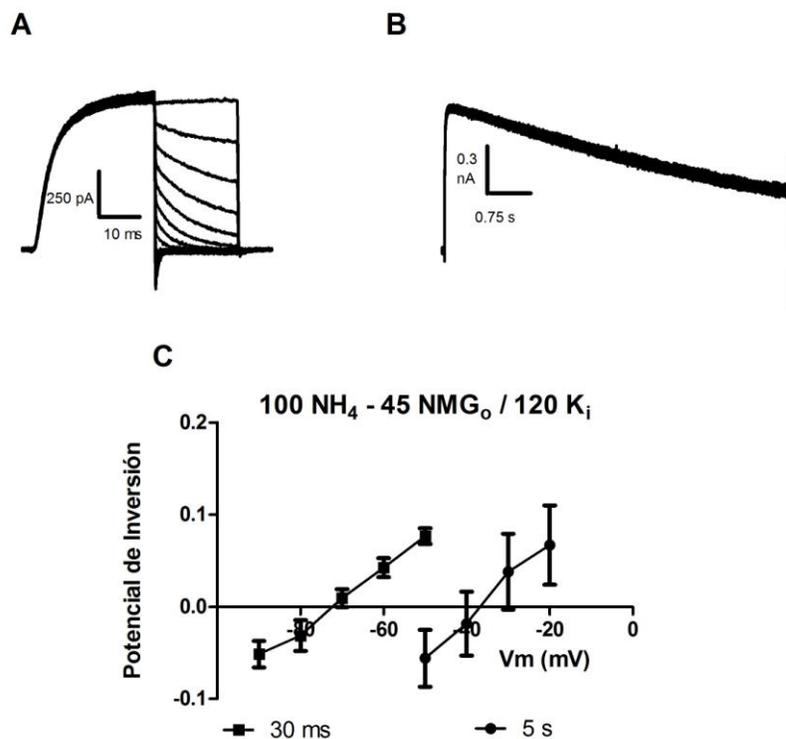


**Figura 26.** Cambios de selectividad durante la inactivación al reducir la  $[K^+_i]$ . A, Registro de la  $I_K$  ( $Na^+_o / 70K^+_i$ ), utilizando un prepulso despolarizante de 1.5 segundos, posteriormente se muestra la IV instantánea. B, Gráfica IV, donde se muestran solo los voltajes negativos para poder visualizar el potencial de inversión, registradas como en A. C, Permeabilidad del canal Shab después de despolarizaciones de 0.03, 1.5, 3, 5, 7 segundos ( $Na^+_o / 70K^+_i$ ). D, Estabilidad de la  $G_K$ . La  $G_K$  cae lentamente y de manera irreversible, en experimentos como en A, cuando el canal está expuesto a  $0K^+_o$ , mientras que en presencia de 5 mM de  $K^+_o$  la  $G_K$  es estable.

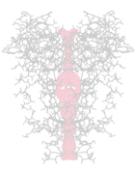


### **$K^+_i$ normal en la inactivación.**

Decidimos entonces explorar si existen cambios en la selectividad del canal durante la inactivación, pero en condiciones normales de  $K^+_i$ . Para determinar si la disminución de  $K^+_i$  es lo que disparó el cambio en la selectividad del canal. Al no observar permeación de  $Na^+_o$  en condiciones fisiológicas de  $K^+_i$ , decidimos utilizar un ion permeante como el  $NH_4^+$  para explorar la selectividad. En las Figuras 27B y 27C se muestran las  $I_K$  a 0mV/ 30 ms y 5 s, respectivamente (según se indica), en la presencia de 100 mM  $NH_4^+_o$ - 45 NMG<sub>o</sub>/120  $K^+_i$ , seguida por un pulso de prueba a diferentes potenciales entre -160 y +80 mV, con incrementos de 10 mV. En la Figura 27A se muestra la gráfica I/V, de los experimentos con los pulsos de diferente duración. Se observó que el potencial de inversión, en esta condición, al igual que cuando se disminuyó el  $K^+_i$ , cambió de acuerdo a la duración del prepulso.



**Figura 27.** Cambios de la selectividad durante la inactivación en condiciones normales de  $K^+_i$ . A Registro de  $I_K$  con un prepulso de 30 ms, seguido de una IV instantánea. B, Registro de  $I_K$  con un prepulso de 5 s. C, grafica IV, de experimentos como en A y B.



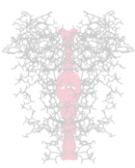
## **Discusión**

El Shab es un canal tipo Kv de *Drosophila melanogaster*, es el homólogo del Kv2.1 de mamífero, y es un canal que no se encuentra bien caracterizado. El interés de estudiar al canal Shab surgió a partir de los estudios de estabilidad-selectividad del Shaker (Gómez-Lagunas, 2001), donde se observó que el  $K^+$  es un cofactor indispensable para la estabilidad y la selectividad de la  $G_K$ . Por lo cual fue de nuestro interés estudiar estas propiedades en Shab, esto es, estudiar los determinantes moleculares de la estabilidad y la selectividad, y la relación de este parámetro con la inactivación del canal.

Es bien conocido que además del  $K^+$ , otros cationes monovalentes permean a través de canales de  $K^+$  presentando la siguiente secuencia típica de permeabilidad:  $Tl^+ > K^+ \geq Rb^+ > NH_4^+ \gg Cs^+ \gg Na^+$  (Hille, 2001). En nuestro caso Shab presentó la misma secuencia típica de permeabilidad.

Por otro lado estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el  $K^+$  extracelular mantiene de manera más estable al poro de Shab que el  $K^+$  interno (Ambriz-Rivas et al., 2005), sugiriendo que el  $K^+$  extracelular es determinante para estabilizar la  $I_K$  y que la unión del  $K^+$  ocurre en los sitios más externos (s1/s2). Sin embargo, no habíamos estudiado el papel del  $K^+_i$  ni la relación estabilidad-selectividad por lo que decidimos sustituir el  $K^+_i$  por otros iones permeantes y determinar el efecto de esta manipulación para ver si en estas condiciones se permitía el paso de  $Na^+$ .

Encontramos que en la presencia de  $K^+_i$  o  $Rb^+_i$  no se generó corriente entrante de  $Na^+$ . Sin embargo, en la presencia de  $Cs^+_i$  es apreciable la entrada de  $Na^+$ . En el canal NaK, que permite el paso de  $K^+$  y  $Na^+$ , cuando se realizan las mutaciones D66Y y N68D (que corresponden en Shaker a Y445 y M447), el canal se hace selectivo a  $K^+$ . Esto sugiere que estos aminoácidos están participando en



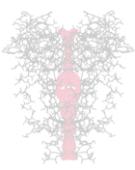
la selectividad del canal. Para que ocurra un cambio semejante en la selectividad del Shab, el  $\text{Cs}^+$  parecería estar favoreciendo un cambio conformacional, provocando que ya no existan los cuatro sitios de unión a  $\text{K}^+$  (como en el canal NaK), permitiendo de esta manera la entrada de  $\text{Na}^+$  (Alam y Jiang, 2009; Alam et al., 2007; Furini y Domone, 2011).

Entre las propiedades que presenta el Shab está el colapso de la  $G_K$  en  $0\text{K}^+$ , las características de este fenómeno sugieren que el  $\text{K}^+$  que se encuentra en el sitio más externo estaría participando en la estabilidad de la  $G_K$  y que por lo tanto es fácilmente dissociable. Por lo que decidimos evaluar a los diferentes iones permeantes para determinar la potencia de inhibición del colapso. La secuencia de inhibición es:  $\text{K}^+ \sim \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{NH}_4^+ \gg \text{Na}^+$ . La cual difiere de la secuencia típica de selectividad de canales de  $\text{K}^+$ . Esto sugirió que la secuencia puede corresponder a la selectividad del sitio más externo, y por ende que los determinantes moleculares de la estabilidad y selectividad no son los mismos.

En resumen, observaciones previas indicaban que el  $\text{K}^+$  que estabiliza la  $G_K$  es el que está unido a s1/s2, los experimentos aquí presentados sugieren entonces la secuencia  $\text{K}^+ \sim \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{NH}_4^+$  como la selectividad de ese sitio(s) en particular.

Por otro lado, otras observaciones habían demostrado que el  $\text{K}^+$  que estabiliza la  $G_K$  se disocia del poro aun y cuando este se encuentre inactivado (Gómez-Lagunas, 2007). Esta observación llamaba la atención en vista de que se proponía que durante la inactivación ocurría una reducción de la región externa del poro (Kurata y Fedida, 2006). Entonces, ¿cómo es que se disocia el  $\text{K}^+$ ? Para responder a esta pregunta estudiamos el mecanismo de inactivación del Shab.

Una vez que conocemos sobre la estabilidad y selectividad, nuestro objetivo fue ver si existía una relación entre la selectividad-estabilidad y la inactivación del Shab. Como primer paso caracterizamos la inactivación del Shab, para posteriormente estudiar su relación con la estabilidad-selectividad.



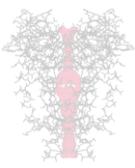
Los canales Shab presentaron una inactivación lenta que se desarrolla desde estados abiertos, con dos constantes de tiempo independientes de voltaje ( $> -20$  mV). Se tiene una constante de tiempo lenta ( $\sim 2$  s) similar a la que se observada en la inactivación tipo C del Shaker (López-Barneo et al., 1993), que sin embargo contrasta con la OI del canal Kv2.1 ( $\sim 4$  s) (Kerschensteiner et al., 2003; Klemic et al., 1998).

El Shab también presentó inactivación desde estados cerrados, la cual presentó una constante de tiempo igual al componente rápido de la OI ( $\sim 0.6$  s). Durante un pulso despolarizante a 0 mV, desde un HP de -80 mV,  $I_K$  decae en un 30%, mientras que el 40% de los canales no son sometidos a CI; esto nos permite sugerir que aunque el canal Shab presenta CI de manera considerable, este tipo de inactivación no es mayormente favorecido en el Shab como en otros canales de  $K^+$ , donde la inactivación también es facilitada por  $K^+_o$  (Klemic et al., 1998; Kurata y Fedida, 2006)

Esto nos sugiere que la facilitación de la inactivación por  $K^+$  es una propiedad que no se encuentra totalmente asociada con procesos de inactivación que se desarrollan desde los estados cerrados.

Además estudiamos a la inactivación tipo U, que caracteriza al canal Kv2.1, y que también ha sido estudiada en otros canales, tales como el Kv3.1, el Kv11.1 y en el Shaker sin inactivación rápida (Kerschensteiner et al., 2003; Klemic et al., 2001; Klemic et al., 1998; Perry et al., 2013). En el canal Shab observamos que la curva de inactivación presentó una curva en forma de U, cuando la duración de los pulsos son cortos y no se aproximan a condiciones de estado estacionario. Sin embargo, cuando la duración de los pulsos inactivantes fueron más largos que la constante de tiempo lenta, acercándose al estado estacionario, la forma en U de la curva ya no se observa y los datos se ajustan a una curva de Boltzmann.

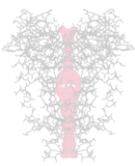
Esto es, la forma tipo U de la inactivación es obtenida cuando los pulsos de duración son demasiado cortos y es el resultado de un proceso cinético donde se encuentran de manera simultánea tanto activación e inactivación del canal. A voltajes mas despolarizados la activación (+ 20 mV) del canal es más rápida e



independiente de voltaje, generando que pocos de los canales se inactiven desde estados cerrados durante el pulso. Pulsos demasiado cortos no permiten que los canales inactiven desde estados cerrados debido a que no tienen el tiempo suficiente para inactivar completamente desde el estado abierto, generando la curva en forma de U. Por otro lado, cuando se utilizan pulsos lo suficientemente largos, alcanzando condiciones de estado estacionario, la forma de U se desvanece. De acuerdo a las observaciones obtenidas y a trabajos previos (Patil et al., 1998), consideramos que en ciertas condiciones como cuando la inactivación surge únicamente desde estados cerrados, se podría observar una curva en forma de U, sin embargo cuando los canales inactiven desde estado abierto, a velocidad lenta, aproximándose a condiciones de estado estacionario podría ser técnicamente difícil de lograr, pero esto por si mismo podría no indicar la existencia de una inactivación particular, tipo U (Patil et al., 1998).

También decidimos explorar si la inactivación lenta que presenta Shab es tipo C. Entre la característica que define a la inactivación tipo C, es que es un mecanismo inhibido por el  $K^+$  y el  $TEA^+$  extracelular (Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1990; Kurata y Fedida, 2006). En este caso observamos que la inactivación de Shab se acelera en presencia de  $K^+$  y  $TEA^+$  externo, lo cual contrasta con lo reportado en la literatura. Sin embargo cuando adicionamos a ambos iones (100 mM  $K^+_o$  y  $TEA^+_o$ ), observamos que el efecto de los iones no es aditivo, cabe destacar que en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, observamos que el  $TEA^+_o$  bloquea el mismo porcentaje de  $I_K$  en presencia de  $Na^+_o$ , tanto en condiciones normales de  $K^+$ , en altas concentraciones de  $K^+$  (100 mM), e incluso en concentraciones bajas de  $K^+_i$  (datos no mostrados). Una posible explicación es que el efecto individual de los iones pudo haber alcanzado la saturación a las concentraciones utilizadas, o que  $TEA^+_o$  y  $K^+_o$  se unen a diferentes sitios.

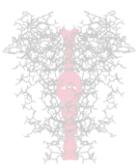
Se conoce que el  $TEA^+$  tiene su sitio de unión en el vestíbulo del poro, 449 en el Shaker (Heginbotham y MacKinnon, 1992), mientras que el sitio de unión del  $K^+$  se encuentra dentro del filtro de selectividad (sitio 1 de unión al  $K^+$ , Y373/Y445



quimera Kv1.2-2.1) (Doyle et al., 1998). En el caso de la inactivación tipo C de Shaker, se conoce que el  $TEA^+_o$  y el  $K^+_o$  la inhiben (Choi et al., 1991; Molina et al., 1997); mientras que para el Kv2.1 el  $TEA^+_i$  y  $K^+_o$  favorecen su inactivación de estado abierto y para Kv3.1  $K^+_o$  favorecen OI y CI mientras que para el  $TEA^+_o$  favorece OI y muy poco CI (Immke et al., 1999; Klemic et al 2001). El efecto de los iones contrasta con la inactivación tipo C. Sin embargo tiene similitudes con el Kv2.1 en cuanto al  $K^+_o$ , pero no así con el  $TEA^+_o$ , debido que en el Shab acelera OI y CI (Kerschensteiner et al., 2003).

Shab presenta una cisteína en la misma posición 449 donde el de Shaker tiene una treonina, el cual es el sitio de unión al  $TEA^+_o$  en los canales Kv (Molina et al., 1997; Heginbotham y MacKinnon, 1992; Luzhkov y Aqvist, 2001). En el caso del Kv2.1 en dicha posición se encuentra una tirosina (Y), la cual presenta una alta afinidad para el bloqueo al  $TEA^+_o$  (Heginbotham y MacKinnon, 1992), pero sin afectar la inactivación (Molina et al., 1997). Esto se cree que ocurre porque el sitio de unión (Y) al  $TEA^+$  se encuentra en una posición externa, fuera de la caída de voltaje a través de la membrana, así que el bloqueo del poro por  $TEA^+_o$  es independiente de voltaje. Lo que indica que el  $TEA^+_o$  necesita unirse de manera más profunda para censar la caída del voltaje a través de la membrana.

El  $K^+_o$  en el Shab acelera la OI al igual que en el Kv2.1 (Kerschensteiner et al., 2003; Klemic et al., 1998). Este efecto contrasta con la inactivación tipo C (Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1990; Kurata y Fedida, 2006), lo cual sugiere que los sitios de unión al  $K^+$  en ambos canales deben ser muy similares, debido a que presentan una cisteína en la posición 463 del Shaker, y se conoce que es una posición que ayuda a dirigir la unión del ion  $K^+$  al filtro de selectividad (Ogielska y Aldrich, 1999). En cuanto a la CI, en el Shab está también se encuentra favorecida por el  $K^+$ , mientras que en el Kv2.1 el efecto es opuesto. Esto sugiere que la inactivación del Kv2.1 puede ser un proceso más complejo que en Shab, además porque el canal Kv2.1 presenta varias subunidades  $\alpha$  moduladoras que podrían



estar regulando su inactivación (Kv5.1, Kv6.1-6.4, Kv8.1-2, y Kv9.1-9.3) (Kerschensteiner et al., 2003).

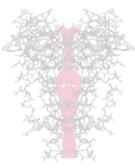
#### Inactivación del Shab y la cavidad central del canal.

La quinidina es un catión lipofílico (antiarrítmico) el cual es capaz de bloquear al Shab desde el lado intracelular, al unirse a la cavidad central del poro (Gomez-Lagunas, 2010; Caballero et al., 2003). En este caso, mostramos que el bloqueo por Qd enlentece la inactivación del Shab; y debido a que ésta presenta una interacción mutuamente excluyente con el  $K^+$  del poro (Gomez-Lagunas, 2010), era de esperarse que se viera enlentecida la inactivación del Shab. En condiciones de 5 mM de  $K^+$ , la OI se encuentra inhibida, debido a que la  $[K^+]$  es lo suficiente baja para acelerar la inactivación, lo cual sugiere que la inhibición de la inactivación por Qd no se debe a la reducción de la ocupación de  $K^+$  en el poro. Una posible explicación es que la Qd al unirse a la cavidad central del poro obstaculizó los cambios conformacionales que se requieren para que se genere la inactivación del Shab.

En el caso del canal Kv1.4, en la inactivación tipo C, la Qd acelera la inactivación por un efecto alostérico (Wang et al., 2003; Bett et al., 2004), dicho efecto es similar al efecto del  $TEA^+$  sobre la inactivación del Shaker y la inactivación de estado abierto del Kv2.1 (Kerschensteiner et al., 2003; González-Pérez et al., 2008). Lo anterior sugiere que la cavidad central está involucrada en los procesos de inactivación lenta.

#### Comparación de la Inactivación de Shab con la Inactivación tipo C.

La inactivación de Shab (OI/CI) es acelerada por  $K^+$  o  $TEA^+$ ; el cual es un efecto opuesto al de estos iones sobre la inactivación tipo C (López-Barneo et al., 1993; Grissmer y Cahalan, 1989; Choi et al., 1991; Molina et al., 1997). En el caso de la inactivación tipo C, existe un cambio conformacional a nivel de la boca externa del poro, el cual se creía hasta hace poco que era un estrechamiento, actualmente la nueva hipótesis es que la boca externa del poro presenta una



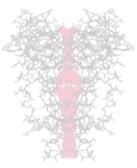
dilatación (Hoshi y Armstrong., 2013; Kurata y Fedida, 2006). En el caso de la inactivación del Shab, el efecto de estos iones es opuesto a la inactivación tipo C.

Otra característica de la inactivación tipo C se debe a los residuos posicionados en los sitios 449 (Treonina, unión al  $\text{TEA}^+$ ) y 463 (Alanina, unión a  $\text{K}^+$ ) del Shaker. En este sentido es de importancia destacar que para el Shab el aminoácido que se encuentra en la posición 449 es una cisteína; sin embargo al mutar a la treonina por una cisteína en el canal Shaker se conserva la inactivación tipo C (Yellen et al., 1994). Lo cual parece poco probable que los efectos de  $\text{TEA}^+$  y  $\text{K}^+$  sobre la inactivación de estos canales son sobre residuos diferentes en el vestíbulo externo del poro.

En la posición 463 del Shaker se encuentra una alanina (mientras que en Shab es una cisteína) la cual al ser mutada por una cisteína, se reduce la afinidad al  $\text{K}^+$  del sitio más interno (S4) del filtro de selectividad y por lo tanto se incrementa la ocupación del sitio de  $\text{K}^+$  mas externo, el cual debe estar regulando la inactivación tipo C. En este caso también es importante destacar que la inactivación del Shaker se vuelve menos sensible a los cambios de  $[\text{K}^+]_o$  (Ogielska y Aldrich, 1999). Shab presenta una cisteína en la posición 463 equivalente del Shaker, y el  $\text{K}^+$  acelera la inactivación; lo cual sugiere que los sitios de  $\text{K}^+$  que están modulando la inactivación de Shab podrían no estar saturados a bajas concentraciones de  $\text{K}^+$ .

Caracterizamos la cinética de recuperación de la OI en presencia de  $\text{K}^+$  y  $\text{TEA}^+$ . Observamos que la OI del Shab se estabiliza. Posteriormente estudiamos los efectos del  $\text{TEA}^+$  y el  $\text{K}^+$  sobre la recuperación de la CI; donde observamos que la recuperación de CI sigue un curso temporal comparable con OI, aunque estadísticamente diferente ( $p=0.0208$ ). La recuperación de la inactivación de Shab en CI y OI siguen el mismo curso temporal, estas observaciones son similares a las ya reportadas por el Kv2.1 (Kerschensteiner et al., 2003).

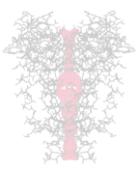
La recuperación de la inactivación se ve enlentecida por  $\text{K}^+$  y  $\text{TEA}^+$ . Esto es, el  $\text{K}^+$  y el  $\text{TEA}^+$  aceleran la entrada a la inactivación, pero enlentecen la salida de la inactivación. Contradictoriamente a Kv2.1 y a Shaker, donde el  $\text{K}^+$  facilita la



recuperación de la inactivación. En el Shab tanto el  $K^+_o$  como el  $TEA^+_o$  enlentecen la recuperación de OI y CI, así pueden estabilizar el estado inactivado.

Entre otras características que presenta el canal Kv2.1 es que al disminuir el  $K^+_i$ , la inactivación se acelera (Kiss et al., 1999), sin embargo, en nuestro caso observamos que la inactivación en el Shab se enlentece, lo cual sugiere que la inactivación del Shab podría estar siendo regulada por cambios conformacionales que involucran la parte interna del poro. Además en estas condiciones, existe un cambio de selectividad dependiendo de la duración del pulso inactivante, esto último parecido a lo que se obtuvo en otros canales con anterioridad, Kv2.1 y Shaker A463C, donde sugieren que el cambio de selectividad está correlacionado con el porcentaje de inactivación (Kiss et al., 1999). En la reducción de  $K^+_i$  en el Shab se puede observar que existe permeación de  $Na^+$  ( $I_K$  70 mM  $K^+_i$ ), mientras que en la I/V muestra dos bloqueos, a voltajes más negativos el bloqueo es por  $Ca^{2+}$  (figura 25C) y el segundo a voltajes positivos el bloqueo es por  $Na^+$ , ambos bloqueos no se muestran en condiciones normales de  $K^+_i$  (120 mM). Además, es notable que cuando se disminuye  $[K^+_i]$  la  $G_K$  se desestabiliza, sin embargo a potenciales de sostenimiento hiperpolarizados se inhibe el colapso de la  $G_K$ , pero no se recupera la selectividad, sin embargo basta tan solo agregar 4 mM de  $K^+$  para que la selectividad del Shab se recupere. En este sentido es importante destacar que para el Kv2.1 no existe colapso de la conductancia ya que permite el paso estable de  $Na^+$  en condiciones de  $0K^+$  (Ogielska y Aldrich, 1998), esto nos indica que el ion  $K^+$  extracelular es de gran importancia para mantener la funcionalidad del Shab.

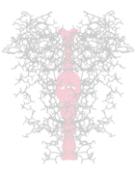
Debido a que observamos cambios en la selectividad, al reducir el  $K^+_i$ , decidimos explorar si existía algún cambio en la selectividad en condiciones normales de  $K^+_i$  (120 mM), de acuerdo a que en esta condición no observamos la entrada de  $Na^+$ , decidimos utilizar un ión permeable como ión reportero, para lo cual elegimos al ión  $NH_4^+$ , donde pudimos observar que dependiendo de la duración del pulso la selectividad del canal cambia. Por todo lo anterior, se sugiere



que durante la inactivación el canal Shab se genera un rearrreglo conformacional que permite un acople entre el poro interno y el externo.

El Shab al encontrarse inactivado no previene el colapso de la  $G_K$  en  $0K^+$ , en primer lugar porque nuestros resultados sugieren que la inactivación de Shab es por un cierre en la parte interna del poro y en segundo lugar porque el  $K^+$  que le da estabilidad al canal se encuentra en el sitio más externo, de tal forma que el  $K^+$  se disocia de manera fácil, aun si el canal esta inactivado o no. (Gómez-Lagunas, 2007).

En este trabajo mostramos que la inactivación del canal Shab no es del tipo C y que corresponde con un rearrreglo o cambio conformacional del lado intracelular del poro, que afecta la cavidad central y la conducción del  $K^+$ . Lo cual sugiere que el  $K^+_o$  y el  $TEA^+_o$  podría acelerar la inactivación al favorecer alostéricamente cambios conformacionales internos del poro.



## Conclusiones:

El Shab presentó una secuencia de selectividad típica de los canales de  $K^+$ :  $K^+ \sim Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ > Na^+$ .

El  $K^+$  extracelular mantiene estable la conductancia del Shab, los datos sugieren que el  $K^+$  necesario para este efecto se une al sitio más externo.

El  $Cs^+$  generó un cambio conformacional en el Shab que permitió el eflujo de  $Cs^+$  y el influjo de  $Na^+$  a través del poro.

Los iones permeantes inhibieron el colapso de Shab, siguiendo la siguiente secuencia:  $K^+ \sim Rb^+ > Cs^+ > NH_4^+ > Na^+$ .

El canal Shab presentó inactivación tanto de estado abierto como de estados cerrados.

El canal Shab no presentó inactivación tipo U cuando se encuentra en estado estacionario. Producto del estudio anterior, la inactivación reportada para el canal Kv2.1, cuando la inactivación no se midió en estado estacionario se genera una curva de inactivación en forma de U artificial.

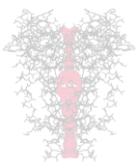
El TEA<sup>+</sup> y el  $K^+$  favorecieron la inactivación del Shab, un efecto contrario a lo que ocurre en la inactivación tipo C.

La quinidina bloqueó el poro del Shab y enlenteció la inactivación del canal.

La disminución de  $K^+$  enlenteció a la inactivación, y generó cambios en la selectividad y la estabilidad. Donde la estabilidad fue restaurada al adicionar 4 mM de  $K^+$ .

En condiciones de  $K^+$  normal y utilizando al  $NH_4^+$  como reportero, la selectividad del canal también fue modificada durante la inactivación.

La inactivación del canal Shab fue debida a un mecanismo diferente a la inactivación lenta tipo C, su mecanismo involucra un cambio conformacional a nivel del poro interno, esto tiene implicaciones a nivel de la selectividad del canal lo cual es dependiente del tiempo.



## Bibliografía

Aggarwal, S.K., MacKinnon, R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K channel. *Neuron*. 1996, 16: 1169-1177.

Alam, A., Jiang, Y. Structural analysis of ion selectivity in the NaK channel. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 16(1): 35-41

Alam, A., Shi, N., Jiang, Y. Structural insight into Ca<sup>2+</sup> specificity in tetrameric cation channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(39):15334-9.

Allen, T.W., Andersen, S., Roux, B. On the importance of atomic fluctuations, protein flexibility, and solvent in ion permeation. *J. Gen. Physiol*. 2004, 124:679-690.

Aldrich, R.W., Jr, P.A., Getting, S.H. Thompson. Mechanism of frequency-dependent broadening of molluscan neurone soma spikes. *J. Physiol*. 1979, 291:531-544.

Almers, W., Armstrong, C.M. Survival of K<sup>+</sup> permeability and gating currents in squid axons perfused with K<sup>+</sup>-free media. *J. Gen. Physiol*. 1980, 75:61-78.

Ambriz-Rivas, M., Islas, L.D., Gomez-Lagunas, F. K<sup>+</sup>-dependent stability and ion conduction of Shab K<sup>+</sup> channels: a comparison with Shaker channels. *Pflügers Arch-Eur J. Physiol*. 2005, 450:55-261.

Arias-Olguin, I.I., Carrillo, E., Meza-Torres, B., Barriga-Montoya, C., Balleza, D., Gomez-Lagunas, F. Induction of a fast inactivation gating on delayed rectifier Shab K<sup>+</sup> channels by the anti-inflammatory drug celecoxib. *Channels (Austin)*. 2011, 5(1):56-64.

Armstrong, C. M. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channel of giant axons. *J. Gen. Physiol*. 1971, 58:413-437.

Armstrong, C. M. Ionic pores, gates and gating currents. *Q.Rev.Biophys*. 1975, 7:179-210.

Armstrong, C. M. Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev*. 1981, 61(3):644-83.

Armstrong, C. M. Voltage-gated K channels. *Sci STKE*. 2003, 24; 2003(188).

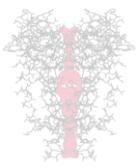
Armstrong, C. M., Bezanilla, F. currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature*. 1973, 13; 242(5398): 459-61.

Antonucci, D.E., Lim, S.T., Vassanelli, S., Trimmer, J.S. Dynamic localization and clustering of dendritic Kv2.1 voltage-dependent potassium channels in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2001, 108(1):69-81.

Barros, F., Domínguez, P., de la Peña, P. Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front Pharmacol*. 2012, 23; 3: 49.

Baker, O.S., Larsson, H.P., Mannuzzu, L.M., Isacoff, E.Y. Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K<sup>+</sup> channel gating. *Neuron*. 1998, 20(6):1283-94.

Baukrowitz, T., Yellen, G. Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K<sup>+</sup> channel. *Science*. 1996, 2; 271(5249):653-6.



Bett, G. C., Rasmusson, R. L. Inactivation and recovery in Kv1.4 K<sup>+</sup> channels: lipophilic interactions at the intracellular mouth of the pore. *J Physiol.* 2004; 556: 109–20.

Bezanilla, F. Gating of sodium and potassium channels. *J Membr Biol.* 1985, 88(2):97-111.

Bezanilla, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.* 2000, 80(2):555-92.

Bezanilla, F. How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008, 9; (4):323-32.

Biggin, P.C., Roosild, T., Choe, S. Potassium channel structure: domain by domain. *Curr Opin Struct Biol.* 2000, 10(4): 456-61.

Blunck, R., Batulan, Z. Mechanism of electromechanical coupling in voltage-gated potassium channels. *Front Pharmacol.* 2012, 12; 3:166

Butler, A., Wei, A. G., Baker, K., Salkoff, L. A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science.* 1989, 17; 243(4893):943-7

Bhate, M. P., Wylie, B. J. Tian L., McDermott A.E. Conformational dynamics in the selectivity filter of KcsA in response to potassium ion concentration. *J. Mol. Biol.* 2010, 401: 155-166.

Bowlby, M. R., Fadool, D. A., Holmes, T. C., Levitan, I. Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J Gen Physiol.* 1997, 110(5):601-10.

Carrillo, E., Arias-Olguín, I. I., Islas, L. D., Gómez-Lagunas, F. Shab K<sup>+</sup> channel slow inactivation A test for U-type inactivation and a hypothesis regarding K<sup>+</sup>-facilitated inactivation mechanisms. *2013 Channels* 7:2, 97–108.

Caballero, R., Pourrier, M., Schram, G., Delpón, E., Tamargo, J., Nattel, S. Effects of flecainide and quinidine on Kv4.2 currents: voltage dependence and role of S6 valines. *Br J Pharmacol.* 2003, 138: 1475–84.

Cirelli, C., Bushey, D., Hill, S., Huber, R., Kreber, R., Ganetzky, B., Tononi, G. Reduced sleep in *Drosophila* Shaker mutants. *Nature.* 2005, 28;434(7037):1087-92.

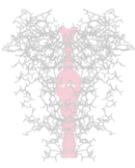
Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Zhaom, Y., Jogini, V., Cortes, D.M., Roux, B., Perozo, E. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat Struct Mol Biol.* 2006, 13(4):311-8.

Cha, A., Bezanilla, F. Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K<sup>+</sup> channel with fluorescence. *Neuron.* 1997; 19(5):1127-40.

Chanda, B., Asamoah, O.K., Blunck, R., Roux, B., Bezanilla, F. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature.* 2005; 11; 436(7052):852-6.

Cheng, Y.M., Azer, J., Niven, C.M., Mafi, O., Allard, C.R., Qi, J., Thouta, S., Claydon, T.W. Molecular determinants of U-type inactivation in Kv2.1 channel. *Biophys J.* 2011; 101(3): 651-61.

Choe, S. Potassium Channels Structures. *Nature Reviews: Neuroscience.* 2002, 115-121.



Choi, K. L., Aldrich, R. W., Yellen, G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1991; 88: 5092–5.

Choi, K.L., Mossman, C., Aubé, J., Yellen, G. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron*. 1993; 10(3):533-41.

Chopra, M., Gu, G. G., Singh, S. Mutations affecting the delayed rectifier potassium current in *Drosophila*. *J Neurogenet*. 2000; 14(2):107-23.

Cole, K. S., Moore, J.W. Potassium ion current in the giant axon: dynamic characteristic. *Biophys J*. 1960: 1:1-14.

Davis, R. L. Mushroom bodies and *Drosophila* learning . *Neuron*, 1993; 11, 1 – 14.

Davis, R. L. Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants . *Physiol Rev*, 1996; 76, 299 – 317.

Debere, M. G., Sauer, D. B., Zeng, W., Alam, A., Shi, N., Jiang, Y. Tuning the ion selectivity of tetrameric cation channels by changing the number of ion binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011, 108: 598-602.

De Biasi, M., Hartmann, H. A., Drewe, J. A., Tagliatela, M., Brown, A. M., Kirsch, G. E. Inactivation determined by a single site in K<sup>+</sup> pores. *Pflugers Arch*. 1993; 422(4):354-63.

Dubnau, J., Tully, T. Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory. *Annu Rev Neurosci*. 1998; 21:407-44.

Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 1998, 280: 69-77.

Fedida, D., Hesketh, J. C. Gating of voltage-dependent potassium channels. *Prog Biophys Mol Biol*. 2001;75(3):165-99.

Fedida, D., Maruoka, N. D., Lin, S. Modulation of slow inactivation in human cardiac Kv1.5 channels by extra- and intracellular permeant cations. *J Physiol*. 1999, 1; 515:315-29.

Furini, S., Domene, C. Gating at the selectivity filter of ion channels that conduct Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ions. *Biophys J*. 2011; 101(7):1623-31

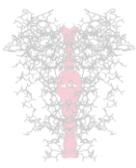
Frolov, R.V., Bagati, A., Casino, B., Singh, S. Potassium channels in *Drosophila*: historical breakthroughs, significance, and perspectives. *J Neurogenet*. 2012; 26(3-4):275-90.

Gardner, P. Patch clamp studies of lymphocyte activation. *Annu Rev Immunol*. 1990, 8: 231-252.

Gómez-Lagunas, F., Armstrong, C. M. Inactivation in Shaker B K<sup>+</sup> channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys. J*. 1995, 68: 89-95.

Gómez-Lagunas, F. ShakerB K<sup>+</sup> conductance in Na<sup>+</sup> solutions lacking K<sup>+</sup> ions: a remarkably stable nonconducting state produced by membrane depolarizations. *J. Physiol*. 1997, 499:3-15.

Gómez-Lagunas, F. Barium inhibition of the collapse of the Shaker K<sup>+</sup> conductance in zero K<sup>+</sup>. *Biophys. J*. 1999, 77:2988-2998.



Gomez-Lagunas, F.  $\text{Na}^+$  interaction with the pore of Shaker B  $\text{K}^+$  channels: Zero and low  $\text{K}^+$  conditions. *J. Gen. Physiol.* 2001, 118:639-648.

Gómez-Lagunas, F., Batista, C. V., Olamendi-Portugal, T., Ramírez-Dominguez, M. E., Possani, L. D. Inhibition of the collapse of the Shaker  $\text{K}^+$  conductance by specific scorpion toxins. *J. Gen. Physiol.* 2004, 123:263-279.

Gómez-Lagunas, F. Stability of the Shab K channel conductance in 0  $\text{K}^+$  solutions. The role of the membrane potential. *Biophys. J.* 2007, 93:4197-4208.

Gómez-Lagunas, F. Quinidine interaction with Shab  $\text{K}^+$  channels: pore block and irreversible collapse of the  $\text{K}^+$  conductance. *J Physiol* 2010; 2691–2706

González-Pérez, V., Neely, A., Tapia, C., González-Gutiérrez, G., Contreras, G., Orio, P., Lagos, V., Rojas, G., Estévez, T., Stack, K., Naranjo, D. Slow inactivation in Shaker K channels is delayed by intracellular tetraethylammonium. *J Gen Physiol.* 2008; 132(6):633-50.

Grissmer S, Cahalan M. TEA prevents inactivation while blocking open  $\text{K}^+$  channels in human T lymphocytes. *Biophys J.* 1989; 55: 203–6.

Guan, Z., Buhl, L. K., Quinn, W. G., Littleton, J. T. Altered gene regulation and synaptic morphology in *Drosophila* learning and memory mutants. *Learn Mem.* 2011, 21; 18(4):191-206

Gulbis, J. M., Zhou, M., Mann, S., MacKinnon, R. Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels. *Science.* 2000, 7; 289(5476):123-7

Guo, W., Xu, H., London, B., Nerbonne, J. M. Molecular basis of transient outward  $\text{K}^+$  current diversity in mouse ventricular myocytes. *J Physiol.* 1999, 15; 521 Pt 3:587-99.

Hackos, D. H., Chang, T. H., Swartz, K. J. Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker  $\text{K}^+$  channel. *J Gen Physiol.* 2002; 119(6):521-32.

Hegde, P., Gu, G. G., Chen, D., Free, S.J., Singh, S. Mutational analysis of the Shab-encoded delayed rectifier  $\text{K}^+$  channels in *Drosophila*. *J Biol Chem.* 1999, 30; 274(31):22109-13.

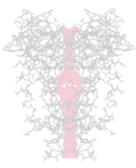
Heginbotham, L., MacKinnon, R. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron.* 1992; 8: 483–91.

Heginbotham, L., Lu, Z., Mackinnon, R. Mutations in the  $\text{K}^+$  channel signature sequence. *Biophys. J.* 1994, 66:1061-1067.

Hodge, J. J., Choi, J. C., O’Kane, C. J., Griffith, L. C. Shaw potassium channel genes in *Drosophila*. *J Neurobiol.* 2005; 63, 235 – 254.

Hodge, J. J., Stanewsky, R. Function of the Shaw potassium channel within the *Drosophila* circadian clock. *PLoS ONE*, 2008; 3, e2274

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 1952; 116(4):473-96.



Hoshi, T., Armstrong, C. M. C-type inactivation of voltage-gated  $K^+$  channels: pore constriction or dilation? *J Gen Physiol.* 2013; 141(2):151-60.

Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W. Two types of inactivation in Shaker  $K^+$  channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron.* 1991; 7: 547–56.

Hoshi, T., Zagotta, W.N., Aldrich, R. W. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science.* 1990, 26; 250(4980):533-8.

Hille, B. Ion channels from excitable membranes. 3er edition Sinauer, Sunderland, MD, 2001.

Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol.* 1952; 116(4):473-96.

Immke, D., Wood, M., Kiss, L., Korn, S. J. Potassium-dependent changes in the conformation of the Kv2.1 potassium channel pore. *J Gen Physiol.* 1999; 113(6): 819-36.

Isacoff, E. Y., Jan, Y. N., Jan, L. Y. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker  $K^+$  channel. *Nature.* 1991, 5; 353(6339):86-90.

Jacobson, D. A., Philipson, L. H. TRP channels of the pancreatic beta cell. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;(179):409-24

Jegla, T., Salkoff, L. A multigene family of novel  $K^+$  channels from Paramecium tetraurelia. *Receptors Channels.* 1995; 3(1):51-60.

Jerng, H. H., Covarrubias, M.  $K^+$  channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys J.* 1997; 72(1):163-74.

Jerng, H. H., Pfaffinger, P. J., Covarrubias, M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci.* 2004; 27: 343–369.

Jerng, H. H., Shahidullah, M., Covarrubias, M. Inactivation gating of Kv4 potassium channels: molecular interactions involving the inner vestibule of the pore. *J Gen Physiol.* 1999; 113(5):641-60.

Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., MacKinnon, R., The principle of gating charge movement in a voltage-dependent  $K^+$  channel. *Nature.* 2003, 1; 423(6935): 42-8.

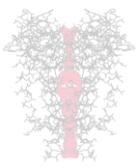
Kaji, D. Volume-sensitive  $K^+$  transport in human erythrocytes. *J Gen Physiol.* 1986, 88:719-738.

Kamb, A., Iverson, L. E., Tanouye, M. A. Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell.* 1987, 31; 50(3):405-13.

Keating, M. T., Sanguinetti, M. C. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell.* 2001; 104: 569–580.

Kerschensteiner, D., Monje, F., Stocker, M. Structural determinants of the regulation of the voltage-gated potassium channel Kv2.1 by the modulatory  $\alpha$ -subunit Kv9.3. *J Biol Chem.* 2003; 278(20):18154-61.

Kirsch, G. E., Pascual, J. M., Shieh, C. C. Functional role of a conserved aspartate in the external mouth of voltage-gated potassium channels. *Biophys J.* 1995; 68(5):1804-13.



Kiss, L., Immke, D., LoTurco, J., Korn, S. J. The interaction of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in voltage-gated potassium channels. Evidence for cation binding sites of different affinity. *J Gen Physiol.* 1998; 111(2):195-206.

Kiss, L., LoTurco, J., Korn, S. J. Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys J.* 1999; 76(1 Pt 1):253-63.

Klemic, K. G., Kirsch, G. E., Jones, S. W. U-type inactivation of Kv3.1 and Shaker potassium channels. *Biophys J.* 2001; 81: 814–26.

Klemic, K. G., Shieh, C. C., Kirsch, G. E., Jones, S. W. Inactivation of Kv2.1 potassium channels. *Biophys J.* 1998; 74:1779–89.

Klemic, K. G., Kirsch, G. E., Jones, S. W. U-type inactivation of Kv3.1 and Shaker potassium channels. *Biophys J.* 2001; 81(2):814-26.

Korn, S. J., Ikeda, S. R. Permeation selectivity by competition in a delayed rectifier potassium channel. *Science.* 1995, 21; 269(5222):410-2.

Kurata, H. T., Fedida, D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; 92:185–208

Kurata, H. T., Soon, G. S., Fedida, D. Altered state dependence of c-type inactivation in the long and short forms of human Kv1.5. *J Gen Physiol.* 2001;118(3):315-32.

Labro, A. J., Snyders, D. J. Being flexible: the voltage-controllable activation gate of Kv channels. *Frontiers in Pharmacology: Pharmacology of Ion Channels and Channelopathies.* 2012, 3:1-12

Larsson, H. P., Baker, O. S., Dhillon, D. S., Isacoff, E. Y. Transmembrane movement of the shaker K<sup>+</sup> channel S4. *Neuron.* 1996; 16(2):387-97.

Larsson, H.P., Elinder, F. A conserved glutamate is important for slow inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Neuron.* 2000; 27(3):573-83.

LeMasurier, M., Heginbotham, L., Miller, C. KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 2001, 118: 303-314.

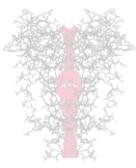
Li, M., Jan, Y. N., Jan, L. Y. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 1992; 257, 1225–123010.

Liu, Y., Jurman, M. E., Yellen, G. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K<sup>+</sup> channel during gating. *Neuron.* 1996; 16: 859–867.

Long, S. B., Campbell, E. B., MacKinnon, R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science.* 2005, 309: 897-903.

Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., MacKinnon, R. Atomic structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel in a lipid membrane-like environment. *Nature.* 2007; 15, 450(7168):376-82.

Lopez, G. A., Jan, Y. N., Jan, L. Y. Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K<sup>+</sup> channel comprises part of the pore. *Nature* 1994; 367, 179–182.



López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S. H., Aldrich, R. W. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels*. 1993; 1(1):61-71.

Luzhkov, V. B., Aqvist, J. Mechanisms of tetraethylammonium ion block in the KcsA potassium channel. *FEBS Lett*. 2001; 495(3):191–6.

MacKinnon, R. Potassium channels. *FEBS Lett*. 2003, 27; 555(1):62-5.

MacKinnon, R., Heginbotham, L., Abramson, T. Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron*. 1990; 5(6):767-71.

MacKinnon, R., Miller, C. Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol*. 1988; 91(3):335-49.

Malin, S. A., Nerbonne, J. M. Elimination of the fast transient in superior cervical ganglion neurons with expression of KV4.2W362F: molecular dissection of IA. *J Neurosci*. 2000,15;20(14):5191-9.

Mannuzzu, L. M., Moronne, M. M., Isacoff, E. Y. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*. 1996, 12; 271(5246):213-6.

Miller C. See potassium run. *Nature*. 2001, 1; 414(6859):23-4.

Molina A, Castellano AG, López-Barneo J. Pore mutations in Shaker K<sup>+</sup> channels distinguish between the sites of tetraethylammonium blockade and C-type inactivation. *J Physiol*. 1997; 499:361–7.

Murrell-Lagnado, R. D., Aldrich, R. W. Interactions of amino terminal domains of Shaker K channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. *J Gen Physiol*. 1993; 102(6):949-75.

Muto, S. Potassium transport in the mammalian collecting duct. *Physiol Rev*. 2001, 81:85-116.

Niven, J. E., Vähäsöyrinki, M., Kauranen, M., Hardie, R. C., Juusola, M., Weckström, M. The contribution of Shaker K<sup>+</sup> channels to the information capacity of *Drosophila* photoreceptors. *Nature*. 2003, 6;421(6923):630-4.

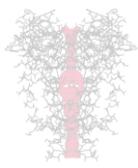
Nosokov, S. Y., Bermeche, S., Roux, B. Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands: *Nature* 2004, 431: 830-834.

Noskov, S.Y., Roux, B. Ion selectivity in potassium channels. *Biophysical Chemistry*. 2006, 124: 279-291.

Ogielska, E. M., Aldrich, R. W. Functional consequences of a decreased potassium affinity in a potassium channel pore. Ion interactions and C-type inactivation. *J Gen Physiol*. 1999; 113: 347–58.

Ogielska, E. M., Zagotta, W. N., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Haab, J., Aldrich, R.W. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels. *Biophys J*. 1995; 69(6):2449-57.

Ordög, B., Brutyó, E., Puskás, L. G., Papp, J. G., Varró, A., Szabad, J., Boldogkoi, Z. Gene expression profiling of human cardiac potassium and sodium channels. *Int J Cardiol*. 2006, 28;111(3):386-93.



Panyi, G., Sheng, Z., Deutsch, C. C-type inactivation of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J.* 1995; 69(3):896-903.

Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N., Jan, L. Y. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science.* 1987, 14; 237(4816):749-53.

Pascual, J. M., Shieh, C. C., Kirsch, G. E., Brown, A. M. Multiple residues specify external tetraethylammonium blockade in voltage-gated potassium channels. *Biophys J.* 1995; 69(2):428-34.

Patel, A. J., Lazdunski, M., Honoré, E. Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *EMBO J.* 1997, 17;16(22):6615-25.

Patil, P. G., Brody, D. L., Yue, D. T. Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron.* 1998; 20: 1027–38.

Peng, I. F., Wu, C. F. Differential contributions of Shaker and Shab K<sup>+</sup> currents to neuronal firing patterns in *Drosophila*. *J Neurophysiol.* 2007; 97(1):780-94.

Perozo, E., Santacruz-Tolosa, L., Stefani, E., Bezanilla, F., Papazian, D. M. S4 mutations alter gating currents of Shaker K channels. *Biophys J.* 1994; 66(2 Pt 1):345-54.

Perry, M. D., Wong, S., Ng, C. A., Vandenberg, J. I. Hydrophobic interactions between the voltage sensor and pore mediate inactivation in Kv11.1 channels. *J Gen Physiol.* **2013**; 142(3):275-88.

Pinto, L. H., Klumpp, D. J. Localization of potassium channels in the retina. *Prog Retin Eye Res.* 1998; 17(2):207-30.

Pongs, O., Kecskemethy, N., Müller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H. H., Canal, I., Llamazares, S., Ferrus, A. Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* 1988; 7(4):1087-96.

Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Castellino, R. C., Zhang, Y., Campbell, D. L., Strauss, H. C. C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K<sup>+</sup> channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 1995, 15; 489 ( Pt 3):709-21.

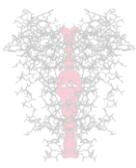
Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D. L., Brahmajothi, M. V., Strauss, H. C. Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res.* 1998, 20; 82(7):739-50.

Redman, P. T., He, K., Hartnett, K. A., Jefferson, B. S., Hu, L., Rosenberg, P. A., Levitan, E. S., Aizenman, E. Apoptotic surge of potassium currents is mediated by p38 phosphorylation of Kv2.1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007,27;104(9):3568-73.

Roeper, J., Lorra, C., Pongs, O. Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K<sup>+</sup> channel KV1.4 regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* 1997; 17:3379–3391.

Roux, B. Ion conduction and selectivity in K<sup>+</sup> channels. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2005, 34:153-171.

Salkoff, L., Baker, K., Butler, A., Covarrubias, M., Pak, M.D., Wei, A. An essential 'set' of K<sup>+</sup> channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci.* 1992; 15(5):161-6.



Salkoff, L., Wyman, R. Genetic modification of potassium channels in *Drosophila* Shaker mutants. *Nature*. 1981; 17-23; 293(5829):228-30.

Sanguinetti, M. C., M. Tristani-Firouzi. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 2006; 440:463–469.

Sansom, M. S., Shrivastava, I. H., Ranatunga, K. M., Smith, G. R. Simulations of ion channels – watching ions and water move. *Trends Biochem Sci* 2000; 25(8): 368-74.

Sansom, M. S., Shrivastava, I. H., Bright, J. N., Tate, J., Capener, C. E., Biggin, P. C. Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochim Biophys Acta*. 2002. 11; 1565(2):294-307.

Schönherr, R., Heinemann, S. H. Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J. Physiol*. 1996; 493:635–642.

Schoppa, N. E., McCormack, K., Tanouye, M. A., Sigworth, F. J. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science*. 1992. 27; 255(5052):1712-5.

Schoppa, N. E., Sigworth, F. J. Activation of Shaker potassium channels. I. Characterization of voltage-dependent transitions. *J Gen Physiol*. 1998; 111(2):295-311.

Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M., Bezanilla, F. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K channel. *Neuron*. 1996, 16:1159-1167.

Serôdio, P., Kentros, C., Rudy, B. Identification of molecular components of A-type channels activating at subthreshold potentials. *J Neurophysiol*. 1994; 72(4):1516-29.

Shian, L., Bian, X., Lockless, S. W. Preferential binding of  $K^+$  ions in the selectivity filter at equilibrium explains high selectivity of  $K^+$  channels. *J Gen. Physiol*. 2012, 140(6): 671-679.

Shieh, R.C. Mechanisms for the time-dependent decay of inward currents through cloned Kir2.1 channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 2000, 15; 526 Pt 2:241-52.

Shieh, C.C., Kirsch, G.E. Mutational analysis of ion conduction and drug binding sites in the inner mouth of voltage-gated  $K^+$  channels. *Biophys J*. 1994; 67(6):2316-25.

Singh, A., Singh, S. Unmasking of a novel potassium current in *Drosophila* by a mutation and drugs. *J Neurosci*. 1999, 15;19(16):6838-43.

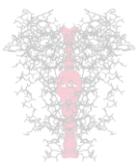
Smith-Maxwell, C. J., Ledwell, J. L., Aldrich, R. W. Role of the S4 in Cooperativity of Voltage-dependent Potassium Channel Activation. *J Gen Physiol*. 1998, 111(3):399-420.

Starace, D. M., Bezanilla, F. Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker  $K^+$  channel. *J Gen Physiol*. 2001; 117(5):469-90.

Starace, D. M., Bezanilla, F. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*. 2004; 5; 427(6974):548-53.

Starkus, J. G., Kuschel, L., Rayner, M. D., Heinemann, S. H. Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J Gen Physiol*. 1997; 110: 539–50.

Tanouye, M. A., Ferrus, A., Fujita, S. C. Abnormal action potentials associated with the Shaker complex locus of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(10):6548-52.



Tsunoda, S., Salkoff, L. The major delayed rectifier in both *Drosophila* neurons and muscle is encoded by Shab. *J Neurosci.* 1995; 15(7 Pt 2):5209-21.

Tsunoda, S., Salkoff, L. Genetic analysis of *Drosophila* neurons: Shal, Shaw, and Shab encode most embryonic potassium currents. *J Neurosci.* 1995; 15(3 Pt 1):1741-54.

Tazawa, M., Sutou, E., Shibasa, M. Onion root water transport sensitive to water channel and K<sup>+</sup> channel inhibitors. *Plant Cell Physiol.* 2001, 42:28-36.

Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N., Jan, L.Y. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science.* 1987, 14;237(4816):770-5.

Tian, C., Zhu, R., Zhu, L., Qiu, T., Cao, Z., Kang, T. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chem Biol Drug Des.* 2014; 83(1):1-26.

Ueda, A., Wu, C. F. Distinct frequency-dependent regulation of nerve terminal excitability and synaptic transmission by IA and IK potassium channels revealed by *Drosophila* Shaker and Shab mutations. *J Neurosci.* 2006, 7; 26(23):6238-48.

Vähäsöyrinki, M., Niven, J. E., Hardie, R. C., Weckström, M., Juusola, M. Robustness of neural coding in *Drosophila* photoreceptors in the absence of slow delayed rectifier K<sup>+</sup> channels. *J Neurosci.* 2006, 8; 26(10):2652-60.

Van Driessche, W., Zeiske, W. Ionic Channels in epithelial cell membranes. *Physiol Rev.* 1985, 65: 833-903.

Wang, S., Morales, M. J., Qu, Y. J., Bett, G. C., Strauss, H. C., Rasmusson, R. L. Kv1.4 channel block by quinidine: evidence for a drug-induced allosteric effect. *J Physiol.* 2003; 546:387-401.

Wareing, M., Bai, X., Seghier, F., Turner, C. M., Greenwood, S. L., Baker, P. N., Taggart, M. J., Fyfe, G. K. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291(2):R437-46.

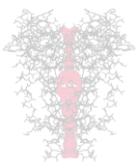
Wei, A., Jegla, T., Salkoff, L. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology.* 1996; 35(7):805-29.

Yan, L., Figueroa, D. J., Austin, C. P., Liu, Y., Bugianesi, R. M., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J., Kohler, M. G. Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets. *Diabetes.* 2004; 53(3):597-607.

Ye, S., Li, Y., Jiang, Y. Novel insights into K<sup>+</sup> selectivity from high-resolution structures of an open K<sup>+</sup> channel pore. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010, 17: 1019-1023.

Yellen, G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature.* 2002 5;419(6902):35-42

Yellen, G., Jurman, M. E., Abramson, T., MacKinnon, R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science.* 1991; 22; 251(4996):939-42.



Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T. Y., Jurman, M. E. An engineered cysteine in the external mouth of a K<sup>+</sup> channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J.* 1994; 66(4):1068-75.

Yeola, S. W., Rich, T. C., Uebele, V. N., Tamkun, M. M., Snyders, D. J. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res.* 1996; 78(6):1105-14.

Yu, D., Feng, C., Guo, A. Altered outward K<sup>+</sup> currents in *Drosophila* larval neurons of memory mutants *rutabaga* and *amnesiac*. *J Neurobiol.* 1999; 40, 158 – 170.

Yusaf, S. P., Wray, D., Sivaprasadarao, A. Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflugers Arch.* 1996; 433(1-2):91-7.

Zagotta, W. N., Hoshi, T., Aldrich, R. W. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science.* 1990, 26; 250(4980):568-71.

Zagotta, W. N., Hoshi, T., Aldrich, R. W. Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J Gen Physiol.* 1994; 103:321–62

Zhong, Y., Budnik, V., Wu, C. F. Synaptic plasticity in *Drosophila* memory and hyperexcitable mutants: role of cAMP cascade. *J Neurosci.* 1992; 12(2):644-51.

Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., MacKinnon, R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature.* 2001a, 414:43-48.

Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., MacKinnon, R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature.* 2001b, 411:657-661.

Zhu, Y., Ikeda, S. R. Anomalous permeation of Na<sup>+</sup> through a putative K<sup>+</sup> channel in rat superior cervical ganglion neurons. *J. Physiol.* 1993, 468:441-461.