

TD 480

124

153

Francisco José Monje Quiroga

**Subunidades  $\alpha$ -reguladoras de canales de  $K^+$ ;  
determinantes moleculares de la función de Kv2.3**

**Francisco José Monje Quiroga**

**Tesis presentada para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla**

**Sevilla, 1999**

R.18.264





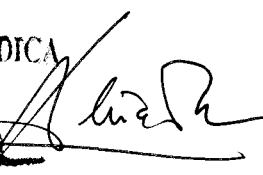
D. José López Barneo, Catedrático y Director del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla y Dña. María Dolores Chiara, Profesora Asociada de Universidad e Investigadora contratada del Servicio Nacional de Salud, ambos adscritos al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que D. Francisco José Monje Quiroga ha realizado bajo su dirección la memoria titulada "Subunidades  $\alpha$ -reguladoras de canales de  $K^+$ ; determinantes moleculares de la función de  $Kv2.3$ ", la cual se presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 10 de mayo de 1999

Fdo:

    
DPTO. DE FISILOGIA MEDICA  
Y BIOFISICA  
FACULTAD DE MEDICINA

José López Barneo

María Dolores Chiara

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José López Barneo por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por compartir conmigo amable y desinteresadamente los frutos de su experiencia científica y por la inestimable generosidad con que supo apoyarme en los momentos críticos. A la Dra. María D. Chiara por su gran calidad humana y profesional, por la responsabilidad y compromiso con la que acogió la codirección de esta memoria y por su impecable comportamiento docente. Al Dr. Antonio Castellano, quien identificó la proteína sobre la que se centra este estudio, por su valiosa colaboración y asesoría siempre oportuna.

Mi sincero sentimiento de gratitud al Dr. Rodolfo Llinás R. y al Dr. Herman Moreno D. por su labor docente y su invaluable contribución a mi formación científica y personal.

Al Dr. Elkin Rey, Dr. Tarik Smani, Dr. Ricardo Pardal y Dra. Pilar Pérez, Dr. Antonio Molina, Dr. Rafael Montoro, Dr. Juan J. Toledo, Dr. Juan Ureña, Dra. Patricia Ortega, Dra. Julia García-Hirschfeld, Dr. Uwe Ludewig, Dña. Concha Marcos, Dra. Lucía Tabares, Dr. Guillermo Alvarez de Toledo, Dr. José Ramón Naranjo, Dr. Alfredo Franco Obregón, Dr. Emilio Fernández Espejo, Dr. Eladio Gil Piñeros, Dr. Juan C. Mateos, Dr. Francisco Sánchez Doblado, Dr. Juan Ribas S., Dr. Juan Manuel Poyato, Dr. Satoru Iwabuchi, Dr. Cesar Bernabe, D. Juan P. Acevedo, Dr. Hernando Acevedo, Dr. Luis E. Peña y Dra. Martha V. Vega Z.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla por su colaboración en el desarrollo de esta memoria y por su amistad y estímulo constante.

**La realización de esta memoria ha sido posible gracias al soporte financiero, técnico y humano de:**

**COLCIENCIAS**

**Organización de Estados Iberoamericanos O.E.I.**

**The British Council - Colombia y Madrid**

**Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla**

*A mi Padre,  
Francisco Arcenio Monje Rojas*

*A mi Hermano,  
Juan Carlos Monje Quiroga*

*A mi Gran Amiga  
Beatriz Campo Fernández*

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Estructura general de los canales de K <sup>+</sup> dependientes del voltaje.....	2
2. Estados funcionales de los canales de K <sup>+</sup> dependientes del voltaje.....	4
3. Relación entre la estructura y la función de los canales de K <sup>+</sup> dependientes del voltaje.....	6
3.1. Activación y mecanismo sensor del voltaje.....	6
3.2. Mecanismos de inactivación.....	7
3.3. Proceso de cierre.....	11
3.4. Mecanismos de conducción y de selectividad.....	12
4. Mecanismos generadores de diversidad funcional en los canales de K <sup>+</sup> dependientes del voltaje.....	14
5. Características generales de la subunidad Kv2.3.....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	24
1. Construcción de los DNAc quiméricos que codifican subunidades $\alpha$ de canales de K <sup>+</sup> .....	24
1.1. Uso de técnicas generales de biología molecular.....	25
1.1.1. Preparación de fragmentos de los DNAc para la construcción de las subunidades quiméricas.....	25

1.1.2. Ligación de los fragmentos de DNAC y comprobación de las secuencias clonadas.....	26
1.1.3. Expresión de proteínas quiméricas in vitro.....	26
1.1.4. Empleo de la técnica de <i>Northern blot</i> .....	27
1.2. Estrategias para la construcción de las subunidades $\alpha$ quiméricas.....	27
2. Expresión funcional de las subunidades $\alpha$ recombinates de canales de $K^+$ .....	39
2.1. Uso de la línea celular CHO.....	40
2.2. Condiciones de cultivo celular.....	41
2.2.1. Medio de cultivo.....	41
2.2.2. Cultivo celular.....	41
2.2.3. Subcultivo celular.....	41
2.3. Transfección de los DNA plasmídicos.....	42
2.4. Empleo de la proteína de fluorescencia verde (GFP).....	44
3. Registros electrofisiológicos.....	46
3.1. Soluciones de registro.....	46
3.2. Preparación de las micropipetas de registro.....	47
3.3. Registros electrofisiológicos de las células CHO transfectadas: técnica de <i>patch clamp</i> .....	48
3.3.1. Dispositivo electrónico.....	49
3.3.2. Equipo informático y de registro.....	51
3.4. Proceder experimental.....	52
4. Protocolos de pulsos de voltaje y parámetros cinéticos de las corrientes de $K^+$ registradas.....	57
<b>RESULTADOS</b> .....	64
1. Caracterización funcional de la subunidad Kv2.3.....	65
1.1. La proteína Kv2.3 es una subunidad $\alpha$ de canal de $K^+$ eléctricamente silente.....	65

1.2. La proteína Kv2.3 es una subunidad $\alpha$ de canal de $K^+$ con características reguladoras.....	69
1.2.1. La subunidad Kv2.3 regula selectivamente a los canales miembros de la familia Kv2.....	69
1.2.2. Caracterización de los efectos reguladores de Kv2.3 sobre Kv2.1.....	72
1.3. La subunidad Kv2.3 se inserta en la bicapa lipídica y forma canales heteroméricos con Kv2.1.....	78
1.3.1. Estudio funcional de la proteína dimérica Kv2.1-Kv2.3.....	78
1.3.2 Estudio funcional de la sensibilidad al $Zn^{2+}$ extracelular.....	84
2. Identificación de los determinantes moleculares responsables de la acción reguladora ejercida por Kv2.3.....	86
2.1. Estudio de las quimeras ChA y ChB.....	86
2.2. Estudio de las quimeras Ch1 y Ch2.....	88
2.3. Estudio de las quimeras Ch3, Ch4 y Ch5.....	90
2.4. Estudio de las quimeras Ch6 y Ch7. ....	92
3. Propiedades cinéticas de los canales homoméricos formados por quimeras Kv2.1/Kv2.3.....	103
4. Estudio del proceso de inactivación de los canales Kv2.1.....	114
<b>DISCUSIÓN</b> .....	125
1. La proteína Kv2.3 es una subunidad $\alpha$ de canal de $K^+$ dependiente del voltaje eléctricamente silente.....	125
2. La subunidad $\alpha$ reguladora Kv2.3 es específica y selectiva para los canales miembros de la familia Kv2.....	129



3. El dominio NRD es la región molecular de la subunidad Kv2.3 responsable de su actividad reguladora: participación en los procesos cinéticos de activación, inactivación y desactivación.....	133
4. Importancia fisiológica de la existencia de subunidades $\alpha$ reguladoras de canales de $K^+$ dependientes del potencial de membrana.....	139
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>142</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>146</b>
<b>APENDICE 1.....</b>	<b>162</b>
<b>APENDICE 2.....</b>	<b>163</b>
<b>APENDICE 3.....</b>	<b>164</b>

## INTRODUCCIÓN

Los canales de potasio son proteínas intrínsecas de membrana que permiten el paso selectivo de iones potasio ( $K^+$ ) entre el interior y el exterior celular. Estas proteínas se distribuyen ubicuamente en los diferentes organismos vivientes, expresándose tanto en bacterias como en células vegetales, levaduras y eucariotas superiores (Baumann et al., 1988; Hille, 1992; Armstrong, 1998; Perozo et al, 1998). Los canales de  $K^+$  participan en funciones celulares tales como la osmorregulación o la transducción de señales, y son imprescindibles para la actividad eléctrica cardíaca y la señalización eléctrica del sistema nervioso central (ver Hille, 1992). Entre los diferentes tipos de canales de  $K^+$  descritos se encuentran los activados por el potencial eléctrico transmembranario, los cuales se conocen como canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. Estos canales participan en procesos fisiológicos como la génesis del potencial de membrana en reposo, la repolarización de los potenciales de acción o el control del disparo repetitivo en neuronas y otras células excitables (Connor y Stevens, 1971; Rogawski, 1985; Rudy, 1988; Hille, 1992).

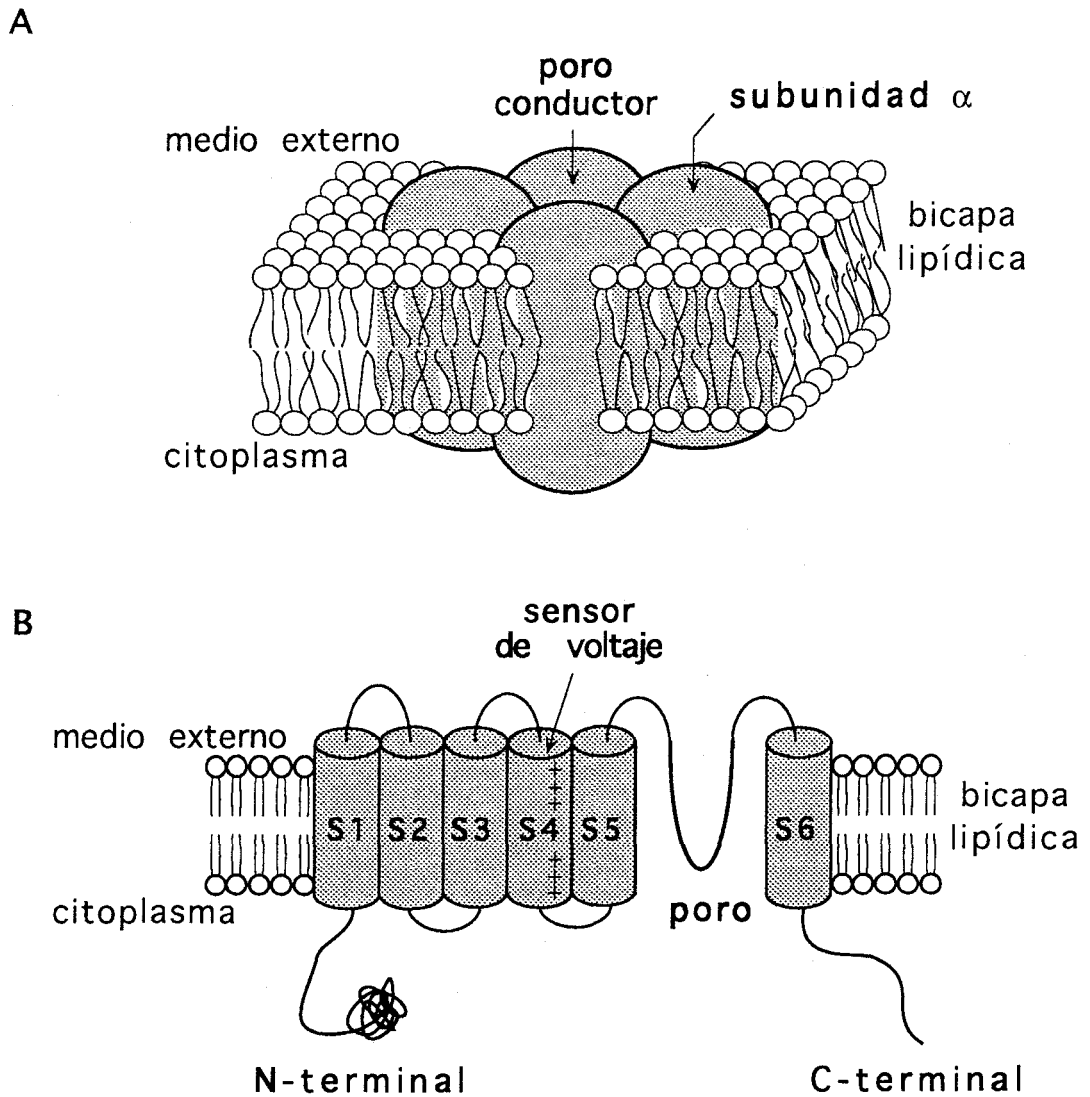
## 1. Estructura general de los canales de $K^+$ dependientes del voltaje

El primer gen codificante de un canal de  $K^+$  se clonó a partir del genoma de la mosca *Drosophila melanogaster* (Tempel et al., 1987). Dicho gen fue denominado *Shaker* (del inglés "agitador") debido a que las mutaciones en este gen producen un fenotipo caracterizado por un movimiento tremorígeno permanente de las moscas (Kaplan y Trout, 1969; Trout y Kaplan, 1973; Jan et al., 1977). Los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje se clasifican generalmente en base a sus propiedades funcionales y a sus características moleculares. De forma general, funcionalmente pueden clasificarse en canales de rectificación retardada (*delayed rectifiers* o  $I_{KV}$ ), canales tipo-A (*A-channels* o  $I_A$ ) y canales rectificadores de entrada, también llamados de rectificación anómala (*inward rectifiers* o *anomalous rectifiers*).

Los canales de rectificación retardada y los tipo-A tienen características funcionales prácticamente idénticas; ambos se activan en respuesta a voltajes depolarizantes siendo sus principales diferencias el umbral de voltaje para la activación y la velocidad de la inactivación (ver más adelante). Por el contrario, los canales rectificadores de entrada se activan en respuesta a potenciales de membrana hiperpolarizantes. Estos canales son tetrámeros compuestos por subunidades formadas por una cadena de aminoácidos con dos segmentos (hélices alfa) transmembranarios M1-M2 y grupos amino y carboxilo terminales orientados hacia el citoplasma celular. La presente memoria se centra principalmente en los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje del tipo rectificadores retardados o del tipo-A. Estos canales son proteínas transmembranarias formadas por cuatro subunidades  $\alpha$  homólogas que forman un poro hidrofílico conductor altamente selectivo al paso de iones  $K^+$ . El análisis de los perfiles de hidrofobicidad indica que cada subunidad  $\alpha$  está formada por una región central compuesta por seis segmentos transmembranarios (S1-S6) conectados entre sí por aminoácidos que

forman lazos extra e intracelulares (ver Fig. 1). La región central está flanqueada por un dominio hidrofílico amino y otro carboxilo terminal localizados en el citosol (Tempel et al., 1987; McKinnon, 1991b; Jan y Jan, 1994). La región S1 a S6 es el dominio molecular más conservado filogenéticamente en los canales de  $K^+$ , mientras que las regiones amino y carboxilo terminales, así como el lazo extracelular que une S1 y S2, presentan mayor variabilidad entre los diferentes canales (MacKinnon, 1991a; Rudy et al., 1991). Entre los segmentos S5 y S6 existe una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos que penetran en la bicapa lipídica y forman el denominado poro de conducción (ver Fig. 1). Se ha descrito además que el segmento S4, conocido como el sensor del voltaje, contiene aminoácidos con carga positiva que determinan la sensibilidad de los canales a los cambios del potencial eléctrico transmembranario (Fig. 2; ver más adelante).

Mediante la utilización de sondas con homología al canal *Shaker* se han identificado diferentes genes de canales de  $K^+$ , los cuales se han clasificado en diferentes familias génicas según el porcentaje de homología en sus secuencias de aminoácidos (Schwarz et al., 1988; Timpe et al., 1988; Kamb et al., 1988; Baumann et al., 1988; Stühmer et al., 1988; Hille, 1992). Hasta la fecha se han descrito cuatro grandes familias de genes de canales de  $K^+$  conservados en moscas, ratones y humanos, denominadas *Shaker*, *Shab*, *Shaw* y *Shal* (de *Drosophila*). Sus equivalentes en otras especies se han denominado Kv1, Kv2, Kv3 y Kv4, respectivamente (ver Salkoff et al., 1992). En el genoma de *Aplysia* también se ha descrito la existencia de un gen, homólogo a *Shaker*, clasificado como miembro de una nueva familia (Kv5). Los canales que pertenecen a una misma familia comparten una homología en su estructura primaria superior al 70%, mientras que la homología es menor del 50% en miembros de diferentes familias (Kamb et al., 1987; Papazian et al., 1987a; Pongs et al., 1988; Stühmer et al., 1989; Chandy y Gutman, 1993; Zhao et al., 1994).

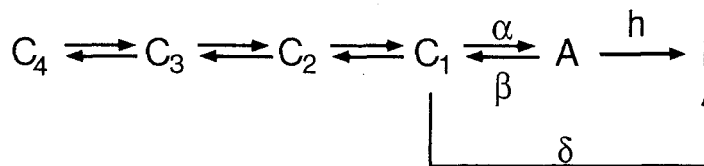


**Fig. 1.** Estructura propuesta para los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. (A) Modelo de un canal formado por cuatro subunidades  $\alpha$  idénticas coensambladas en la membrana y formando un poro hidrofílico conductor. (B) Modelo de la estructura secundaria de una de las cuatro subunidades  $\alpha$  que constituyen el canal. Los segmentos S1 a S6 se representan por cilindros grises. En el segmento S4 se representan (con signos positivos) los aminoácidos dibásicos que constituyen el sensor del voltaje. El poro conductor se localiza en el lazo que une los segmentos S5 y S6.

## 2. Estados funcionales de los canales de $K^+$ dependientes del voltaje

En respuesta a los cambios del potencial de membrana los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje experimentan una serie de cambios conformacionales que conducen a la apertura del poro conductor. Cuando el potencial de membrana tiene valores inferiores a  $-70$  mV, los canales

permanecen mayoritariamente en el denominado **estado cerrado**. Si se produce una despolarización, los canales pasan del estado cerrado al **estado abierto**. Este proceso, denominado *activación*, no ocurre en un único paso, pues los canales deben pasar por varios estados cerrados hasta alcanzar el estado abierto. Estas transiciones secuenciales durante la activación del canal determinan que las corrientes de  $K^+$  registradas presenten un curso temporal que se ajusta a una ecuación de tipo sigmoideo. Si la membrana permanece despolarizada varios segundos, los canales pueden experimentar una transición hacia un estado conformacional no conductor, diferente del estado cerrado, denominado **estado inactivado**. Esta transición, denominada *inactivación*, generalmente ocurre cuando los canales se encuentran en el estado abierto. Sin embargo, algunos canales pueden inactivarse desde el estado cerrado (*inactivación desde el estado cerrado*). Las transiciones moleculares que experimentan los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje se pueden representar de forma simple mediante un diagrama de estados como el que se presenta en el esquema 1.



**Esquema. 1.** Representación de las transiciones moleculares que experimentan los canales de  $K^+$  en respuesta a los cambios del potencial eléctrico transmembranario.  $C_4$  a  $C_1$ , representan los diferentes estados cerrados. A, representa el estado abierto. I, representa el estado inactivado.  $\alpha$ , representa la constante de velocidad del paso desde el estado cerrado  $C_1$  al estado abierto,  $\beta$  la constante de velocidad del paso desde el estado abierto al estado cerrado  $C_1$ .  $h$ , la constante de velocidad del paso desde el estado abierto al estado inactivado y  $\delta$  representa la constante de velocidad del paso desde el estado cerrado  $C_1$  al estado inactivado (*inactivación desde el estado cerrado*).

Si los canales están abiertos y se hiperpolariza la membrana, éstos pasan del estado abierto al estado cerrado  $C_1$ . Esta transición se denomina *cierre* o *desactivación* y ocurre siempre que la despolarización no sea tan duradera como para que los canales se inactiven. Si la membrana se

mantiene hiperpolarizada durante un cierto tiempo, los canales que se encuentran en el estado inactivado pueden volver al estado cerrado (*recuperación de la inactivación*). Algunas características cinéticas de los canales iónicos fueron descritas mucho antes de que se clonara el primer gen de un canal (ver Hodgkin y Huxley, 1952; Hodgkin y Keynes, 1955; Armstrong, 1975). Posteriormente, gracias a la combinación de las técnicas electrofisiológicas y de biología molecular, se han identificado algunos de los dominios moleculares que determinan las características funcionales de los canales de  $K^+$ . Más recientemente, mediante el análisis de fragmentos de canales purificados y cristalizados, se han logrado avances importantes en el estudio de la estructura tridimensional y su relación con las propiedades funcionales de este tipo de proteínas (ver Mac Kinnon et al., 1998; Perozo et al., 1998).

### **3. Relación entre la estructura y la función de los canales de $K^+$ dependientes del voltaje.**

#### **3.1. Activación y mecanismo sensor del voltaje.**

La secuencia de aminoácidos que forma el segmento S4 es una de las más conservadas entre los diferentes tipos de canales iónicos dependientes del voltaje. Este segmento contiene un aminoácido lisina o arginina (cargados positivamente a pH fisiológico) cada tres residuos aminoacídicos (Fig. 2). Estos aminoácidos determinan que la proteína cambie su estructura conformacional hacia el estado abierto en respuesta a los cambios del voltaje transmembrana. En general, un menor número de cargas positivas en S4 hace necesaria una mayor diferencia de voltaje para abrir el canal, por lo que el segmento S4 es conocido como el **sensor del voltaje** (Stühmer et al., 1988; Liman et al., 1991; Aggarwal y McKinnon, 1996; Larsson et al., 1996; Yang et al., 1996). El mecanismo molecular de activación y apertura del poro es poco conocido. Se postula que el cambio del campo eléctrico transmembrana provoca el desplazamiento del

segmento S4 en la bicapa lipídica, lo que induce cambios conformacionales en la proteína que conducen a la apertura del poro conductor (Armstrong y Bezanilla, 1973; Bezanilla et al., 1991; Hoshi et al., 1994; Aggarwal y MacKinnon, 1996; Mannuzzu et al., 1996; Seoh et al., 1996).

En los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje el segmento S4 debe distinguirse de la región postulada como la *compuerta de activación*. En los canales de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Na^+$ , se postula que dicha compuerta se localiza en la región del vestibulo interno del poro. En el canal de  $Na^+$ , la compuerta de activación parece estar formada por los aminoácidos que forman el lazo intracelular entre S4-S5, ya que las alteraciones de dicha región afectan dramáticamente la apertura y el cierre del canal sin impedir el desplazamiento del segmento S4. Sin embargo, los dominios moleculares que forman la compuerta de activación de los canales de  $K^+$  no se conoce con exactitud.

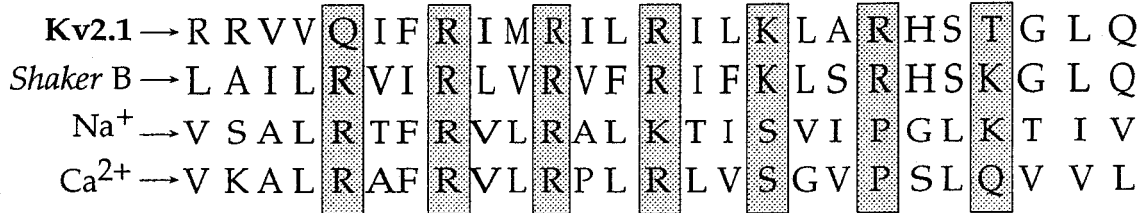


Fig. 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del segmento S4 de los canales Kv2.1, Shaker B, canal de  $Na^+$  tipo II de cerebro de rata, y canal de  $Ca^{2+}$  de musculo esquelético de rata. Tanto en el canal de  $Na^+$  como en el de  $Ca^{2+}$ , se representa el segmento S4 del primer dominio. En las cajas sombreadas se muestra la correspondencia entre los aminoácidos cargados positivamente.

### 3.2. Mecanismos de inactivación.

Como se ha mencionado, la inactivación es la transición de los canales desde el estado abierto a otro estado no conductor, diferente del estado cerrado, denominado inactivado. El curso temporal de la inactivación de los canales de  $K^+$  es de gran importancia fisiológica, ya que determina la duración de los potenciales de acción o la frecuencia del disparo repetitivo (ver Hille, 1992). La mayoría de los canales iónicos



presentan una inactivación cuyo curso temporal sigue una cinética de primer orden, es decir, que se ajusta a una función exponencial sencilla. Desde el punto de vista molecular, los mecanismos de inactivación mejor conocidos son los denominados inactivación tipo-N y tipo-C.

### Inactivación tipo-N.

Uno de los primeros modelos de inactivación descritos, propuesto para explicar el mecanismo molecular de inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$ , es el denominado de "la bola y la cadena" (*ball and chain*). Según este modelo, la inactivación ocurre debido a que un dominio intracelular del canal (la bola), unido a la proteína mediante un lazo de aminoácidos (la cadena), se desplaza hacia la región conductora de los canales bloqueándolos (Armstrong y Bezanilla, 1977). Posteriormente, mediante técnicas de biología molecular, se construyeron canales quiméricos en los que se intercambiaron las regiones amino terminales entre diferentes canales *Shaker*, o se hicieron deleciones sistemáticas del extremo amino terminal del canal *Shaker* B. El análisis funcional de estos canales permitió demostrar que la inactivación de los canales *Shaker* dependía de los primeros 22 aminoácidos del extremo amino terminal, por lo que a dicho proceso se le denominó inactivación **tipo-N** (Iverson y Rudy, 1990; Hoshi et al., 1990; Zagotta y Aldrich, 1990). Como se representa en la Fig. 3A, la región inicial del extremo amino (un péptido de ~20 aminoácidos) de los canales *Shaker*, forma un péptido globular (la bola) seguida de una serie de aminoácidos (la cadena) que le unen al resto de la molécula. Cuando los canales están abiertos, el péptido se desplaza hasta las regiones del vestíbulo interno del poro bloqueando el flujo iónico (Fig. 3A). El péptido inactivante contiene aminoácidos con carga positiva que favorecen su desplazamiento hacia una región receptora, cargada negativamente, que se localiza en las regiones del vestíbulo interno del poro (ver Hoshi et al., 1990; Zagotta y Aldrich, 1990; Isacoff et al., 1991). Cuando los canales están cerrados la secuencia receptora está inaccesible al péptido inactivante. La

interacción entre ambas regiones sólo se produce tras la activación, una vez que los cambios conformacionales que ocurren en S4 hacen accesible la región receptora (Hoshi et al., 1990; Zagotta y Aldrich, 1990). La delección de la región que forma el péptido inactivante de los canales *Shaker B* (*Shaker B*  $\Delta 6-46$ ) produce la eliminación de la inactivación tipo-N (ver Fig. 3C). No obstante, cuando a dicho canal delecionado se le añade el péptido, sintetizado *in vitro*, se recupera la inactivación tipo-N (Zagotta et al., 1990).

### Inactivación tipo-C

En algunos canales de  $K^+$  que carecen de inactivación tipo-N, o en canales en los que se han delecionado los aminoácidos que forman la bola (como los canales *Shaker B*  $\Delta 6-46$ ), la aplicación de pulsos despolarizantes de larga duración da lugar a una inactivación completa de la corriente (ver Fig. 3D). A este proceso de inactivación, que persiste tras la eliminación de la inactivación tipo-N, se denomina inactivación **tipo-C** (Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1991). Los determinantes moleculares de la inactivación tipo-C no se conocen con exactitud, aunque se sabe que ésta depende de aminoácidos localizados en el lazo que une S5 y S6, en la región del poro y en el segmento S6 (ver Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1991; López-Barneo et al., 1993). Se postula que en la zona del poro existe un dominio que actúa como compuerta de inactivación tipo-C bloqueando el flujo iónico (ver Fig. 3B). También se ha demostrado que la inactivación tipo-C depende de la participación cooperativa de las cuatro subunidades alfa que forman el canal, las cuales se agrupan conjuntamente estrechando el poro hasta impedir el flujo iónico (ver Yellen et al., 1994; Ogielska et al., 1995; Panyi et al., 1995). Se sabe que la inactivación tipo-C es modulada por la ocupación de cationes extracelulares a nivel de la región del poro, ya que su curso temporal se enlentece significativamente en presencia de alto  $K^+$  o de TEA cuando éstos se aplican extracelularmente (Choi et al., 1991; López-Barneo et al., 1993; Panyi et al., 1995; Molina et al., 1997).

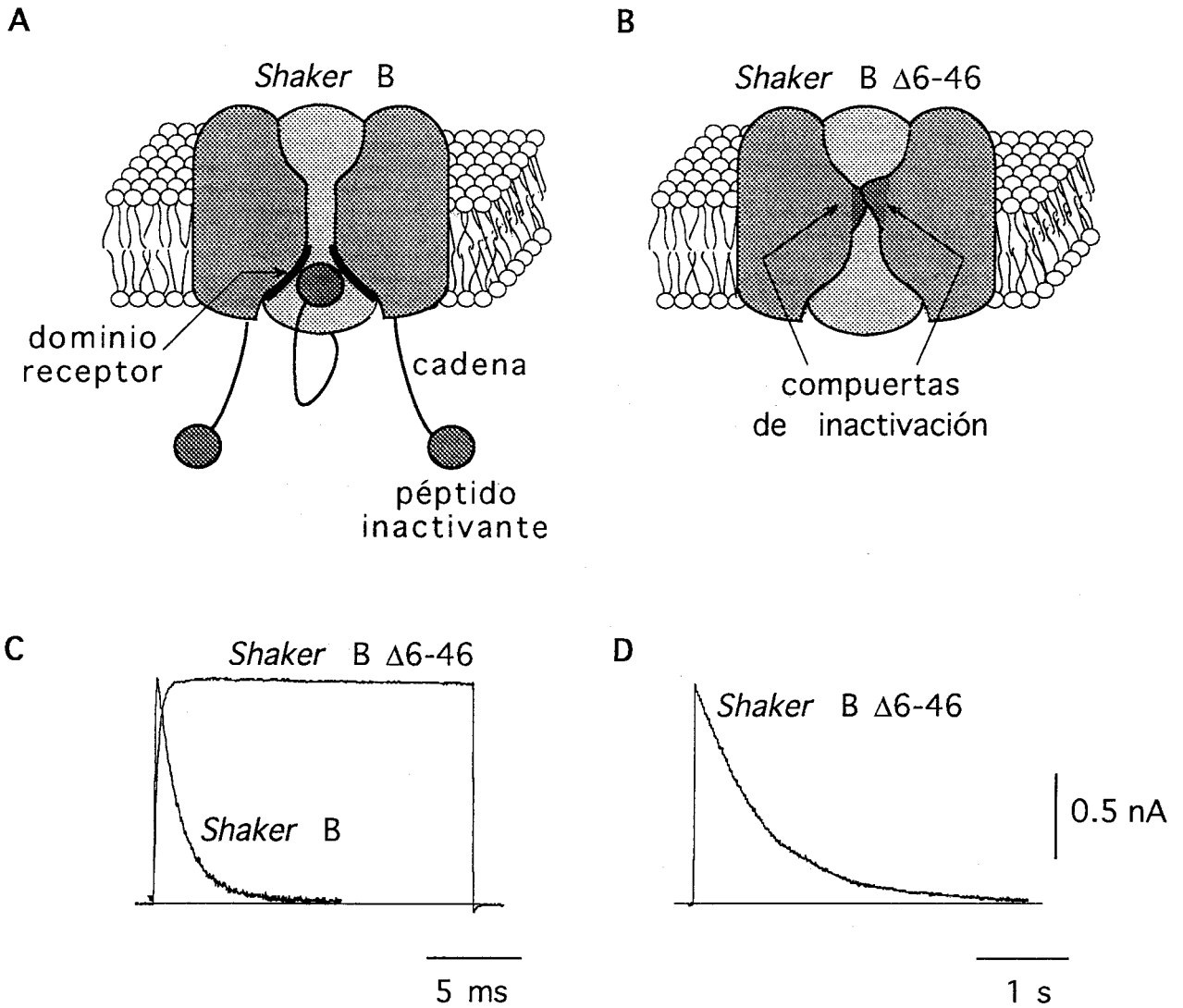


Fig. 3. Mecanismos inactivación tipo-N y tipo-C en los canales *Shaker B* ó *Shaker B*  $\Delta 6-46$ . (A) Inactivación tipo-N: El péptido inactivante, atraído por la zona receptora, bloquea la región interna del poro. (B) Inactivación tipo-C: El cambio conformacional de las compuertas de inactivación bloquean el flujo de iones a través del poro. (C) Corrientes representativas del proceso de inactivación tipo-N en los canales *Shaker B* o de la eliminación de dicho proceso en los canales *Shaker B*  $\Delta 6-46$ . (D) Corrientes representativas del proceso de inactivación tipo-C en los canales *Shaker B*  $\Delta 6-46$  (Nótese la diferencia en las bases de tiempo en C y D).

Se ha descrito que la inactivación tipo-C puede afectarse por modificaciones en aminoácidos específicos localizados en la región del poro, por lo que se ha propuesto la existencia de un mecanismo de inactivación denominado tipo-P (De Biasi et al., 1993b). Se postula que dicho tipo de inactivación se diferencia de la tipo-N y tipo-C por los efectos observados tras la aplicación interna y externa de TEA y por la modulación

por  $K^+$  externo (De Biasi et al., 1993b). En los canales *Shaker*, los procesos de inactivación tipo-C y tipo-P se pueden diferenciar por el hecho de que la inactivación tipo-C altera la dependencia del voltaje del movimiento de las cargas positivas en S4 que producen la activación, mientras que la inactivación tipo-P no produce dicho cambio en la sensibilidad al voltaje (ver Olcese et al., 1997; Loots y Isacoff, 1998). Se ha propuesto que en estos canales, tanto la inactivación tipo-C como tipo-P están determinadas por una única "compuerta de inactivación", cuyos determinantes moleculares estarían localizados en los dominios extracelulares del canal (ver Loots e Isacoff, 1998).

### 3.3. Proceso de cierre

El **cierre** o **desactivación**, es el paso de los canales desde el estado abierto (A) al estado cerrado  $C_1$  (ver esquema 1). Los determinantes moleculares del cierre son poco conocidos. Se postula que existe un dominio molecular que forma una "compuerta de cierre" la cual, tras la repolarización de la membrana, se desplaza y bloquea el flujo iónico a través del poro conductor (Armstrong, 1971). No obstante, tales dominios moleculares aún no han sido identificados. Se ha propuesto que en los canales iónicos dependientes del voltaje puede existir una compuerta de "activación-cierre" localizada intracelularmente. Tal observación se basa en los estudios de los efectos producidos por la aplicación intracelular de agentes bloqueantes como el TEA, ya que se ha encontrado que para que los canales puedan cerrarse es necesaria la disociación de dichos bloqueantes (Armstrong, 1971). Posteriormente se propuso que el lazo de unión entre los segmentos tranmembranarios S4 y S5 podría actuar molecularmente como compuerta de cierre, ya que mediante cambios en la reactividad de cisteínas accesibles se ha puesto de manifiesto que esta zona se mueve durante la apertura y el cierre de los canales (Holmgren et al, 1996).

### 3.4. Mecanismos de conducción y de selectividad

Los dominios moleculares responsables de la formación del poro y del mecanismo de conducción iónica no se conocen con exactitud. Se postula que el poro podría estar formado por los aminoácidos presentes en el lazo que une los segmentos S5 y S6 (ver Catteral, 1988; Guy y Conti, 1990). Este dominio molecular también es conocido como región "P", H5, o SS1-SS2. Se ha descrito que en la región P existe una secuencia específica de sólo 8 aminoácidos, los cuales atraviezan la bicapa lipídica y forman el poro conductor (Hartmann et al., 1991; Heginbotham et al., 1992; Kumpf y Dougherty 1993; Heginbotham et al., 1994). Se postula que la secuencia GYG, contenida en estos 8 aminoácidos (ver Fig. 4), constituye el denominado *filtro selectivo*, es decir, la región del canal que determina el tipo de ión que atravieza el poro (MacKinnon y Miller, 1989; MacKinnon y Yellen, 1990; MacKinnon, 1991b; Armstrong, 1998). La secuencia GYG está altamente conservada entre los diferentes tipos de canales de  $K^+$  (Heginbotham et al., 1992; Kumpf y Dougherty, 1993; Heginbotham et al., 1994). También se ha postulado que otras regiones del canal localizadas en dominios intracelulares (tales como el lazo que une los segmentos S4 y S5 o la secuencia de aminoácidos que forman los extremos amino o carboxilo terminales), podrían contribuir a la formación de la estructura molecular que forma el poro conductor (ver Hoshi et al., 1991; Slessinger et al, 1993; López et al., 1994; Miller, 1996; Marten y Hoshi, 1998).

Una característica fundamental de los canales de  $K^+$  es su capacidad para permitir el flujo selectivo de  $K^+$  entre otros iones diferentes. Aunque estos canales también pueden conducir iones de  $Na^+$ , el margen de selectividad para los iones  $K^+$  es, al menos, mil veces superior a la de los iones de  $Na^+$  (Doyle et al., 1998). En principio se postuló que el mecanismo de selectividad dependía específicamente de los tamaños del ión y del poro conductor. Sin embargo, el diámetro propuesto para la región que forma el filtro de selectividad es de  $\sim 3\text{\AA}$ , el diámetro de un ión  $K^+$  es de  $\sim 1.3\text{\AA}$  y el de

un ión  $\text{Na}^+$  es de  $\sim 0.95\text{\AA}$  (Armstrong, 1998; Doyle et al., 1998), por lo que las bases moleculares del mecanismo de selectividad no parecen depender del tamaño del ión o del poro conductor. En soluciones acuosas el ión  $\text{K}^+$  está rodeado por moléculas de agua que forman un complejo agua/ión (esfera de hidratación) con un diámetro de  $\sim 8\text{\AA}$ . Se sabe que el ancho del poro es de  $\sim 8\text{\AA}$  en las regiones de los vestíbulos interno y externo y de  $\sim 3\text{\AA}$  en la región que forma el *filtro selectivo*. Por tanto, la conducción a través de los canales de  $\text{K}^+$  implica la pérdida de la esfera de hidratación del ión y su sustitución por grupos cargados, cedidos por los aminoácidos que forman las paredes internas del poro (Hille, 1992; Armstrong, 1998; Doyle et al., 1998). Los iones  $\text{K}^+$  no se deshidratan de forma espontánea y requieren de energía para deshidratarse, por lo que éstos tienen que superar además una barrera energética para poder acceder al poro conductor (Edsall y McKenzie, 1978). Una vez dentro del poro, las fuerzas de repulsión entre iones favorecen el flujo.

La alta tasa de selectividad de los iones  $\text{K}^+$  sobre los de  $\text{Na}^+$  sugiere una fuerte interacción energética entre los iones  $\text{K}^+$  y el poro. No obstante, es sorprendente que tal interacción no afecte la enorme velocidad de conducción de los canales, que dejan pasar hasta 100 millones de iones por segundo. Se ha propuesto que la capacidad de selectividad de los canales de  $\text{K}^+$  se debe a que los iones  $\text{K}^+$  son mejor coordinados por los oxígenos de los grupos carbonilos presentes en los aminoácidos que forman el poro, que los iones de  $\text{Na}^+$ . La coordinación del  $\text{K}^+$  por los oxígenos da al ión una energía, como mucho, igual a la que éste tiene cuando se encuentra en soluciones acuosas. Por el contrario, la coordinación del  $\text{Na}^+$  da al ión una energía mayor cuando está en la zona del poro que cuando está en soluciones acuosas, lo que dificulta su paso a través del canal (Armstrong, 1998; Doyle et al., 1998). Se sabe que un único canal puede permitir el flujo pasivo de iones en favor de sus gradientes electroquímicos a una velocidad de hasta  $10^8$  iones por segundo (Hille, 1992). Esta elevada tasa de

conducción, desde el punto de vista molecular, permite además identificar y diferenciar el mecanismo de conducción iónica de un canal del de los transportadores iónicos tales como las bombas o los intercambiadores.

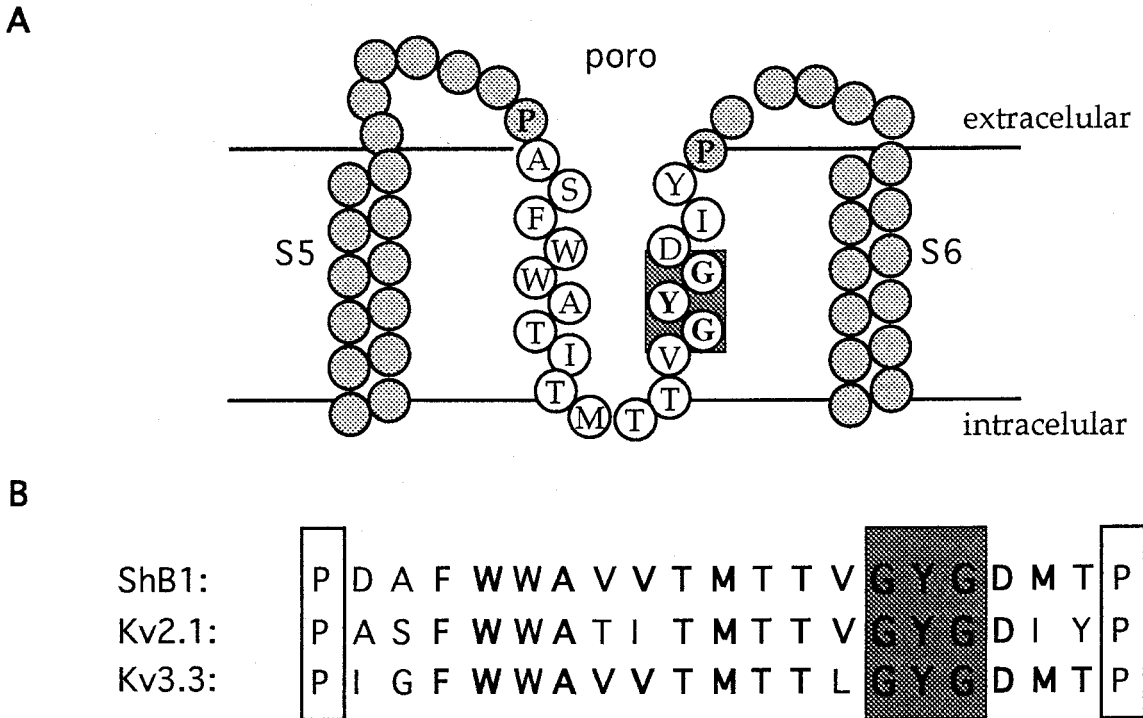


Fig. 4. Esquema de la estructura y aminoácidos del poro de los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. (A) Secuencia de los aminoácidos que forman el poro de los canales *Kv2.1* (entre círculos blancos). La secuencia que forma el *filtro selectivo* (GYG) se indica por un cuadro sombreado. (B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos que forman el poro de tres canales de  $K^+$  diferentes, miembros de la familia *Shaker* (los aminoácidos conservados, respecto al canal *Shaker*, se presentan en negrita). Las secuencias GYG se indican por un cuadro sombreado. Las secuencias que forman la región del poro están delimitadas por los aminoácidos prolina, indicados en cuadros de fondo blanco.

#### 4. Mecanismos generadores de diversidad funcional en los canales de $K^+$ dependientes del voltaje

Existe una gran diversidad funcional de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje, especialmente evidente en neuronas de mamíferos (Llinás, 1988; Rudy, 1988). Esta diversidad se debe fundamentalmente a una gran variabilidad de los canales a nivel molecular. Como se indicó anteriormente, existen múltiples genes que codifican diferentes familias de subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  (Drewe et al., 1992; Hwang et al., 1992; Deal et al., 1994; Weiser et al., 1994). Además, esta variabilidad molecular

se puede incrementar mediante la maduración alternativa de los precursores de los RNAm. Por tanto, existe una gran variedad de fenotipos de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje que tienen características biofísicas y farmacológicas significativamente diferentes. La diversidad molecular y funcional de los canales de  $K^+$  se puede ver incrementada debido a los cambios en su composición oligomérica. Se sabe que los canales de  $K^+$  están formados por el coensamblaje de 4 subunidades  $\alpha$  idénticas que forman canales homotetraméricos (ver Hille, 1992). Sin embargo, se ha demostrado que existen canales de  $K^+$  formados por subunidades  $\alpha$  diferentes, las cuales se coensamblan y constituyen canales funcionales heteroméricos con características cinéticas diferentes de las que tienen los homómeros de cada subunidad. La mayoría de los canales heteroméricos identificados hasta la fecha están formados por la combinación de subunidades  $\alpha$  diferentes, pero que pertenecen a la misma familia génica (Christie et al., 1990; Isacoff et al., 1990; Ruppertsberg et al., 1990; Covarrubias et al., 1991; Li et al., 1992; Sheng et al., 1993; Wang et al., 1993). No obstante, se ha descrito que pueden existir canales heterotetraméricos constituídos por el coensamblaje de subunidades  $\alpha$  que no pertenecen a la misma familia génica. Por ejemplo, las subunidades Kv1.2 pueden formar canales heteroméricos funcionales con las subunidades Kv3.1 (Shahidullah et al., 1995).

Existen además otro tipo de subunidades que, aunque permanecen en el medio intracelular, también pueden interaccionar con los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje y regular su función. Estas subunidades, denominadas beta ( $\beta$ ), pueden asociarse de forma selectiva con las subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  y modificar sus propiedades cinéticas (Heinemann et al., 1992; Parcej et al., 1992; Rettig et al., 1994; Scott et al., 1994; Chouinard et al., 1995; Knaus et al., 1995; McCormak et al., 1995; McManus et al., 1995; Pongs, 1995; Heinemann et al., 1986, Yu et al., 1996).



Recientemente, se ha descrito la existencia de un nuevo mecanismo generador de diversidad estructural y funcional en los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. Se han clonado una serie de genes que codifican proteínas con las características estructurales típicas de las subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. Sin embargo, los experimentos de expresión heteróloga y los registros electrofisiológicos indican que estas proteínas no forman canales de  $K^+$  funcionales, por lo que se les conoce como *eléctricamente silentes* (Castellano et al., 1996, 1997; Hugnot et al., 1996; Salinas et al., 1997a, 1997b). Las subunidades de este tipo identificadas hasta la fecha no presentan el grado de homología estructural establecido para ser clasificadas como miembros de alguna de las subfamilias de *Shaker*. Por ello, estas proteínas silentes se han clasificado como subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  miembros de nuevas familias génicas, denominadas Kv6 a Kv9 (ver Hugnot et al., 1996; Salinas et al., 1997a; Patel et al., 1997). No obstante, la subunidad Kv2.3 presenta un grado de homología que está muy cerca del límite requerido para ser clasificado como miembro de la familia génica Kv2 (ver más adelante). A pesar de que este tipo de subunidades  $\alpha$  son eléctricamente silentes, se ha descrito que pueden interaccionar funcionalmente con subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  que sí forman canales homoméricos conductores. Como resultado de esta interacción se generan nuevos canales de  $K^+$  de tipo heterotetramérico que tienen características funcionales significativamente diferentes de las observadas en los canales homoméricos (ver Castellano et al., 1996, 1997; Salinas et al., 1997a). La existencia de subunidades de este tipo con propiedades moduladoras ha dado lugar al concepto de **subunidad  $\alpha$  reguladora**, que constituye un nuevo mecanismo generador de diversidad molecular y funcional de los canales de  $K^+$  dependientes del potencial de membrana. Dicho mecanismo de modulación es además altamente selectivo, ya que las subunidades reguladoras parecen ejercer su acción de

forma específica sobre los canales miembros de una única familia génica. Hasta la fecha, se han descrito al menos 6 tipos de subunidades  $\alpha$  reguladoras de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje (Castellano et al., 1996, 1997; Hugnot et al., 1996; Patel et al., 1997; Salinas et al., 1997a, 1997b; Zhu et al., 1998; Jegla y Salkoff, 1997). Entre los principales efectos que ejercen las subunidades  $\alpha$  reguladoras sobre los canales de  $K^+$  se encuentran las modificaciones de las cinéticas de activación, inactivación y cierre, el cambio de la sensibilidad al voltaje transmembranario o el hecho de que los canales se hacen más sensibles al bloque parcial inducido por el  $Zn^{2+}$  extracelular (Castellano et al., 1997). Las diferentes subunidades reguladoras pueden ejercer efectos completamente opuestos sobre un mismo canal. Así, mientras que una subunidad puede enlentecer el curso temporal de la activación otra subunidad puede ejercer un efecto de aceleración (Castellano et al., 1996, 1997; Patel et al., 1997).

En la Fig. 5, se representan esquemáticamente los principales mecanismos generadores de diversidad funcional de los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. Entre estos diferentes mecanismos, la modulación por subunidades  $\alpha$  reguladoras es el menos conocido. Las propiedades funcionales de estas subunidades han sido bien estudiadas y caracterizadas en experimentos *in vitro*, sin embargo, aún no se conocen con exactitud sus mecanismos de interacción molecular o los determinantes estructurales responsables de su acción reguladora. La coexpresión selectiva entre subunidades  $\alpha$  reguladoras y canales iónicos de  $K^+$  podría estar involucrada *in vivo* en el aumento de la diversificación de los fenotipos de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje y contribuir a aumentar el grado de especialización funcional de las células nerviosas. Este mecanismo de modulación es bien conocido para otros tipos de canales iónicos, tales como los receptores de N-metil-D-aspartato (ver Monyer et al., 1992) o para los canales asociados a receptores nicotínicos activados por acetilcolina (McGehee y Role, 1995).

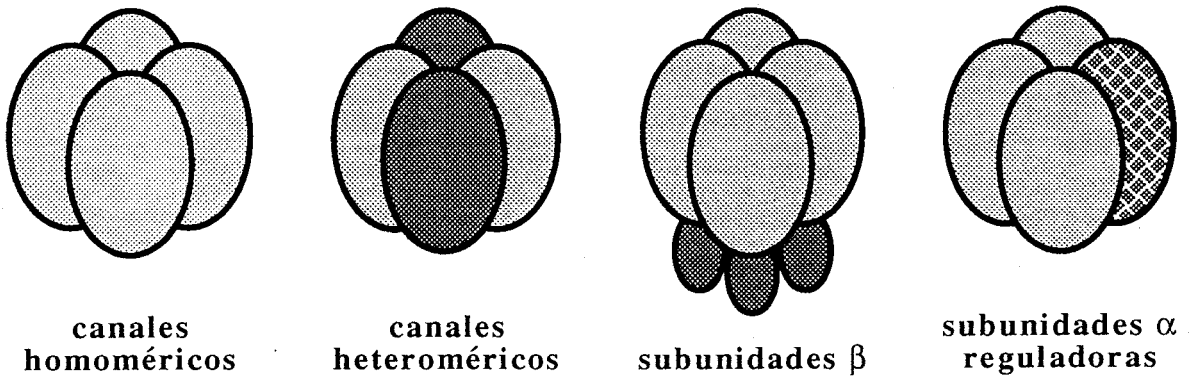


Fig. 5. Esquemas de los principales mecanismos generadores de diversidad molecular y funcional de los canales de  $K^+$  dependientes del potencial de membrana.

### 5. Características generales de la subunidad Kv2.3

El DNAc que codifica la subunidad  $\alpha$  de canal de  $K^+$  denominada Kv2.3, clonada por Castellano et al (1996, 1997), se obtuvo a partir de una preparación de RNAm de cortex cerebral de rata mediante transcripción inversa y amplificación por PCR usando oligonucleótidos degenerados. La secuencia completa del DNAc de la subunidad Kv2.3 se obtuvo tras el cribaje de una genoteca de DNAc de mesencéfalo e hipocampo de rata (ver Molina, 1997). Kv2.3 contiene 2318 nucleótidos con un marco abierto de lectura de 1509 nucleótidos. El análisis de hidrofobicidad de los aminoácidos de Kv2.3 predice la existencia de una proteína compuesta por seis segmentos que forman hélices  $\alpha$  transmembranarias, y dos dominios citoplasmáticos amino y carboxilo terminales. El DNAc de Kv2.3 teóricamente codifica una proteína, de 503 aminoácidos, que tiene las características generales de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje descritos (ver Tempel et al., 1987; MacKinnon, 1991b; Jan y Jan 1994). Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de Kv2.3 con las secuencias de las subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  conocidas, se encontró que Kv2.3 presentaba una mayor homología (44% de identidad) con las subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  miembros de la familia Kv2 (Kv2.1 y Kv2.2) que con los miembros de las otras familias génicas (Kv1, Kv3 ó Kv4). Las

mayores divergencias entre Kv2.3 y Kv2.1 se encontraron a nivel de los dominios citosólicos amino y carboxilo terminales. Si se comparan únicamente las secuencias de aminoácidos de la región central de Kv2.3 y Kv2.1, la homología entre ambas subunidades es de cerca del 50%. Además, en Kv2.3 se encuentra conservada la secuencia CALSF (aminoácidos 132-136 de la caja B), que es específica de los canales miembros la familia Kv2 (ver *Apéndice 2*). En base a los análisis de secuencia y al hecho de que Kv2.3 interacciona selectivamente con subunidades miembros de la familia Kv2 (ver apartado *Resultados*), se clasificó a Kv2.3 como un nuevo miembro de la familia Kv2 (ver Castellano et al., 1996, 1997).

Estudios realizados mediante la técnica de *Northern blot*, indican que existen por lo menos dos especies diferentes de RNAm para Kv2.3 con tamaños de aproximadamente 5 y 3.3 kilobases, los cuales se expresan específicamente en el tejido cerebral. Los estudios de localización del RNAm de Kv2.3, realizados mediante la técnica de *hibridación in-situ*, indican que éste se expresa profusa y selectivamente en áreas particulares del tejido neocortical, mayoritariamente en el neocortex frontal y en las capas corticales II, III y VI, expresándose en menor proporción en cerebelo, hipocampo, amígdala, cortex piriforme, cuerpo estriado, tuberculo y bulbo olfatorio, núcleo reticular lateral, septum y núcleo supraóptico. En estas regiones corticales también se expresan otras subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$ , incluidos los otros miembros de la familia Kv2 (Kv2.1 y Kv2.2).

## OBJETIVOS

Como se indicó en la *Introducción*, recientemente se ha descrito la existencia de un tipo de proteínas con características moleculares similares a las de los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje, pero con una función exclusivamente reguladora. La primera proteína con estas características que se identificó fue la denominada Kv2.3, la cual se clonó en nuestro laboratorio (Castellano et al., 1996, 1997). La modulación de canales iónicos por subunidades  $\alpha$  reguladoras constituye un nuevo mecanismo generador de diversidad molecular y funcional en los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. La existencia de proteínas homólogas a los canales de  $K^+$  con una función de tipo exclusivamente regulador podría tener una relevancia fisiológica considerable ya que estos canales determinan, entre otros procesos, la génesis del potencial de reposo neuronal, la repolarización de los potenciales de acción o la regulación del disparo repetitivo en las células nerviosas, cardíacas y otras células excitables. Debido a que las propiedades biofísicas y los determinantes moleculares de la función de este nuevo tipo de proteínas reguladoras aún se desconocen, el objetivo general del presente trabajo fue la caracterización molecular y funcional de la subunidad  $\alpha$  de canal de  $K^+$  denominada Kv2.3.

Para el estudio de las propiedades moleculares y funcionales de la subunidad Kv2.3 se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de las propiedades electrofisiológicas de la subunidad Kv2.3.

El DNAC de Kv2.3 tiene una homología de ~40% con el DNAC de la subunidad Kv2.1. Además, el análisis del DNAC de Kv2.3 predice la existencia de una proteína con las características moleculares típicas de los canales de K<sup>+</sup> dependientes del potencial de membrana. Por tanto, nuestro primer objetivo ha sido el examinar si la subunidad Kv2.3 forma o no canales de K<sup>+</sup> dependientes del voltaje. El abordaje experimental utilizado ha implicado el uso de técnicas de biología molecular, la expresión funcional de canales de K<sup>+</sup> en un sistema heterólogo y el uso de técnicas de registro electrofisiológico.

2. Estudio de los efectos funcionales de la coexpresión de Kv2.3 con otras subunidades  $\alpha$  de canales de K<sup>+</sup> miembros de diferentes familias génicas.

Se sabe que los canales de K<sup>+</sup> pueden estar formados por la interacción entre subunidades  $\alpha$  pertenecientes a familias génicas diferentes (canales heterotetraméricos). Estos heterotetrámeros dan lugar a la génesis de corrientes de K<sup>+</sup> con cinéticas distintas de las que tienen los canales formados por el ensamblaje homomérico entre subunidades. Por tanto, se examinaron las características electrofisiológicas de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células transfectadas con diferentes subunidades  $\alpha$  de canales de K<sup>+</sup> o cotransfectadas con cada subunidad más Kv2.3 con objeto de estudiar la interacción funcional entre Kv2.3 y los canales miembros de algunas de las familias génicas conocidas.

Entre todas las subunidades conocidas, los canales Kv2.1 son los que presentan los mayores niveles de expresión en el cerebro de mamíferos y son los que contribuyen mayoritariamente a la génesis de corrientes de K<sup>+</sup>

de rectificación retardada en neuronas de hipocampo. Además, Kv2.3 comparte su mayor homología estructural con los canales miembros de la familia Kv2 (Kv2.1 y Kv2.2). Dada la alta homología estructural entre las subunidades Kv2.1 y Kv2.3 y la relevancia fisiológica de los canales Kv2.1 en el cerebro de mamíferos, uno de nuestros objetivos particulares fue la caracterización de los efectos funcionales de la coexpresión de las subunidades Kv2.3 y Kv2.1.

### 3. Identificación de los dominios estructurales responsables de la función de la subunidad $\alpha$ Kv2.3.

Con objeto de identificar los determinantes moleculares responsables de la actividad funcional de Kv2.3 se construyeron proteínas quiméricas intercambiando diferentes regiones entre los DNAC de las subunidades Kv2.1 y Kv2.3. Las distintas subunidades quiméricas se coexpresaron con Kv2.1 en células CHO y, mediante técnicas electrofisiológico, se registraron las corrientes de potasio resultantes para estudiar los efectos funcionales debidos a las modificaciones introducidas en cada quimera.

### 4. Estudio de las propiedades cinéticas de canales homoméricos formados por quimeras Kv2.1/Kv2.3.

Con objeto de examinar las características funcionales de los canales formados por cada quimera y su relación con la presencia de diferentes regiones moleculares de las subunidades Kv2.1 o Kv2.3, el DNAC de cada quimera se transfectó en células CHO y se examinaron las corrientes de  $K^+$  resultantes utilizando la técnica de *patch clamp*. Los datos obtenidos en estos experimentos se contrastaron con los registrados a partir de la expresión de canales homoméricos Kv2.1.

## 5. Estudio de la inactivación de los canales Kv2.1.

El proceso de inactivación de algunos canales de  $K^+$ , como los canales tipo *Shaker*, ha sido bien estudiado y caracterizado. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de la inactivación de los canales de Kv2.1 no se conocen con exactitud. Con objeto de estudiar el proceso de inactivación de los canales Kv2.1 se examinaron los efectos de la aplicación intra y extracelular de TEA y de alto  $K^+$  extracelular sobre la inactivación de estos canales y su relación con los denominados mecanismos de inactivación tipo-N y tipo-C.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Con objeto de estudiar las bases moleculares implicadas en la función reguladora ejercida por la subunidad  $\alpha$  Kv2.3, se construyeron una serie de quimeras en las que se intercambiaron distintas secuencias codificadoras de los DNAC de las subunidades Kv2.1 y Kv2.3. Los distintos DNAC se clonaron en un vector de expresión en eucariotas y se transfectaron transitoriamente en células de mamífero. Posteriormente, mediante el uso de la técnica de *patch-clamp*, se procedió a estudiar las características funcionales de los canales iónicos expresados.

### 1. Construcción de los DNAC quiméricos que codifican subunidades $\alpha$ de canales de $K^+$

Los DNAC que codifican subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  se clonaron en el plásmido de expresión en eucariotas p513 (Stratagene). Los plásmidos p513-Kv2.1 y p513-Kv2.3 se describen en Molina (1997). Los plásmidos que contienen DNAC quiméricos se construyeron como se indica en el apartado 1.2 (página 27). De forma general, para la construcción de los DNAC quiméricos se empleaban fragmentos de los DNAC de Kv2.1 y Kv2.3. Estos fragmentos se obtenían por digestión con enzimas de restricción de p513-Kv2.1, p513-Kv2.3 o de fragmentos de DNAC obtenidos por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de Polymerase Chain Reaction). Las dianas para las enzimas de restricción eran naturales o creadas mediante la introducción de mutaciones puntuales. Las

mutaciones puntuales, que eran silentes para al menos una de las subunidades  $\alpha$ , se realizaban de tal manera que en ningún momento se rompía el marco de lectura de la secuencia codificante de los DNAc ni se introducían codones codificantes para aminoácidos nuevos.

### 1.1. Uso de técnicas generales de biología molecular

A continuación se mencionan las principales técnicas de biología molecular utilizadas. Las técnicas de secuenciación, clonación o extracción de DNAc se describen en detalle en manuales de biología molecular (ver Sambrook et al., 1989).

#### 1.1.1. Preparación de fragmentos de los DNAc para la construcción de las subunidades quiméricas

La digestión enzimática de los DNAc se llevó a cabo mediante el empleo de enzimas de restricción (Promega y Amersham). Tras la digestión, los fragmentos de DNAc se purificaban en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se empleaban directamente para la ligación o se conservaban a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior. En casos en los que la estrategia de clonaje lo requiriese se procedía, tras la digestión enzimática, al relleno de los extremos monocatenarios mediante la adición a la reacción de digestión de 1 U de DNA polimerasa I *Klenow* y 1  $\mu\text{l}$  de dNTPs 1 mM a 20  $\mu\text{l}$  de reacción. Esta mezcla se incubaba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 25 min.

Algunos fragmentos de los DNAc que codifican regiones definidas de las proteínas Kv2.1 ó Kv2.3 se obtuvieron mediante la técnica de PCR. Para la reacción de PCR se utilizaron como sustratos p513-Kv2.1, p513-Kv2.3 o alguna de las construcciones quiméricas que incluyen regiones de ambas proteínas. La longitud de las secuencias de los cebadores utilizados fue de 18-20 nucleótidos y sus extremos 5' contenían dianas para enzimas de restricción con objeto de permitir su clonaje en plásmidos. La eficiencia y especificidad de la reacción de PCR se comprobaba mediante

fraccionamiento de una alícuota de la reacción en un gel de agarosa al 1%. Para el clonaje de los fragmentos de DNAC obtenidos por PCR, se procedía a extraer dichos DNAC con fenol-cloroformo (1:1) y a precipitarlos con acetato sódico 0.3 M y 2 volúmenes de etanol. Una vez precipitados, estos DNAC se digerían con las enzimas de restricción apropiadas durante un mínimo de 3 h. Tras la digestión, los fragmentos de PCR se purificaban en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se empleaban directamente para la ligación o se conservaron a -20°C para su uso posterior.

### 1.1.2. Ligación de los fragmentos de DNAC y comprobación de las secuencias clonadas

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 2-3 h usando 1 U/10 µl de T4 DNA ligasa (Promega). Para verificar que las secuencias de los DNAC ligados y clonados en plásmidos eran correctas se efectuaba un mapeo de los DNAC quiméricos mediante la digestión con diferentes enzimas de restricción. Además, los DNAC que codifican las proteínas quiméricas se secuenciaban mediante el empleo de la técnica de secuenciación con dideoxinucleótidos (Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit, Amersham).

### 1.1.3. Expresión de proteínas quiméricas *in vitro*

Para comprobar que a partir de los plásmidos que contenían los DNAC quiméricos se podían sintetizar las proteínas quiméricas deseadas se procedía a la transcripción-traducción *in vitro* de estos DNAC. Para ello, se empleaban 0.5 µg de plásmido y 0.5 µl de L-[<sup>35</sup>S] Methionine (Amersham) en 12.5 µl de TNT-coupled transcription/translation reaction (Promega) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las proteínas marcadas con metionina-[<sup>35</sup>S] se fraccionaban en gel de poliacrilamida-SDS al 9% y se visualizaban por autorradiografía.

#### 1.1.4. Empleo de la técnica de *Northern blot*

La aplicación de esta técnica consistió básicamente en la purificación de los RNAm totales de células CHO previamente transfectadas con los DNA plasmídicos que codifican Kv2.1 o Kv2.3 y la hibridación de dichos RNAm con una sonda marcada que detectaba la presencia del transcrito de Kv2.3. Para ello, se preparaba RNA poli-A de las células transfectadas usando el método de guanidina/LiCl. Se tomaban 10 µg de RNAm y se separaban en un gel de agarosa al 1% que contenía 7.4% de formaldehído, se transferían a membranas Hybond-N (Amershan) y se prehibridaban durante 3 horas a 42°C en presencia de 50% formamida, 5x SSC, 5x solución Denhart, 50 mM de tampón fosfato sódico (pH 6.7), 1% SDS y 0.2 mg/ml de AND desnaturalizado de esperma de salmón. Posteriormente, estas mebranas se hibridaban durante 12 horas a 42°C en la misma solución más  $10^7$  c.p.m/ml de la sonda de Kv2.3 marcada aleatoriamente con  $^{32}\text{P}$ .

#### 1.2. Estrategias para la construcción de las subunidades $\alpha$ quiméricas

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la construcción de los DNAc quiméricos se muestran en el *Apéndice 2*. Los protocolos para la construcción de cada quimera se esquematizan en figuras en las que las secuencias de Kv2.3 aparecen en fondo blanco y las de Kv2.1 con un sombreado oscuro. En cada figura se indican las dianas para los enzimas de restricción empleadas y los aminoácidos de las regiones intercambiadas.

#### Construcción del DNAc que codifica el dímero Kv2.1-Kv2.3

Para la construcción del dímero Kv2.1-Kv2.3 (Fig. 6), se digirió el plásmido pBlue-Kv2.3 con *BamHI-NcoI* (sitios presentes en el *polylinker*), se rellenaron los extremos monocatenarios con la enzima *Klenow* y, posteriormente, se ligaron entre sí, lo que dió lugar a pBs-Kv2.3 B/N.

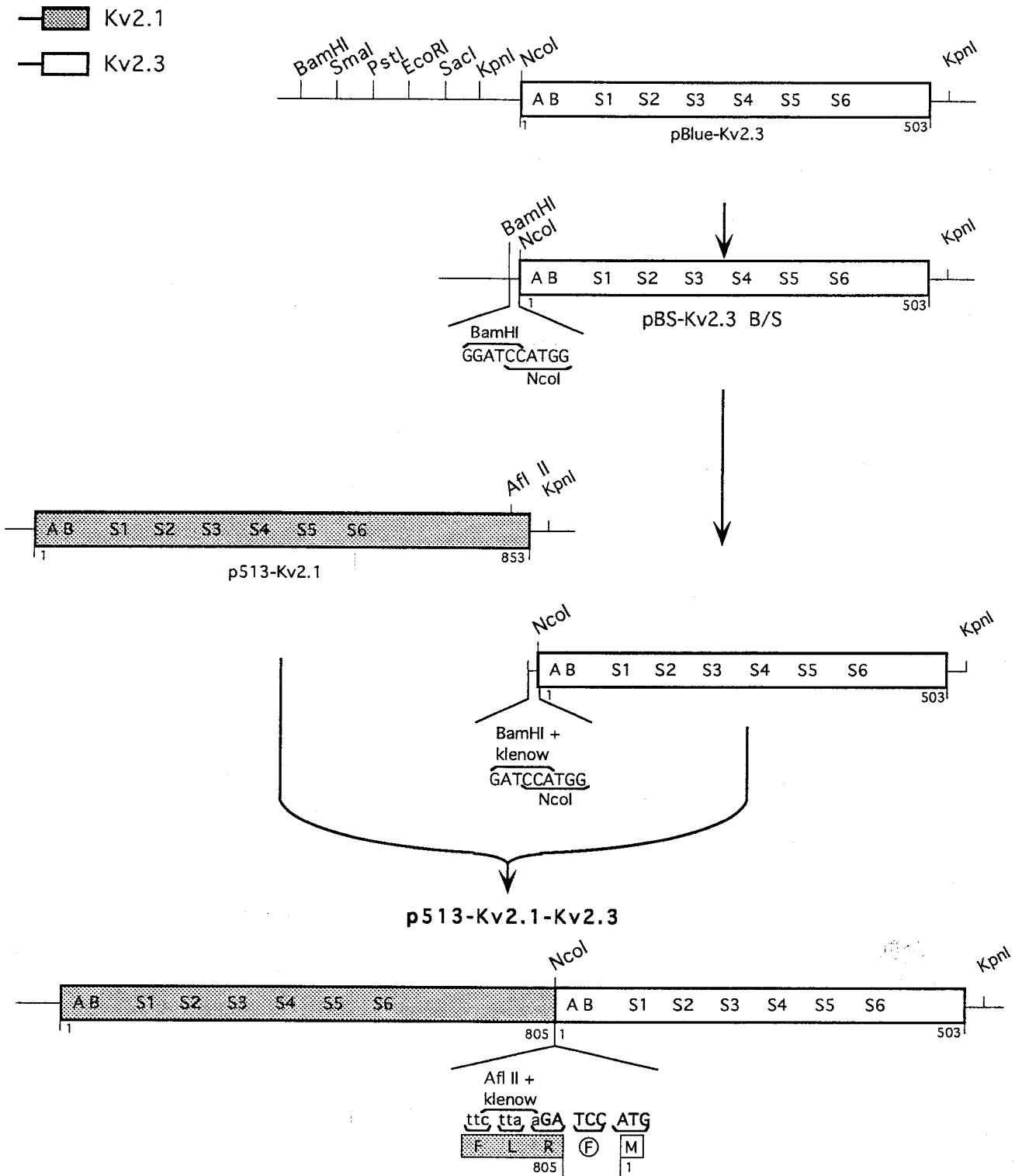


Fig. 6. Esquema de construcción del dímico Kv2.1-Kv2.3. Los nucleótidos de Kv2.3 se indican en mayúsculas y los de Kv2.1, en minúsculas. En p513-Kv2.1-Kv2.3, los aminoácidos de Kv2.1 se engloban en un recuadro sombreado y los de Kv2.3, en un recuadro blanco. El aminoácido *lynker* (F) se engloba en un círculo.

Seguidamente, el plásmido pBs-Kv2.3 B/N se digirió con *Bam*HI, se rellenaron los extremos monocatenarios con la enzima *Klenow* y posteriormente se digirió con *Kpn*I (Fig. 6). El DNAC de Kv2.3 generado tras esta digestión se ligó al extremo 3' de la secuencia codificadora de Kv2.1. Para ello, p513-Kv2.1 se digirió con *Afl*III, se rellenaron los extremos monocatenarios con la enzima *Klenow* y, posteriormente, se digirió con *Kpn*I. Este plásmido se ligó al fragmento obtenido de Kv2.3, dando lugar a la construcción p513-Kv2.1-Kv2.3.

### Construcción del DNAC que codifica la quimera ChA

Para la construcción de p513-ChA se obtuvo por PCR un fragmento de la secuencia codificadora de los 176 aminoácidos C-terminales de Kv2.3, usando los oligonucleótidos 126 y 127. Este producto de PCR se digirió con *Bam*HI y *Kpn*I (PCR 126/127 en Fig. 7) y se ligó al plásmido p513-Kv2.1 en el que previamente se había delecionado el fragmento *Bam*HI-*Kpn*I. Esta ligación generó el plásmido p513-ChA (Fig. 7).

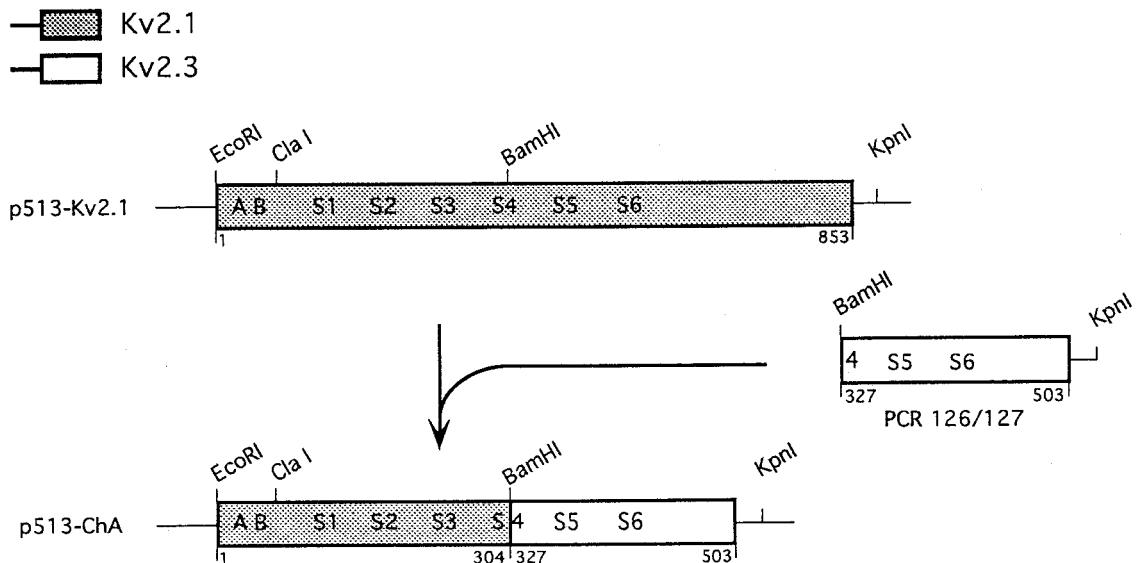


Fig. 7. Esquema de construcción de p513-ChA.

### Construcción del DNAc que codifica la quimera ChB

Para construir p513-ChB se sintetizó por PCR un fragmento de la secuencia de Kv2.3 que codifica sus 315 aminoácidos N-terminales usando los oligonucleótidos T7 y 128. Este fragmento se digirió con *EcoRI* y *BglII* y se ligó al plásmido p513 igualmente digerido con *EcoRI* y *BglII*, obteniéndose el plásmido p513-pl1(ChB) (Fig. 8). Seguidamente, p513-pl1(ChB) se digirió con *BglII* y se ligó al fragmento de digestión con *BglII* obtenido de p513-Kv2.1 que se indica en la Fig. 8. Esta ligación dió lugar a p513-ChB (Fig. 8).

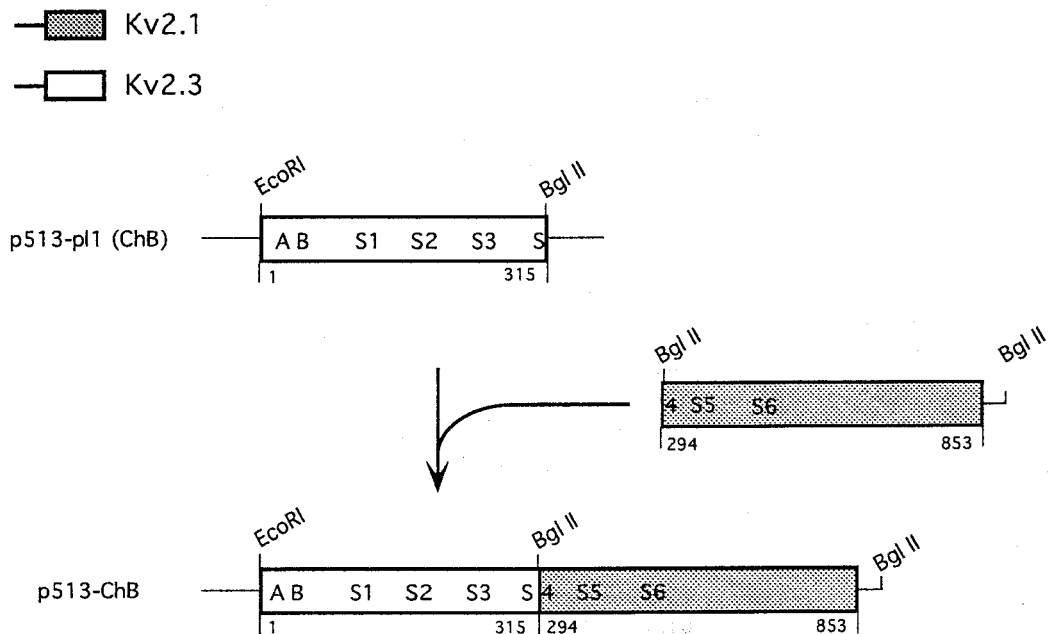


Fig. 8. Esquema de construcción de p513-ChB.

### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch1

Para construir p513-Ch1, se partió de p513-ChA en la que se reemplazó el fragmento *EcoRI-ClaI* por un fragmento equivalente obtenido de p513-Kv2.3 lo que dió lugar a p513-Ch1 (ver Fig. 9).

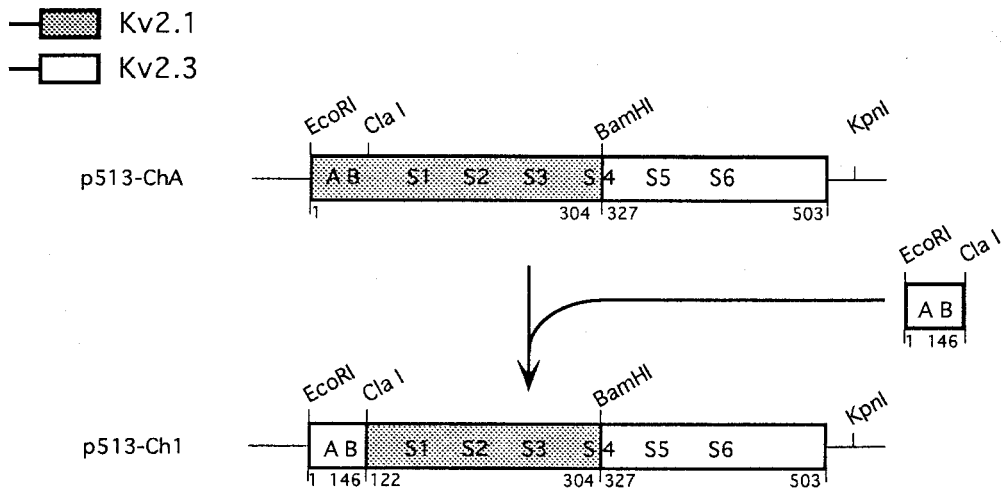


Fig. 9. Esquema de construcción de p513-Ch1.

### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch2

Para la construcción de p513-Ch2 se usó el plásmido p513-ChB como molde (ver Fig. 8) y los oligonucleótidos T7 y 152 para obtener por PCR el fragmento PCR T7/152 indicado en la Fig. 10. Este fragmento se digirió con *EcoRI* y se ligó a p513-p11 (Ch2), igualmente digerido con *EcoRI*, dando lugar a p513-Ch2. El plásmido p513-p11 (Ch2) se obtuvo mediante la ligación en *EcoRI-SmaI* de un producto de PCR sintetizado a partir de p513-Kv2.3 usando los oligonucleótidos 150 y 127.

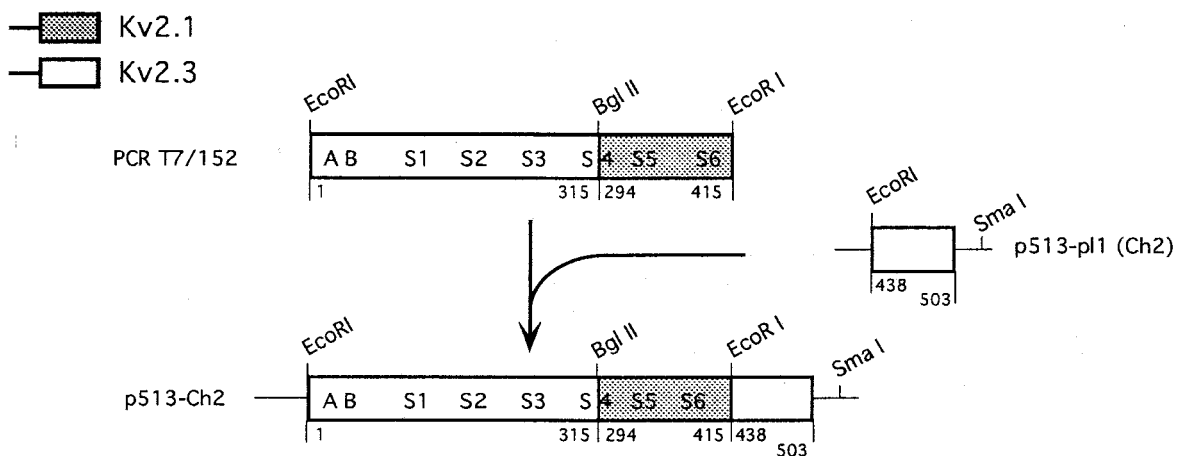


Fig. 10. Esquema de construcción de p513-Ch2.



### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch3

El plásmido p513-Ch3 se sintetizó a partir de p513-ChB (ver Fig. 8) en el que se delecionó el fragmento *EcoRI*-*ClaI* y se sustituyó por el fragmento de digestión *EcoRI*-*ClaI* obtenido de p513-Kv2.1 (Fig. 11).

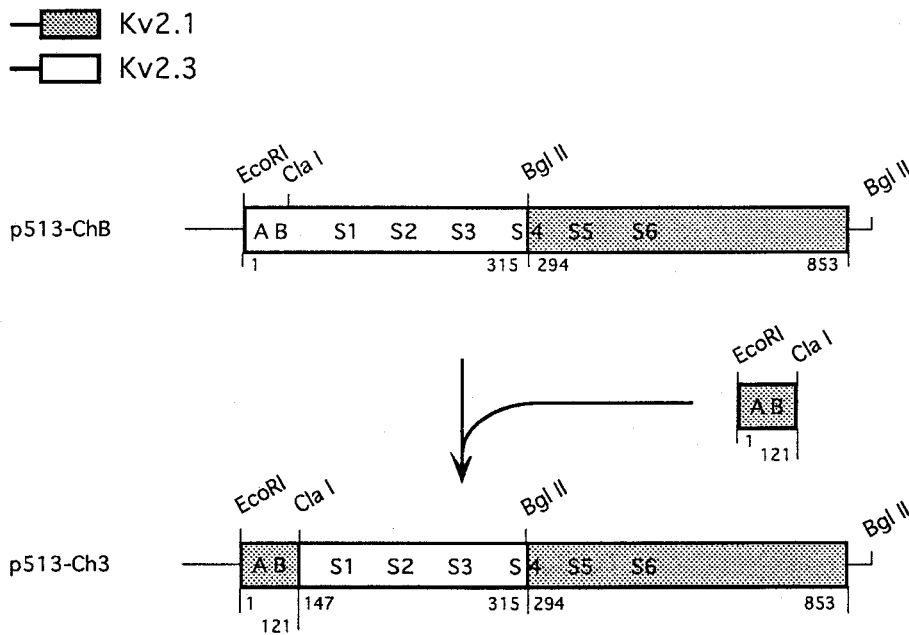


Fig. 11. Esquema de construcción de p513-Ch3.

### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch4

Para construir el plásmido p513-Ch4 se eliminó el sitio de restricción *EcoRI* presente en el *polylinker* de p513-Kv2.1 y se introdujo una mutación silente (666G-666A) que generó una secuencia diana para la enzima de restricción *EcoRI* entre los segmentos S1-S2 de Kv2.1. Para eliminar el sitio de restricción *EcoRI* se digirió p513-Kv2.1 con dicha enzima, se rellenaron los extremos monocatenarios con *Klenow* y se ligaron entre sí dando lugar a p513-pl 1(Ch4) (Fig. 12).

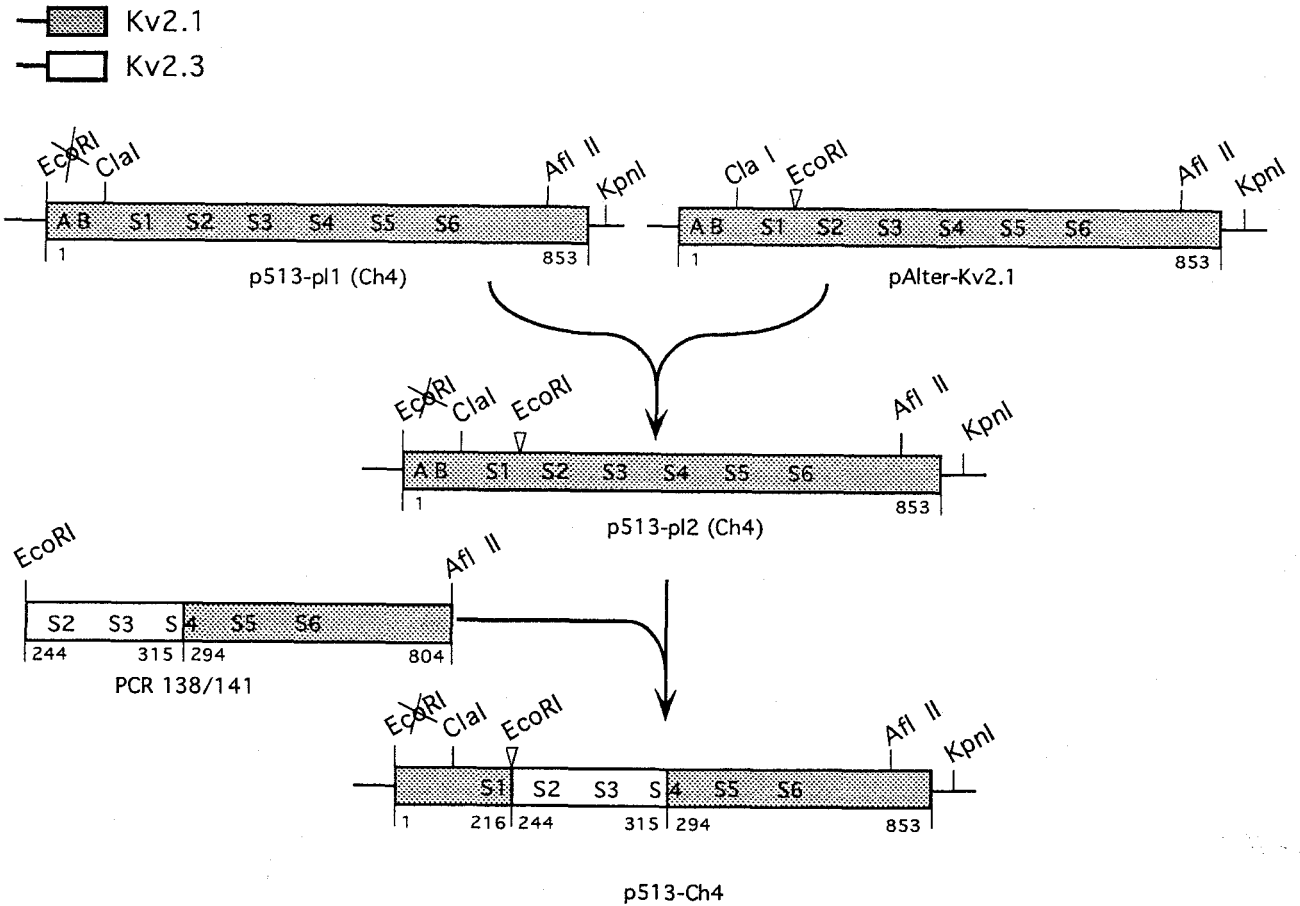


Fig. 12. Esquema de construcción de p513-Ch4. ~~EcoRI~~ indica que la diana para dicha enzima ha sido eliminada. La mutación silente 666G-666A genera una nueva diana para EcoRI indicada por ▽

Para introducir la mutación 666G-666A, se usó el sistema Altered Site II *in vitro* mutagénesis System (Promega) y el oligonucleótido 137, según instrucciones del fabricante. El plásmido mutado se denominó pAlter Kv2.1 (Fig. 12). Este plásmido se digirió con *ClaI-KpnI* y el fragmento obtenido se ligó a p513-pl 1(Ch4), en el que previamente se había delecionado el fragmento *ClaI-KpnI*, dando lugar a p513-pl2 (Ch4). El plásmido p513-pl2 (Ch4) se digirió con *EcoRI-AflII* y el fragmento eliminado se sustituyó por el fragmento PCR 138/141, indicado en la Fig. 12, dando lugar a p513-Ch4. El fragmento PCR 138/141 se obtuvo de p513-ChB (ver Fig. 8) usando los oligonucleótidos 138 y 141.

### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch5

Para construir p513-Ch5, se deletionó el fragmento *ClaI-EcoRI* de p513-pl2 (Ch4) y se sustituyó por el fragmento PCR 139/140 (Fig. 13). Este fragmento de PCR se obtuvo de p513-Kv2.3 usando los oligonucleótidos 139 y 140.

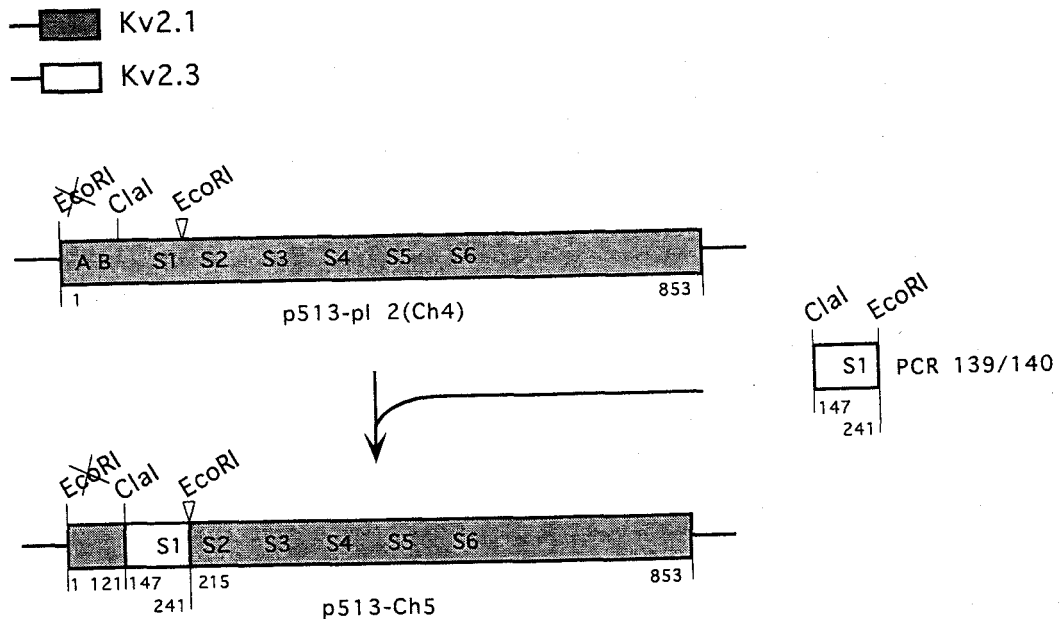


Fig. 13. Esquema de construcción de p513-Ch5.

### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch6

Para la construcción de p513-Ch6 se partió de p513-Ch5, al cual se le eliminó el fragmento *ClaI-EcoRI* y se le ligaron sucesivamente los fragmentos PCR 145/146 y PCR 140/147 (Fig. 14). El fragmento PCR 145/146 se obtuvo de p513-Kv2.1 usando los oligonucleótidos 145 y 146. El fragmento PCR 140/147 se obtuvo de p513-Kv2.3 usando los oligonucleótidos 140 y 147.

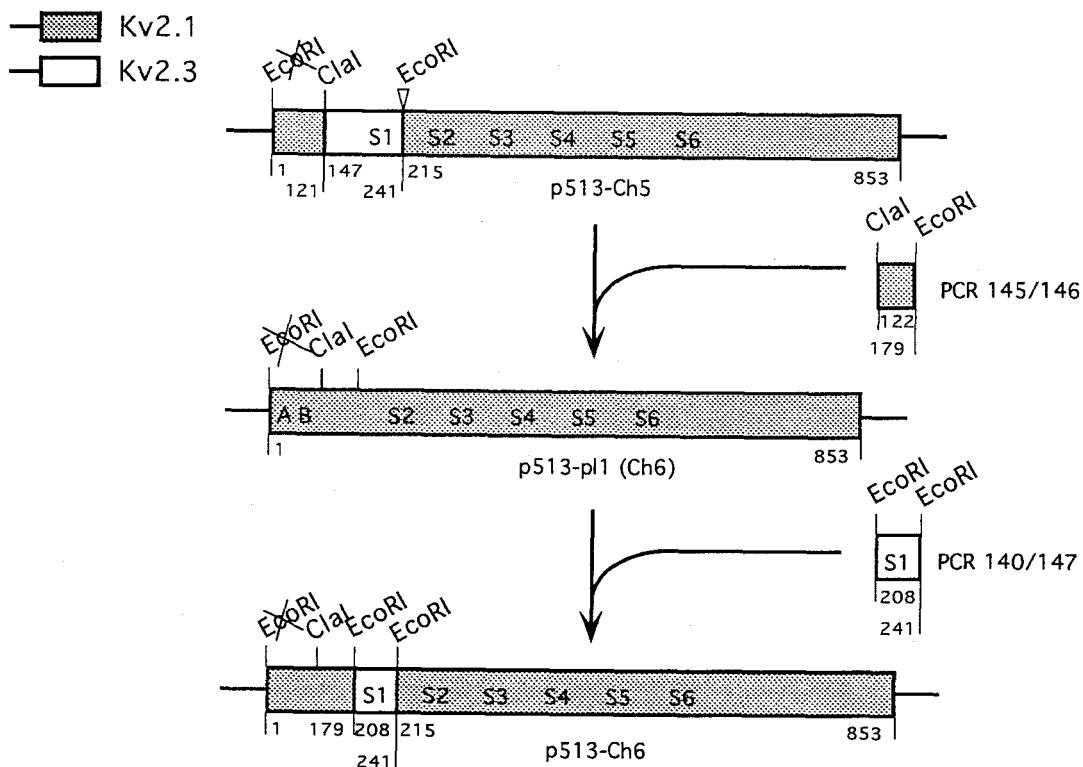


Fig. 14. Esquema de construcción de p513-Ch6.

### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch7

La construcción p513-Ch7 se realizó a partir de p513-pl1 (Ch6), en la cual se eliminó el fragmento *ClaI-EcoRI* y se sustituyó por el fragmento PCR 139/155 (Fig. 15), dando lugar al plásmido p513-pl1 (Ch7). El fragmento PCR 139/155 se obtuvo de p513-Kv2.3 usando los oligonucleótidos 139 y 155. p513-pl1 (Ch7) se digirió con *EcoRI* y se ligó al fragmento PCR 156/157, lo que dio lugar a p513-Ch7. El fragmento PCR 156/157 se obtuvo de p513-Kv2.1 usando los oligonucleótidos 156 y 157.

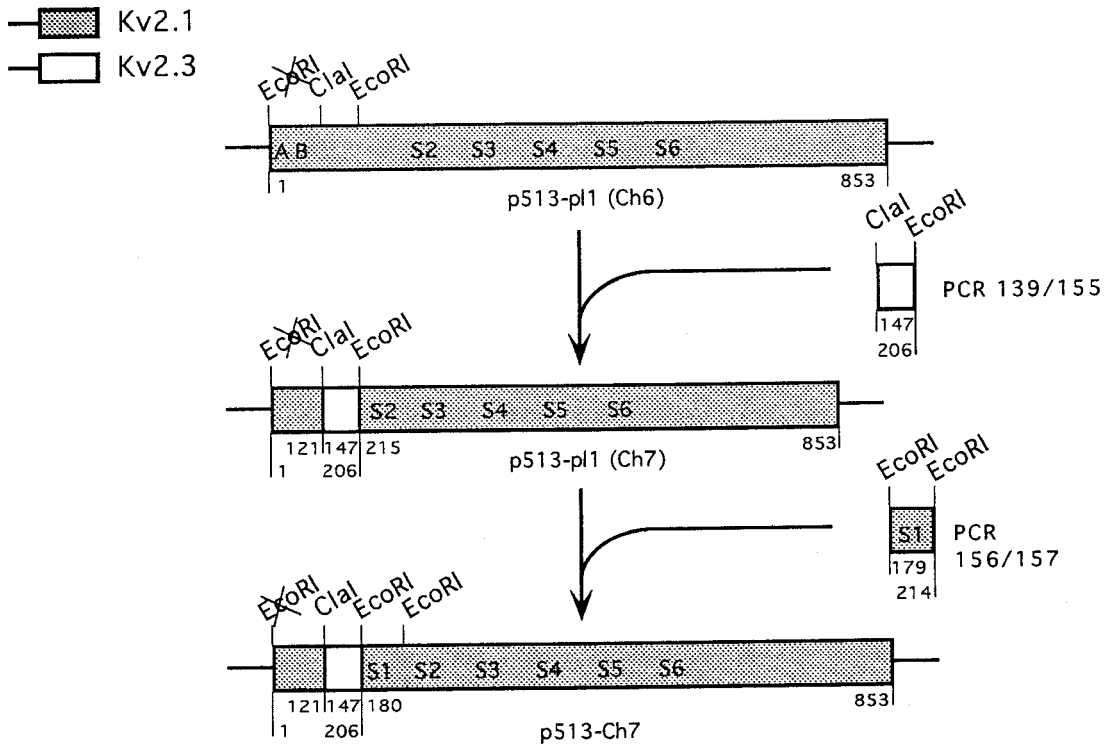


Fig. 15. Esquema de construcción de p513-Ch7.

### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch8

Para generar p513-Ch8, se sintetizó por PCR un fragmento de la secuencia de Kv2.3 (aminoácidos 147-435) usando los oligonucleótidos 139 y 159. El fragmento obtenido se digirió con *ClaI* y *EcoRI* y se clonó en el plásmido pBluescript-SK, previamente digerido con las mismas enzimas, lo cual dió lugar a pBS-pl1 (Ch8) (Fig. 16). Seguidamente, pBS-pl1 (Ch8) se digirió con *EcoRI* y *NotI* y se ligó al fragmento de digestión *EcoRI-NotI* obtenido de p513-pl1 (Ch8) (ver más adelante la estrategia para la construcción de pBS-pl 1 (Ch8)), dando lugar a pBS-pl 2 (Ch8) (Fig. 16).

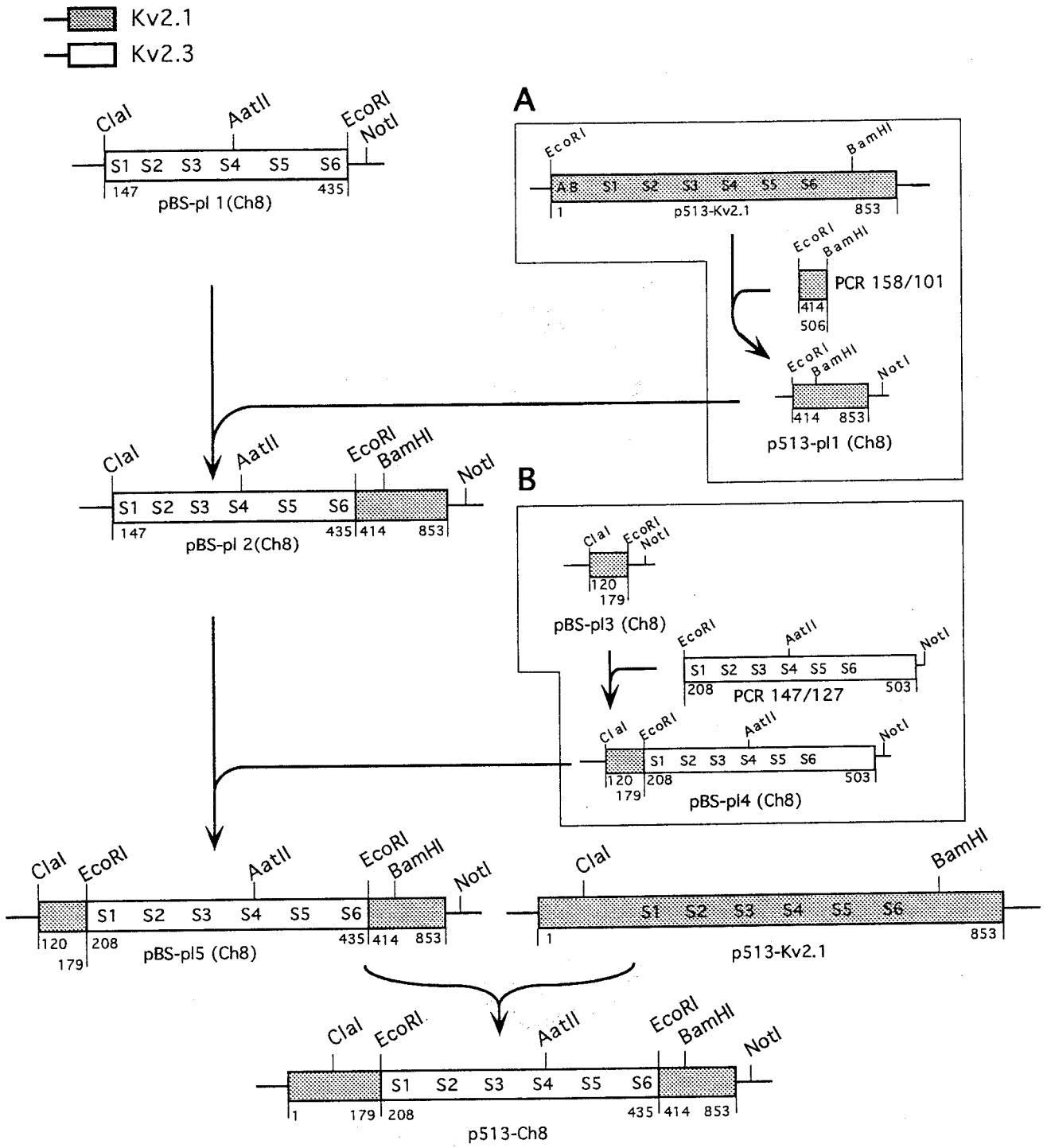


Fig. 16. Esquema de construcción de p513-Ch8.

Posteriormente se deletionó el fragmento *ClaI-AatII* de pBS-pl2 (Ch8) y se sustituyó por el fragmento de digestión *ClaI-AatII* obtenido de pBS-pl4 (Ch8) (ver más adelante la estrategia para la construcción de pBS-pl4 (Ch8)), dando lugar a pBS-pl5 (Ch8). pBS-pl5 (Ch8) se digirió con *ClaI-BamHI* y el fragmento obtenido se clonó en p513-Kv2.1 en el que previamente se había deletionado el fragmento *ClaI-BamHI* lo que dió lugar a p513-Ch8. Los plásmidos p513-pl1 (Ch8) y pBS-pl4 (Ch8), empleados para la construcción de p513-Ch8 se construyeron del siguiente modo:

p513-pl 1(Ch8) (Fig. 16; panel A), se generó a partir de p513-Kv2.1 en el que se sustituyó el fragmento *EcoRI-BamHI* por el producto de PCR 158/101, el cual se sintetizó a partir de p513-Kv2.1 usando los oligonucleótidos 158 y 101. Para generar el plásmido pBS-pl4 (Ch8) (Fig. 16, B), se construyó primero el plásmido pBS-pl3 (Ch8) mediante la ligación del fragmento de digestión *ClaI-EcoRI*, (obtenido de p513-pl1 (Ch6); ver Fig. 14) en el plásmido pBluescript-SK. Seguidamente, se amplificó por PCR un fragmento del DNAc de Kv2.3 mediante el uso de los oligonucleótidos 147 y 127 (PCR 147/127 en el panel B de la Fig. 16). El fragmento amplificado se digirió con *EcoRI* y *NotI* y se clonó en pBS-pl 3(Ch8) digerido con *EcoRI-NotI* lo que dió lugar a pBS-pl 4(Ch8).

### Construcción del DNAc que codifica la quimera Ch9

Para la construcción de p513-Ch9, se construyó en primer lugar el plásmido pBS-Kv2.1/Kv2.3 indicado en la Fig. 17. pBS-Kv2.1/Kv2.3 se construyó mediante la ligación secuencial de los productos de PCR 145/146 (de Kv2.1) y 147/127 (de Kv2.3) en *ClaI-EcoRI* y *EcoRI-SmaI* de pBluescript SK(-), respectivamente. Seguidamente, se obtuvo el fragmento de digestión *ClaI-NotI* (que contiene secuencias de Kv2.1 y Kv2.3) de pBS-Kv2.1/Kv2.3 y se ligó al plásmido p513-Kv2.3 en el que previamente se había deletionado el fragmento de Kv2.3 que dista desde *ClaI* a *NotI*. Como resultado, se obtuvo el plásmido p513-Ch9 indicado en la Fig. 17.

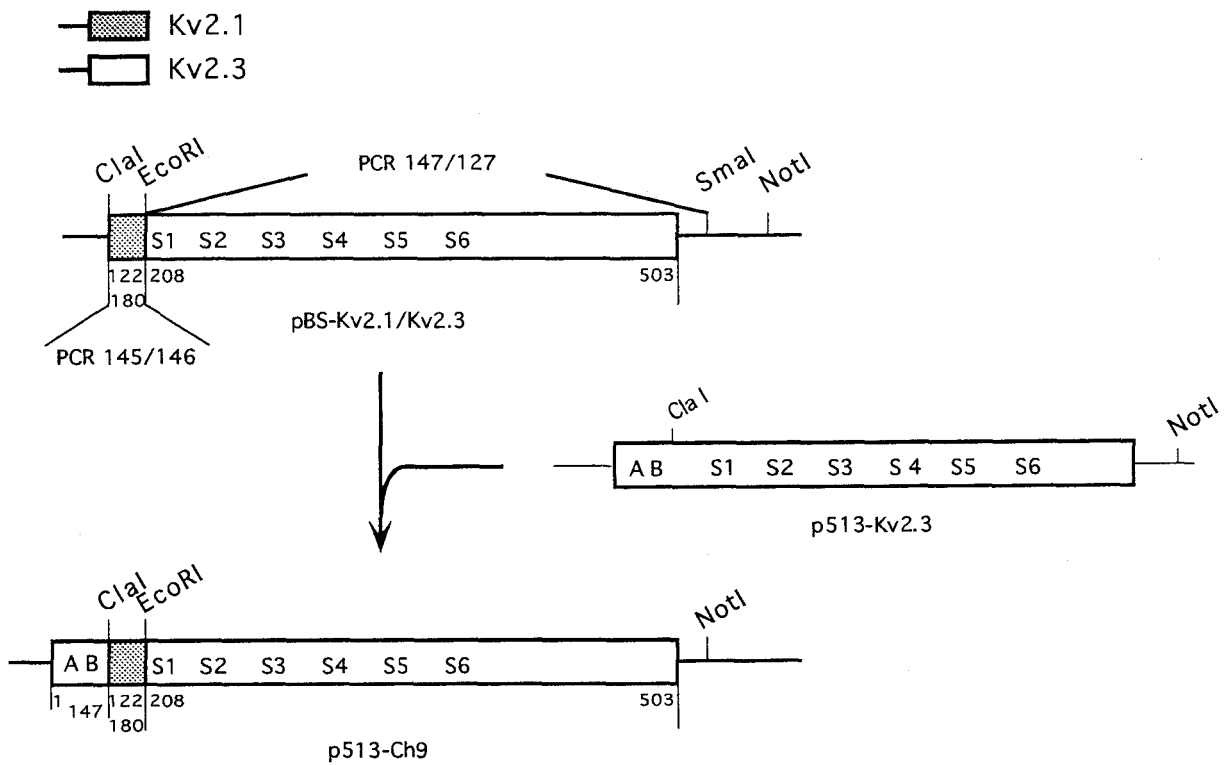


Fig. 17. Esquema de construcción de p513-Ch9.

## 2. Expresión funcional de las subunidades $\alpha$ recombinantes de canales de $K^+$

Para la realización de los estudios funcionales de las distintas subunidades  $\alpha$  recombinantes generadas en el laboratorio, se procedió a la transfección transitoria de los plásmidos construídos en una línea celular de mamíferos para, posteriormente, analizar las propiedades electrofisiológicas de los canales de  $K^+$  expresados. Para las transfecciones, los DNA plasmídicos utilizados en la totalidad de los experimentos realizados se purificaron mediante el uso del kit comercial QIAGEN o mediante el sistema Wizard Plus SV minipreps (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.



## 2.1. Uso de la línea celular CHO

Como sistema de expresión se usó la línea comercial de células de ovario de hámster, CHO (Chinese Hamster Ovary, ATCC). Esta línea celular ha sido muy utilizada como sistema de expresión heteróloga de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (ver Robertson y Owen, 1993; Stephens y Robertson, 1995). Las células CHO resultan adecuadas para los experimentos planteados en este trabajo debido a que presentan las siguientes características:

- No tienen corrientes de  $K^+$  endógenas, lo que permite garantizar que las corrientes iónicas registradas sean las generadas a partir de la expresión de los DNAc de las subunidades transfectadas.
- Su cultivo no requiere de tratamientos complejos, la línea celular crece adecuadamente en diferentes tipos de medios y su elevada tasa de crecimiento permite que las células puedan ser utilizadas con una alta regularidad.
- El pequeño tamaño de las células permite que se pueda modificar rápidamente el potencial eléctrico en su interior, lográndose con ello un apropiado control del potencial de membrana.
- Pese a que las células CHO crecen adoptando una forma alargada, cuando éstas se transfectan adoptan una forma redondeada. Esta característica, sumada a su tamaño, facilita la fijación controlada del potencial intracelular y una adecuada sustracción de los transientes capacitativos (ver técnica de *patch clamp* en el apartado 3.3).
- Su tasa de división celular disminuye notoriamente después de la electroporación, lo que evita que el cultivo confluya e impida el registro de células individuales aisladas.

## **2.2. Condiciones de cultivo celular**

### **2.2.1. Medio de cultivo**

Las células CHO se cultivaron en medio McCoy's 5A (BioWhittaker), enriquecido con los siguientes suplementos:

- 10% suero fetal bovino (Sigma).
- 1% penicilina-estreptomicina; 10.000 unidades de penicilina-G más 5 mg/ml de estreptomina (Gibco).
- 1% L-glutamina 200 mM (Sigma-Aldrich).

### **2.2.2. Cultivo celular**

Las células se cultivaron en placas de petri de 100x20 mm (Falcon) a 37°C en un incubador (Forma-Scientific) con 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Las células, que presentan una forma alargada, crecen formando una monocapa sobre la superficie del recipiente de cultivo y presentan una tasa de ciclo celular que se completa en aproximadamente 12 horas. Para un adecuado crecimiento de las células, se evitó que el cultivo alcanzara el 100% de confluencia. Por ello, las células se subcultivaron cada 2-3 días, momento en el cual el cultivo había crecido hasta alcanzar un 70-80% de confluencia.

### **2.2.3. Subcultivo celular**

Para subcultivar las células se retira el medio de cultivo y éstas se lavan con 2-3 ml de tampón fosfato PBS. Se retira el PBS y se añaden 2-3 ml de tripsina-versene (BioWhittaker) precalentada a 37°C. ~2-3 minutos después se golpea suavemente la placa de cultivo para despegar las células, que se dispersan mecánicamente mediante pipeteos. Después se añaden 7 ml de medio de cultivo y se centrifuga a 300g durante 4 minutos a 4°C. El precipitado celular se resuspende en 1 ml de medio de cultivo, se toman 100 µl de la suspensión celular y se transfieren a una nueva placa de cultivo que contiene 15 ml de medio de cultivo previamente calentado a 37°C.

### **2.3. Transfección de los DNA plasmídicos**

Las células CHO se transfectaron transitoriamente mediante la técnica de electroporación. De forma muy general, la técnica consiste en aplicar una descarga eléctrica a las células lo que origina una serie de rupturas transitorias en su membrana plasmática. A través de estos orificios penetran los plásmidos que contienen el DNAC que codifica la proteína que se desea expresar y cuya síntesis se realiza utilizando la maquinaria celular. Una vez sintetizados los canales, éstos se insertan en la membrana plasmática. La técnica de electroporación permite que el DNA entre en las células sin lesionarlas ni causar daños importantes que puedan impedir la expresión de los canales o el posterior registro electrofisiológico. Además de su cómoda ejecución, esta técnica ofrece un alto rendimiento en la eficiencia de expresión de los canales de estudio.

Para la electroporación se utilizó un generador de pulsos (Bio Rad), el cual utiliza la descarga de un condensador para producir, de forma controlada, un pulso de potencial eléctrico. La descarga de dicho condensador sigue un curso temporal exponencial, con una constante de tiempo que depende de la capacidad del condensador y de la resistencia del medio de electroporación. Para cada transfección se emplearon cultivos celulares que se encontraran en una fase de exponencial de crecimiento (~70-80% de confluencia). El protocolo de electroporación utilizado se describe a continuación:

- 1). Se dispersan las células utilizando tripsina-versene. Para ello, se retira completamente el medio de cultivo y se lavan las células con 2-3 ml de tampón fosfato PBS. Seguidamente, se añaden 2-3 ml del medio que contiene la tripsina-versene (200 mg/L de versene-EDTA y 500 mg/L de tripsina 1:250) precalentada a 37°C. Aproximadamente 3 minutos después se golpea suavemente la placa de cultivo para despegar las células, tras lo cual se procede a dispersar mecánicamente las células mediante pipeteos suaves.

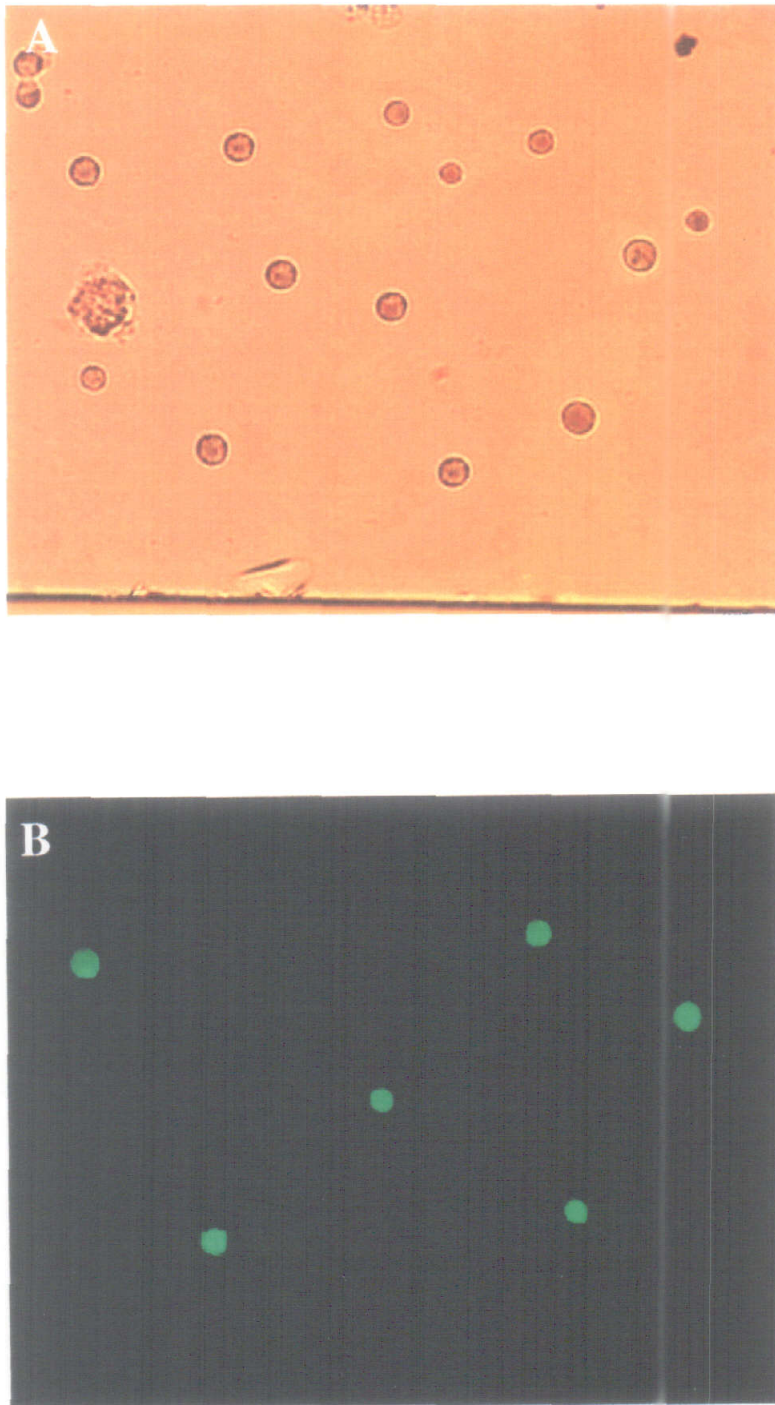
- 2). Las células, resuspendidas en medio con tripsina-versene, se transfieren a un tubo que contiene 7 ml de medio de cultivo y se centrifugan a 300g durante 4-5 minutos a 4°C.
- 3). Se retira el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende en 9 ml de medio de cultivo sin suero fetal bovino.
- 4). Se centrifuga a 300g durante 4-5 minutos a 4° C.
- 5). Se retira el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende en 400 µl de tampón sacarosa para electroporación (1 M sacarosa, 1 M  $K_2HPO_4$ , 1 M  $KH_2PO_4$ , 1 M  $MgCl_2$ ).
- 6). La suspensión celular se transfiere a un tubo eppendorf, previamente equilibrado a 4°C, que contiene el DNA plasmídico a transfectar. Se mezcla suavemente mediante pipeteo y se mantiene a 4°C durante 4-5 minutos. En cada transfección se usan 2-4 µg de DNA.
- 7). Se transfiere la suspensión celular a una cubeta para electroporación (Gene pulser cuvette, Bio Rad) previamente equilibrada a 4°C, después de lo cual se puede proceder a la electroporación.
- 8). Para la electroporación, mediante el generador de pulsos, se aplica una descarga de 125 µF a las placas metálicas de la cubeta de electroporar, la cual contiene las células junto con el DNA a transfectar. Con la descarga de capacidad se aplica una diferencia de potencial eléctrico de 350 mV entre las placas metálicas de la cubeta.

Tras la electroporación, la suspensión celular se siembra en cubres de aproximadamente 7x5 mm contenidos en una placa de petri con medio de cultivo y previamente equilibrada a 37°C. La siembra en cubres pequeños se realiza para permitir el acceso de las células a la cámara de registro (ver Fig. 21,A) del módulo de *patch clamp*. Las células electroporadas se incuban bajo las condiciones de cultivo previamente descritas. El medio de cultivo de las células transfectadas se renueva 4-5 horas después de la transfección,

tiempo en el que las células sanas se habrán adherido a la superficie de la placa de cultivo. El cambio de medio permite retirar células muertas y detritos celulares. Las células transfectadas se utilizan para los registros electrofisiológicos 24-48 horas después de la electroporación, tiempo en el cual se ha alcanzado un óptimo nivel de expresión de proteína.

#### 2.4. Empleo de la proteína de fluorescencia verde (GFP)

Con el fin de detectar las células CHO eficientemente transfectadas, en cada transfección se incluyó (además del plásmido de expresión de las subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$ ) 2  $\mu$ g del plásmido p513 que contiene el DNAC que codifica la proteína de fluorescencia verde GFP (Green Fluorescent Protein; Chalfie et al., 1994). La GFP es una proteína de la medusa *Aequorea victoria* que absorbe la luz ultravioleta (UV) con una longitud de onda de 395 nm y emite luz verde con un pico máximo de emisión a 509 nm. Las células que expresan la GFP emiten una intensa fluorescencia verde tras ser excitadas con luz UV lo que permite identificar, mediante un microscopio de epifluorescencia (Axioskop-Zeiss), las células eficientemente transfectadas. La GFP no parece generar ningún tipo de efecto nocivo en las células y su presencia no modifica las características biofísicas de los canales de  $K^+$  expresados exógenamente (ver *Resultados*). Para comprobar la eficacia de este procedimiento, se procedió a transfectar el DNAC de la GFP en células CHO y, posteriormente, se evaluó la expresión de dicha proteína mediante la visualización de las células que emitían fluorescencia tras la iluminación con luz UV. Un 40-70% de las células emitieron fluorescencia verde con un grado de intensidad que variaba de célula a célula (ver Fig. 18). Así, la GFP permitía estimar la eficiencia de las transfecciones realizadas. Tras comprobar que en nuestras condiciones experimentales la GFP se expresaba adecuadamente, esta proteína se usó en los experimentos posteriores para detectar aquellas células que habían sido transfectadas eficientemente.



**Fig. 18.** Fotografías de las células CHO transfectadas con el DNAc de la GFP. Las fotografías fueron tomadas en campo claro (A) y campo oscuro (B). Nótese en B como sólo algunas células (que han sido eficientemente transfectadas) emiten fluorescencia verde.

### 3. Registros electrofisiológicos

#### 3.1. Soluciones de registro

La composición de las soluciones utilizadas para los registros electrofisiológicos se muestra en la tabla 1. Se denomina solución externa (o extracelular) a aquella solución que está en contacto con la superficie exterior de la membrana celular. En algunos experimentos, esta solución contiene además, 1 mM  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  (1 mM  $\text{Zn}^{2+}$ ), 10 mM TEA (Sigma), o diferentes concentraciones de KCl (30, 70, y 140 mM). Las soluciones con concentraciones variables de KCl se preparan substrayendo la concentración de KCl añadida al correspondiente valor equimolar de NaCl. El pH de la solución se ajusta a 7.4 con NaOH y la osmolalidad es de 290-300 mmol/kg. La solución interna (o intracelular) es aquella con que se dializa el interior de la célula para sustituir al contenido citoplasmático. Dicha solución está contenida en el interior de la micropipeta de registro. Antes de realizar los experimentos se añade a esta solución 4 mM ATP (Sigma) y se filtra (poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ). Tras añadir el ATP, la solución se mantiene a 4°C. El pH se ajusta a 7.2 con KOH. La osmolaridad es de 280-290 mOsm/l. Los potenciales de unión líquida no se corrigen debido a que la totalidad de los registros se realizan manteniendo siempre las mismas condiciones experimentales.

Solución externa	(mM)	Solución interna	(mM)
NaCl	140	KCl	30
KCl	2.7	K-glutamato	80
$\text{CaCl}_2$	2.5	KF y $\text{MgCl}_2$	20 y 4
$\text{MgCl}_2$	4	HEPES	10
HEPES	10	EGTA	10

Tabla 1. Composición de las soluciones utilizadas para los registros electrofisiológicos.

### 3.2. Preparación de las micropipetas de registro

Los registros se efectuaron usando micropipetas de vidrio blando fabricadas a partir de capilares para hematocrito (Hirschmann). La fabricación de las micropipetas se realizó en dos etapas, una de estirado del vidrio y otra de pulido de la punta (Hamill et al., 1981). Los capilares se estiraron con un estirador vertical (700D, David Kopf). El estirado del vidrio se consiguió por calentamiento en dos fases mediante una resistencia eléctrica en forma de solenoide. La primera fase de estiramiento consiste en la aplicación de una corriente de 20 A a través de la resistencia eléctrica que genera el calor aplicado al capilar. Para conseguir el estiramiento, el capilar se ubica de forma que quede centrado y paralelo a la resistencia, y se sujeta en sus dos extremos a una columna de elongación. En el extremo inferior del capilar se sujeta un peso que aplica una fuerza de tracción hacia abajo. Tras el calentamiento de la resistencia, el vidrio (de bajo punto de fusión) se funde por calor y la tracción ejercida por el peso elonga el capilar unos 5-10 mm hasta un tope seleccionado. El tope permite una corta elongación y evita que el capilar se estire hasta romperse.

En el segundo paso de estiramiento, el capilar se coloca de tal forma que la zona elongada quede centrada y paralela a la resistencia. Se sujeta el peso al extremo inferior del capilar y se retira el tope de estiramiento; seguidamente se aplica una corriente de 13-15 A a la resistencia. El calor funde el vidrio y el capilar se estira hasta romperse, con lo que se obtienen dos micropipetas.

En la segunda etapa de fabricación, la punta de las micropipetas obtenidas es pulida por calor aplicado mediante una microforja diseñada en el laboratorio. La microforja posee una resistencia formada por un filamento de platino 10%-iridio, en forma de " $\Omega$ ", que es alimentado por una fuente de voltaje variable. Se aplicaron 30 V, lo que generó una corriente de 30-35 A. La micropipeta se sujeta a un soporte que permite su acercamiento manual a la resistencia de la microforja. Este movimiento se



efectúa por medio de un sistema de micromanipulación y se controla visualmente a través de un microscopio. La distancia entre la micropipeta y la resistencia de la microforja es de aproximadamente 20-40  $\mu\text{m}$ , y el tiempo de exposición al calor es de aproximadamente 6-8 s.

El pulido de las micropipetas reduce un poco su diámetro y suaviza la superficie de la punta para que al contactar con la membrana celular no produzca lesión. Además, el pulido favorece la formación de un sello de alta resistencia eléctrica (del orden de  $\text{G}\Omega$ ) entre la membrana celular y la punta de la micropipeta. El diámetro final de las micropipetas usadas en este trabajo es de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  y su resistencia eléctrica de 1-3  $\text{M}\Omega$ .

### **3.3. Registros electrofisiológicos de las células CHO transfectadas: técnica de *patch-clamp***

Para el registro de las corrientes iónicas transmembranarias obtenidas durante el presente estudio se utilizó la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa. Esta técnica permite efectuar registros cuantitativos de las conductancias iónicas transmembranarias tanto en células individuales dispersas como en células presentes en tejidos celulares. Mediante la técnica de *patch clamp* se pueden resolver las corrientes iónicas que fluyen a través de un único canal iónico o de corrientes macroscópicas que fluyen por el grupo de canales presentes en la membrana celular (Hamill et al., 1981; Sakmann y Neher, 1983).

La configuración de célula completa de la técnica de *patch-clamp* consiste básicamente en aislar una pequeña región de la célula con una micropipeta de vidrio mediante la formación de una unión estrecha o sello. Tras establecer el sello, se aplica presión negativa al interior de la micropipeta hasta romper el área de membrana aislada, lo que permite el acceso eléctrico al interior de la célula y el control de las concentraciones

iónicas intracelulares. Posteriormente, se procede a modificar de forma controlada el potencial de membrana con objeto de inducir la apertura de los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. Las corrientes iónicas generadas son registradas y analizadas mediante un equipo electrónico e informático cuyos componentes básicos se describen a continuación.

### 3.3.1. Dispositivo electrónico

Las corrientes iónicas transmembranarias dependen de las propiedades resistivas y capacitativas de las membranas celulares. La membrana, dada su habilidad para separar cargas eléctricas, se comporta eléctricamente como un condensador. Por su parte, los canales iónicos presentes en la membrana se comportan como elementos resistivos, permitiendo el flujo de cargas entre el interior y el exterior celular. Esta característica de las membranas le confiere la propiedad de comportarse eléctricamente como un circuito RC conectado en paralelo. El diseño básico del dispositivo electrónico que permite medir el flujo de corriente iónica transmembrana ha sido descrito anteriormente por Ureña et al (1989) y Castellano y López-Barneo (1991).

En la Fig. 19 se representa el circuito eléctrico RC equivalente de una célula registrada en la configuración de célula completa.  $C_m$  representa la capacidad de la membrana,  $R_m$  es la resistencia de la membrana, que depende de la apertura y cierre de los canales iónicos presentes en la membrana plasmática.  $R_A$  es la resistencia de acceso, que depende del tamaño de la punta de la micropipeta y que varía ante cualquier obstrucción de la misma. El registro de las corrientes transmembrana ( $I_m$ ) es posible gracias al uso de un amplificador operacional, configurado como convertidor corriente-voltaje (triángulo en Fig. 19). Como se puede observar en la figura, el interior celular está conectado eléctricamente a la entrada negativa del amplificador. La apertura de los canales dependientes de voltaje se induce artificialmente mediante la aplicación de pulsos

cuadrados de voltaje ( $V_{ref}$ ) en la entrada positiva del amplificador. La corriente transmembrana generada ( $I_m$ ), fluye hacia el interior de la micropipeta y, gracias a un electrodo de Ag-AgCl, se conduce hasta la entrada negativa del amplificador operacional. En respuesta a  $I_m$ , el amplificador genera un voltaje de salida ( $V_s$ ) que es aplicado a la resistencia de retroalimentación ( $R_R$ ) cuyo valor es de 500 M $\Omega$ .  $V_s$  genera un cambio de potencial en  $R_R$  que compensa los valores de voltaje producidos por  $I_m$  en la entrada negativa, impidiendo sistemáticamente que se produzca un cambio de tensión entre las entradas positiva y negativa del amplificador. El voltaje de salida del amplificador operacional se puede calcular a partir de la ecuación:

$$V_s = (-I_m \times R_R) + V_{ref}$$

Como se deduce de la ecuación, el voltaje de salida ( $V_s$ ) necesario para compensar el cambio de potencial en la entrada negativa, con respecto a la entrada positiva del amplificador operacional, está relacionado con la corriente transmembranaria ( $I_m$ ), como se describe en la ecuación:

$$-I_m = \frac{V_s - V_{ref}}{R_R}$$

Dado que se conoce el valor de  $R_R$  y el voltaje aplicado ( $V_{ref}$ ), es posible determinar la cantidad de corriente que ha fluido hasta el terminal negativo, es decir, el flujo de corrientes iónicas transmembrana. La diferencia de potencial transmembrana se mide entre el electrodo de referencia conectado a tierra ( $E_{ref}$  en Fig. 19) y el electrodo de Ag-AgCl ubicado en el interior de la micropipeta (ver Fig. 19).

El módulo de registro está ubicado en el interior de una jaula metálica (jaula de Faraday) eléctricamente conectada a tierra para evitar que las señales electromagnéticas externas alteren las corriente registradas. En todos los experimentos se registraron únicamente aquellas células que presentaron corrientes macroscópicas menores de 4 nA.

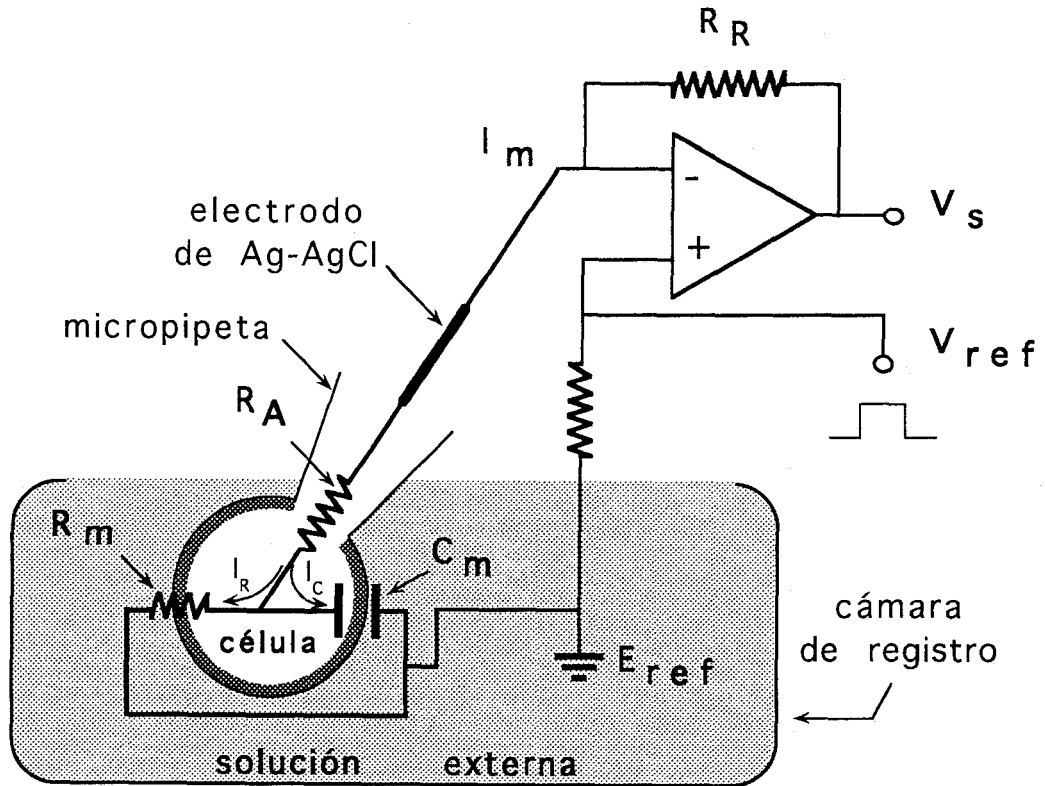


Fig. 19. Esquema del sistema de registro. El amplificador operacional, configurado como convertidor corriente-voltaje, se representa como un triángulo y las resistencias como líneas quebradas. Abreviaturas:  $I_m$  corriente transmembrana;  $V_{ref}$  voltaje de referencia;  $E_{ref}$  electrodo de referencia;  $R_A$  resistencia de acceso;  $R_R$  resistencia de retroalimentación;  $V_s$  voltaje de salida;  $I_R$  componente resistivo de la corriente;  $I_C$  componente capacitivo de la corriente.

### 3.3.2. Equipo informático y de registro

El sistema de registro y amplificación de las señales eléctricas usado está compuesto por un amplificador operacional (Patch clamp EPC-7, List-Electronics), una tarjeta de conversión digital-analógico/analógico-digital (Instrutech-corp) y un Ordenador Macintosh Quadra 650 (ver Fig. 20).

El programa de ordenador utilizado para el control, procesamiento, adquisición, monitorización y análisis de las señales eléctricas es el Pulse (HEKA). Este *software* permite el control de un generador de pulsos completamente programable y contiene además un sistema de oscilografía que permite la representación simultánea, en la pantalla del ordenador, de las señales eléctricas. Además, este programa permite modificar las

velocidades de muestreo ya que algunos parámetros cinéticos deben resolverse a altas frecuencias de adquisición, como es el caso de las cinéticas de activación y cierre de los canales estudiados en el presente trabajo.

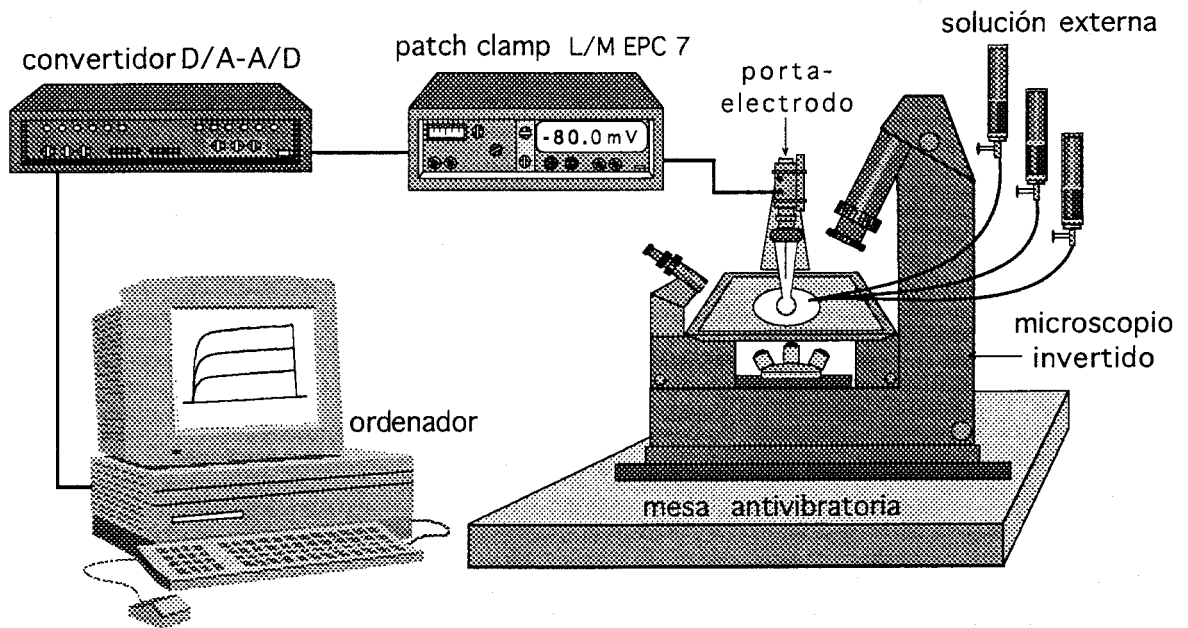


Fig. 20. Esquema general del dispositivo electrónico y equipo utilizado para la realización de los registros electrofisiológicos.

### 3.4. Proceder experimental

Los cubreobjetos en los que se han sembrado las células transfectadas se depositan en la cámara de registro (Fig. 21, A), la cual se mantiene bañada por solución externa en flujo constante. Las soluciones externas utilizadas están contenidas en varios recipientes individuales conectados a la cámara de registro (ver Fig. 20). Por gravedad, las soluciones fluyen permanentemente hacia la cámara de registro y son retiradas mediante un sistema de succión por vacío. Los cambios de solución externa se controlan mediante un sistema de llaves de paso.

Antes de cada experimento, las micropipetas se llenan con solución interna mediante una jeringa de 1 ml estirada por calor para conseguir una punta larga y fina. Una vez llena la micropipeta, se instala en el portaelectrodos (Fig. 21; panel A). El portaelectrodos contiene un pequeño conducto para aire, al que se conecta una pequeña manguera con la cual es posible aplicar presión al interior de la micropipeta (Hamill et al., 1981). El procedimiento que se sigue para adoptar la configuración de **célula completa** está precedido una serie de pasos que hemos denominado **acercamiento**, **contacto** y **sello**, las cuales se describen a continuación.

La fase de **acercamiento** (1 en el panel B de la Fig. 21) consiste básicamente en la introducción de la micropipeta en la solución externa, la cual baña la cámara de registro (ver panel A de la Fig. 21). Durante la fase de aproximación a la membrana celular, se aplica continuamente una pequeña presión positiva al interior de la micropipeta con objeto de evitar que alguna partícula presente en la solución externa pueda adherirse y obstruirla.

La aproximación de la micropipeta se realiza mediante un mecanismo de micromanipulación (NRC, Newport corporation) que permite controlar la velocidad de movimiento. Todo el procedimiento puede controlarse mediante seguimiento visual a través de un microscopio invertido (Diaphot-TMD, Nikon). El microscopio y el micromanipulador están sobre una mesa antivibratoria (micro-g, TMC) que evita que las vibraciones mecánicas de baja frecuencia puedan desestabilizar el sello (ver Fig. 20). La mesa se encuentra sobre contenedores de arena que absorben las vibraciones de alta frecuencia que puedan alterar la estabilidad del sello.

Durante la fase de **acercamiento**, la micropipeta entra en contacto eléctrico con la solución externa. Es decir, se cierra el circuito entre el electrodo de Ag-AgCl (que conecta eléctricamente la solución interna con el amplificador) y el electrodo de referencia ( $E_{ref}$ ). En  $V_{ref}$ , se aplica continuamente un pulso cuadrado de voltaje de 10 mV de amplitud y 20

ms de duración, con una frecuencia de 5 Hz. Este pulso genera una corriente ( $i$ ) entre el electrodo de Ag-AgCl y el electrodo de referencia ( $E_{ref}$ ) (ver en esquemas 1, 3, 5 y 7; panel B de la Fig. 21). Debido a que el electrodo de Ag-AgCl se encuentra en el interior de la micropipeta de vidrio, la apertura de la micropipeta constituye una resistencia eléctrica al paso de la corriente  $i$ . Esta resistencia se denomina resistencia del electrodo ( $R_e$  en esquemas 1, 3, 5 y 7; panel B de la Fig. 21). Dado que los valores de  $V_{ref}$  y de  $R_R$  son conocidos, a partir del registro de  $V_S$  es posible obtener el valor de  $i$  y determinar el valor de  $R_e$ . Los valores de  $i$  y de la resistencia de la micropipeta ( $R_e$ ) pueden estimarse a partir de las ecuaciones:

$$i = \frac{V_S - V_{ref}}{R_R} \qquad i = \frac{V_{ref}}{R_e}$$

$$\frac{V_S - V_{ref}}{R_R} = \frac{V_{ref}}{R_e} \qquad R_e = \frac{V_{ref} \times R_R}{V_S - V_{ref}}$$

El registro continuo de  $V_S$  permite monitorizar las fases de **acercamiento**, **contacto**, **sello** y **adopción** de la configuración de **célula completa**. La señal de  $V_S$  registrada se observa al osciloscopio tal como se representa cualitativamente en los esquemas 2, 4, 6 y 8 de la Fig. 21, B.

Durante la fase de **contacto** (Fig. 21; panel B), la aproximación de la micropipeta a la membrana se realiza muy lentamente hasta llegar a tocar la superficie de ésta sin romperla. Debido a la unión entre la micropipeta y la membrana, se produce una resistencia adicional al paso de corriente  $i$ . Esta resistencia, en serie con  $R_e$ , se denomina resistencia de sello ( $R_S$ ; esquemas 3, 5 y 7; panel B de la Fig. 21). En respuesta a  $R_S$ , el amplificador produce un cambio en  $V_S$  que se ve reflejado en el osciloscopio como una disminución en la amplitud del pulso registrado, representado cualitativamente en la Fig. 21 (esquema 4; panel B).  $R_S$  puede estimarse a partir de la ecuación:

$$R_s = \left( \frac{V_{ref} \times R_R}{V_s - V_{ref}} \right) - R_e$$

Tras alcanzar la fase de **contacto** se aplica un poco de presión negativa al interior de la micropipeta, que hace que el área de membrana circunscrito por la pipeta se desplace hacia el interior de ésta adoptando una forma de  $\Omega$  (ver **sello** en Fig. 21; panel B). Esta presión produce una unión estrecha (**sello**) entre la pipeta y la membrana, generando un aumento considerable de  $R_s$  (de 1-2 órdenes de magnitud) que hace que el voltaje de salida ( $V_s$ ) sea muy pequeño. La disminución en  $V_s$  se evidencia en el osciloscopio por la aparición de un registro plano, excepto por la aparición de dos pequeños picos al comienzo y final del pulso, generados por corrientes transitorias capacitativas (ver Fig. 21; panel B, esquema 6). Estos transientes se deben a que la pipeta se comporta como un pequeño condensador de carga y descarga rápida. El amplificador EPC-7 dispone de un sistema que permite la cancelación de la corriente capacitativa debida a la micropipeta. Cuando este sistema de compensación no es suficiente para cancelar el componente capacitativo de la pipeta, se procede a disminuir el nivel de solución externa en la cámara de registro para reducir la superficie de la pipeta cubierta por la solución y favorecer la eliminación del componente capacitativo.

Una vez alcanzada la fase de **sello** se procede a adoptar la configuración de **célula completa**. Para ello, se aplica una suave presión negativa al interior de la micropipeta hasta conseguir romper el área de membrana aislada por ésta, lo que permite el acceso eléctrico al interior de la célula (célula completa; panel B de la Fig. 21). En pocos segundos, el contenido del citoplasma se homogeniza con el contenido de la solución en el interior de la micropipeta (solución interna), permitiendo el control de las concentraciones iónicas intracelulares.



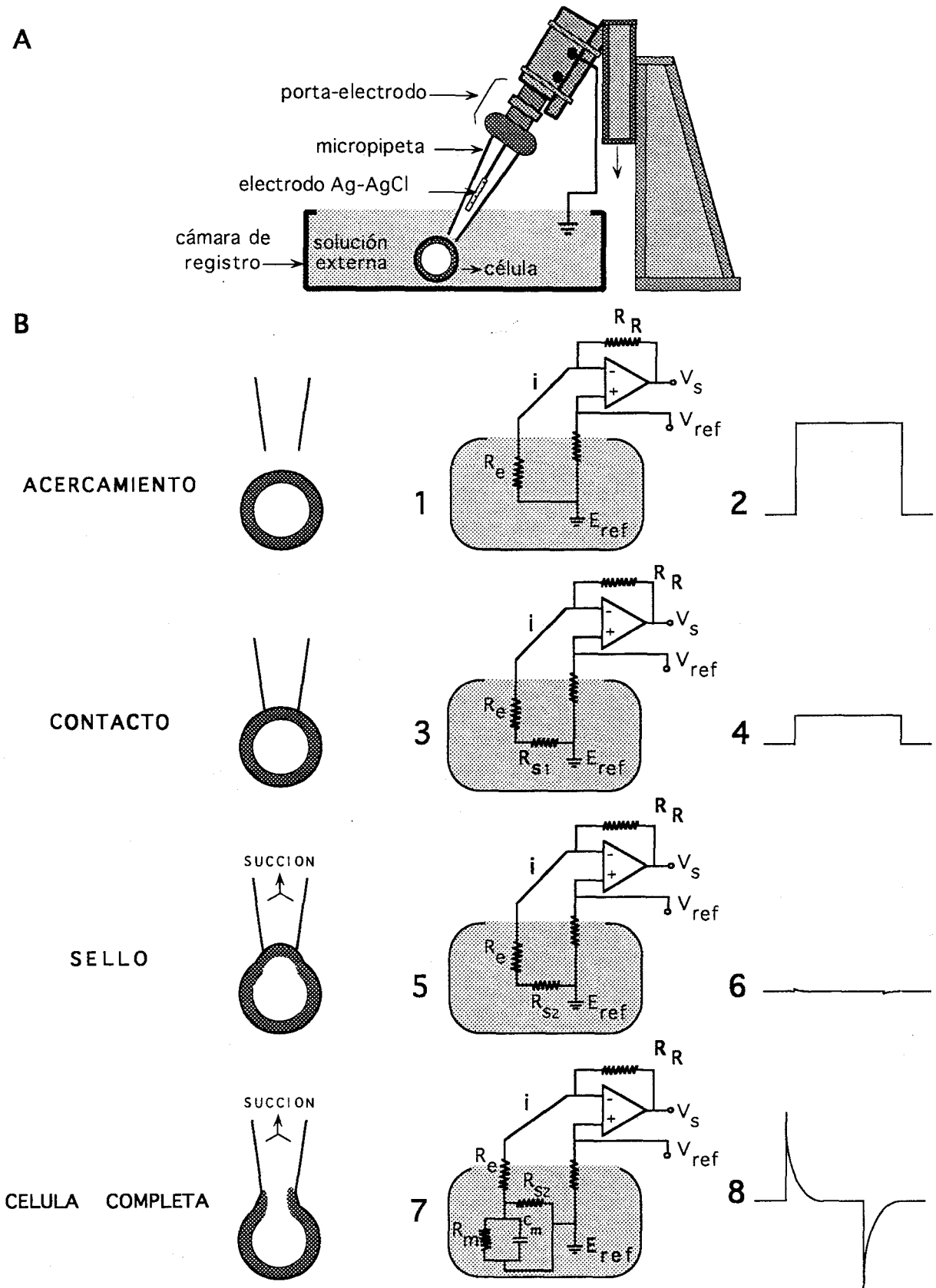


Fig. 21. A) Esquema general del dispositivo de registro. B) Pasos hacia la configuración de célula completa. En los esquemas 1, 3, 5 y 7 se representa el circuito eléctrico equivalente de las fases de acercamiento, contacto, sello y célula completa. En los esquemas 2, 4, 6 y 8, se representa cualitativamente la señal del voltaje de salida ( $V_s$ ) registrada en cada caso.

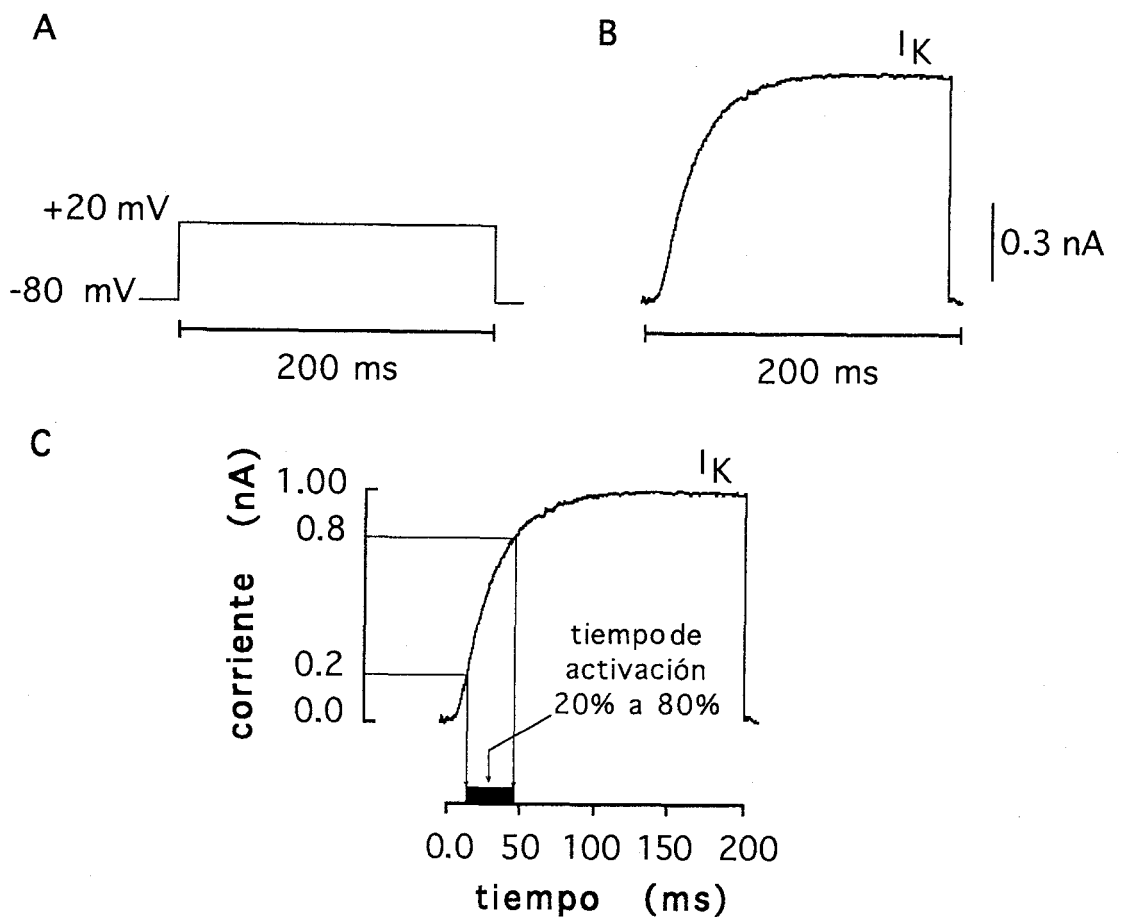
Cuando se establece la configuración de célula completa, el acceso eléctrico al interior de la célula se detecta por la aparición de corrientes transitorias capacitativas debidas a la capacidad de la membrana, ya que ésta se comporta eléctricamente como un condensador grande y, por tanto, de carga y descarga lenta. Estas corrientes capacitativas se representan cualitativamente en el esquema 8; panel B de la Fig. 21. Dichas corrientes capacitativas son sistemáticamente canceladas con objeto de que las corrientes registradas correspondan exclusivamente a corrientes que fluyen a través de los canales iónicos.

A partir de la configuración de célula completa se procede a la realización los experimentos electrofisiológicos. En la totalidad de los experimentos, se mantiene sistemáticamente un potencial de membrana controlado (*holding potential*) de -80 mV y se aplican pulsos cuadrados de voltaje de diferente amplitud y duración según el tipo de experimento (ver más adelante). Los pulsos de voltaje aplicados siempre están precedidos de 2-4 prepulsos de substracción (de polaridad opuesta a los pulsos de prueba), los cuales permiten estimar y eliminar componentes lineales (corrientes capacitativas y de fuga). Dado que una baja proporción de células CHO poseen canales endógenos de Na<sup>+</sup> dependientes del voltaje, las células que presentaron corrientes de Na<sup>+</sup> apreciables se descartaron sistemáticamente en todos los experimentos.

#### **4. Protocolos de pulsos de voltaje y parámetros cinéticos de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas**

En el presente trabajo hemos aplicado diferentes protocolos de pulso de voltaje al interior celular con objeto de inducir la apertura de los canales iónicos expresados y estudiar sus procesos de activación, inactivación, cierre y dependencia del voltaje. Para estudiar el proceso de activación de los canales se aplicaron pulsos despolarizantes de amplitud variable (generalmente de 100 mV) con una duración de 200 ms (panel A; Fig. 22).

Debido a que los canales pasan por varios estados cerrados previos al estado abierto, las corrientes registradas tras la activación de los canales siguen un curso sigmoideo (ver panel B de la Fig. 22, e *Introducción*). El parámetro elegido para estimar el curso temporal de la activación fue el tiempo de activación 20% a 80% (*rise time 20-80*), que es el tiempo que tarda la corriente en alcanzar desde el 20% hasta el 80% del máximo de su amplitud (Fig. 22; panel C).



**Fig. 22.** Protocolo utilizado para estudiar el proceso de activación. A; pulso cuadrado de voltaje aplicado al interior celular. B; representación de las corrientes de potasio ( $I_K$ ) registradas. C; medida del tiempo de activación 20% a 80%.

Para estudiar la sensibilidad de los canales a ser activados por el voltaje transmembranario, se procedió al estudio de la activación en el estado estacionario. Para ello, se construyó la **curva conductancia/voltaje** (curva G/V) utilizando una solución externa con 70 mM  $K^+$ . En primer

lugar se aplicaron prepulsos despolarizantes (ver esquema A de la Fig. 23), los cuales inducen la apertura de los canales produciendo corrientes salientes (ver esquema B de la Fig. 23). Cuando estas corrientes han llegado a su máxima amplitud y han alcanzado un estado estacionario se hiperpolariza la membrana a -80 mV (esquema B; Fig. 23), lo que genera las denominadas corrientes de cierre (esquema B; Fig. 23). En cada ensayo se aplicó un valor de prepulso entre 50 mV y 130 mV de amplitud (con incrementos de 10 mV) hiperpolarizando siempre -80 mV (ver esquema A; Fig. 23).

La amplitud de las corrientes de cierre registradas tras cada hiperpolarización es proporcional al número de canales que se han abierto como consecuencia de la aplicación de cada prepulso despolarizante. Por tanto, la medición de la amplitud de estas corrientes permite estimar la conductancia total de la membrana. Además, midiendo la amplitud inicial de las corrientes de cierre se puede estudiar el umbral de activación de las corrientes y examinar cómo se modifica la conductancia de los canales en función del potencial de membrana. La relación conductancia/voltaje se estimó midiendo la amplitud inicial de las corrientes de cierre obtenidas tras la aplicación de los diferentes pulsos despolarizantes y normalizando cada valor de amplitud respecto del máximo obtenido (ver Fig. 23; panel C). El promedio de los valores experimentales obtenidos se representa en un diagrama cartesiano y los datos se ajustan a una función de Boltzmann de la forma:

$$Y = 1 - [ 1 / (1 + \exp((V_m - V_{50})/k)) ]$$

donde  $k$  es un factor de pendiente,  $V_m$  es el valor de potencial de membrana y  $V_{50}$  es el valor de potencial al que se alcanza la mitad de la conductancia (Fig. 23, C).

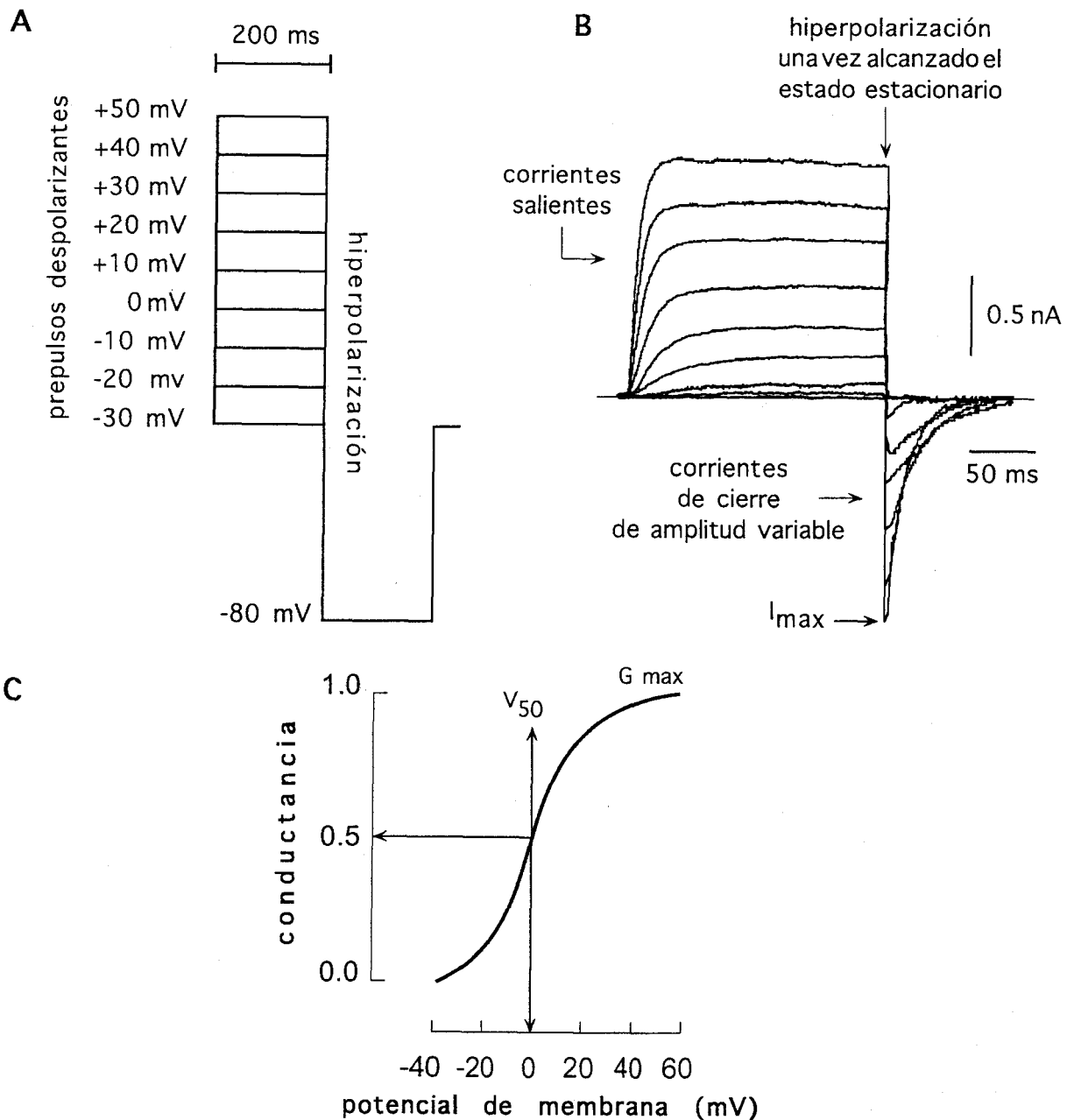


Fig. 23. Esquema del protocolo utilizado para el estudio de la relación conductancia/voltaje (ver texto para más detalles).

Para estudiar el proceso de **inactivación** se aplicaron pulsos despolarizantes (generalmente de 100 mV de amplitud) de larga duración (14 segundos; ver esquema A de la Fig. 24). En respuesta al pulso de voltaje, los canales se abren y pasan posteriormente al estado inactivado. Las corrientes registradas durante esta transición se representan en el esquema B de la Fig. 24. El curso temporal de la inactivación se estimó hallando la

constante de tiempo de una función exponencial simple que se ajustara al registro de corriente obtenida tras la aplicación del pulso (ver esquema C; Fig. 24). La variación de la intensidad de corriente ( $I$ ) a lo largo del tiempo sigue una ley de decrecimiento exponencial según  $I(t) = I_{\max}e^{-t/\tau}$  donde  $I_{\max}$  es el valor máximo de la amplitud de la corriente,  $t$  el tiempo y  $\tau$  la constante de tiempo de la inactivación. El parámetro  $\tau$  informa sobre la velocidad de decrecimiento de la corriente en el tiempo. Cuando  $t=\tau$ , el valor que toma la corriente  $I$  es del 37% de su valor inicial, ya que el valor multiplicativo de  $I_{\max}$  es  $1/e$ . Cuando transcurre un tiempo equivalente a  $4\tau$  el valor de  $I$  se suele considerar prácticamente nulo ya que, como se puede comprobar, éste se reduce a menos del 2%.

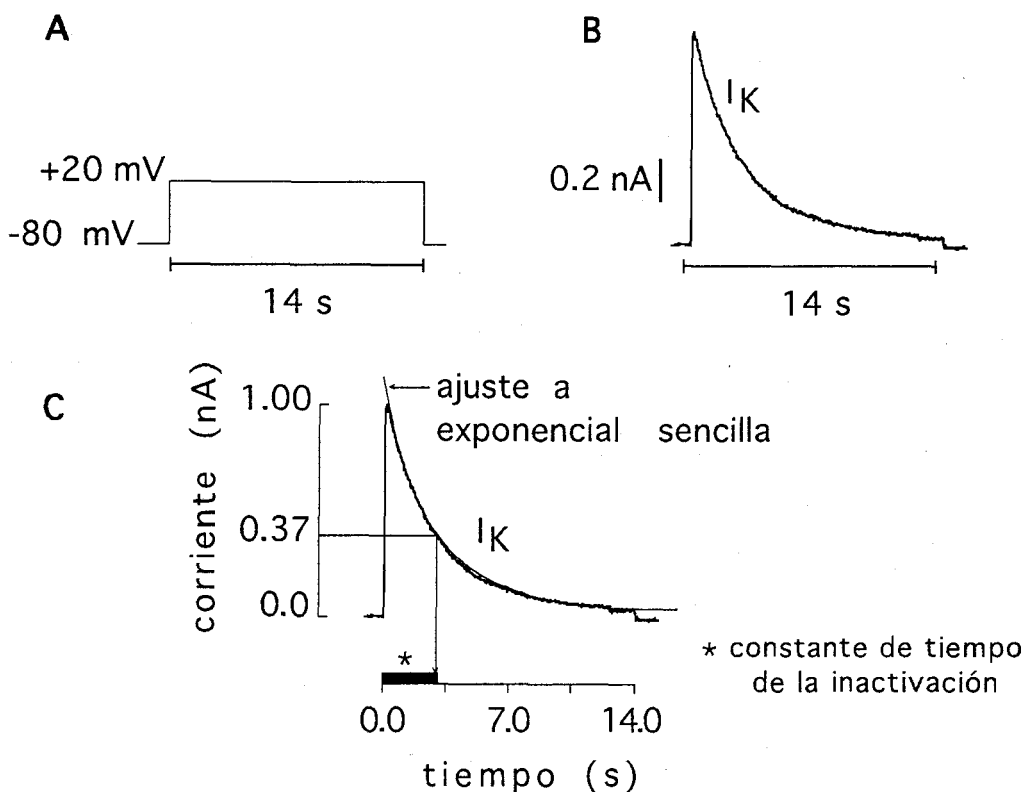


Fig. 24. Protocolo utilizado para estudiar el proceso de inactivación. A; pulso cuadrado de voltaje aplicado al interior celular. B; representación de las corrientes de potasio ( $I_K$ ) registradas. C; medida de la constante de inactivación ( $\tau$ ).  $I_K$ = corriente de potasio.

Para estudiar el proceso de cierre se utilizó una solución externa con 70 mM K<sup>+</sup>. En estas condiciones, el potencial de equilibrio para el K<sup>+</sup> es de ~15 mV. En primer lugar, se aplicó un prepulso despolarizante de 100 mV de amplitud y 200 ms de duración (ver esquema A de la Fig. 25), con el fin de inducir la apertura de los canales. Tras la apertura de los canales, se produce un flujo de K<sup>+</sup> desde el interior hacia el exterior celular (corrientes salientes en esquema B de la Fig. 25). Inmediatamente después de este prepulso se hiperpolarizó la membrana a -80 mV (esquema A; Fig. 25), lo que produce un cambio instantáneo en la dirección de la corriente y genera un flujo de K<sup>+</sup> hacia el interior celular (corrientes de cierre en esquema B de la Fig. 25). Al hiperpolarizar la membrana se induce el cierre de los canales, por lo que el registro continuo de las corrientes de cierre permite estudiar dicho proceso.

El procedimiento descrito anteriormente se repite aplicando siempre el mismo valor de prepulso (100 mV) pero incrementando consecutivamente (con intervalos de 10 mV) el valor de potencial de membrana (desde -80 hasta 0 mV). Mediante este protocolo es posible estudiar el curso temporal del cierre a diferentes potenciales de membrana (esquema A; Fig. 25). Para estimar la cinética del cierre, se halló la constante de tiempo de una función exponencial simple que se ajustara al registro de las corrientes de cierre obtenidas para cada valor de potencial de membrana (ver esquema C; Fig. 25). La variación de la intensidad de la corriente de cierre ( $I$ ) a lo largo del tiempo sigue una ley exponencial según  $I(t) = -I_{\max} e^{-t/\tau}$  donde  $-I_{\max}$  es el valor máximo de la amplitud de la corriente,  $t$  el tiempo y  $\tau$  la constante de tiempo de la corriente de cierre. El parámetro  $\tau$  informa sobre la velocidad de cierre de los canales. Cuando  $t=\tau$ , el valor que toma la corriente  $I$  es del 37% de su valor inicial ya que el valor multiplicativo de  $-I_{\max}$  es  $1/e$ .

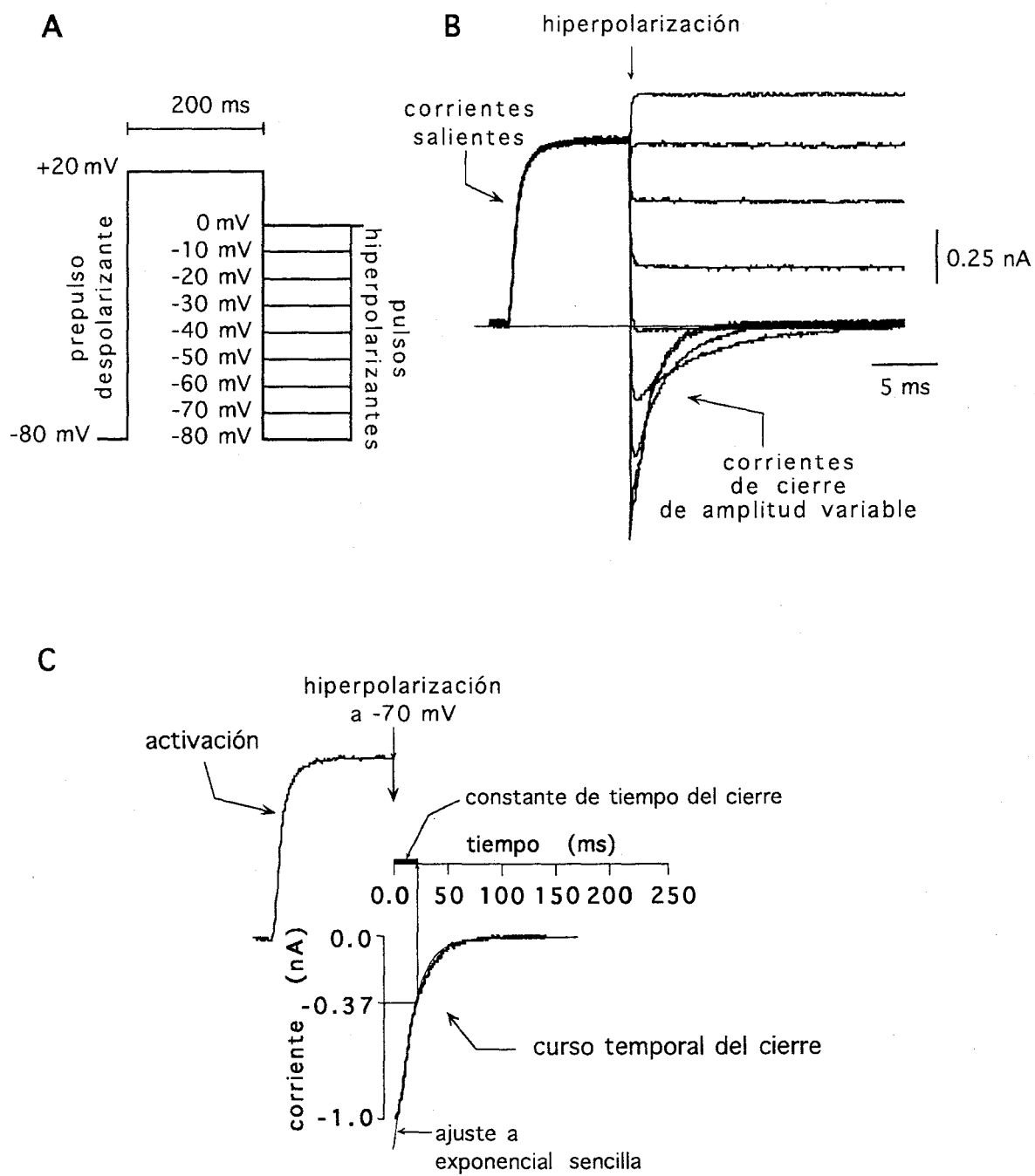


Fig. 25. Protocolo utilizado para el estudio del cierre. A; Protocolo de pulsos de voltaje. B; Corrientes iónicas registradas. C; Medición del curso temporal de las corrientes de cierre.



## RESULTADOS

Los resultados que se exponen a continuación se centran en la caracterización molecular y funcional de la subunidad  $\alpha$  de canal de  $K^+$  denominada Kv2.3. La subunidad Kv2.3 tiene características estructurales similares a las de las subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje, pero es incapaz de formar por sí misma canales funcionales. No obstante, Kv2.3 puede interactuar con otras subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  que forman canales conductores, constituyendo canales heterotetraméricos con características funcionales específicas. Kv2.3 es la primera subunidad  $\alpha$  de canal de  $K^+$  descrita cuya función parece ser la de regular la actividad de los canales iónicos dependientes de voltaje. Como se indicó en el apartado *Introducción*, esta propiedad reguladora puede constituir un nuevo mecanismo generador de diversidad molecular y funcional de los canales de  $K^+$  dependientes del potencial de membrana. Dado que este nuevo tipo de mecanismo regulador podría tener importantes implicaciones en la fisiología de las células excitables, el presente estudio se centró en la caracterización funcional de la subunidad Kv2.3 y en la identificación de los determinantes moleculares responsables de su actividad reguladora.

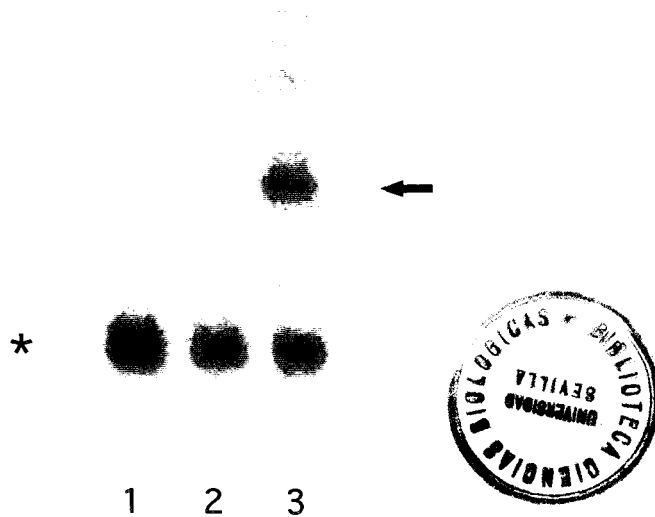
## 1. Caracterización funcional de la subunidad Kv2.3.

### 1.1. La proteína Kv2.3 es una subunidad $\alpha$ de canal de $K^+$ eléctricamente silente

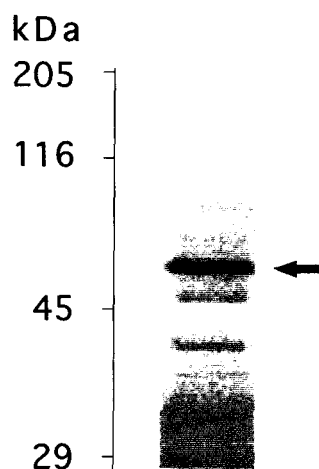
Una vez clonado el gen de Kv2.3 (Castellano et al., 1997), el primer paso que dimos en la caracterización funcional de esta subunidad de canal de  $K^+$  fue la transfección de su DNAC en células CHO con objeto de explorar sus características electrofisiológicas mediante la técnica de *patch clamp*. Sin embargo, en las células transfectadas con el DNAC de Kv2.3 no se detectaron corrientes macroscópicas de  $K^+$ . Como control experimental se expresó funcionalmente la subunidad Kv2.1. En células CHO transfectadas con el DNAC de Kv2.1 se detectaron corrientes macroscópicas de  $K^+$  con características cinéticas similares a las descritas previamente para esta subunidad (ver más adelante).

La ausencia de corrientes de  $K^+$  en células CHO transfectadas con el DNAC de Kv2.3 podía deberse a que las células no sintetizaran la proteína Kv2.3, debido a errores en la transcripción y/o la traducción. Para descartar estas posibilidades, se estudiaron en primer lugar los niveles de RNAm de Kv2.3 en células CHO transfectadas con el DNAC de Kv2.3, utilizando la técnica de *Northen blot* (ver Fig. 26). Como control experimental se analizaron los niveles de RNAm de Kv2.1 en células transfectadas con el DNAC de Kv2.1 y de células no transfectadas. Las cantidades de RNAm obtenidas de los distintos grupos de células fueron homogéneas, como se demuestra por los niveles similares de expresión del RNAm de la ciclofilina, una proteína constitutiva de casi todas las células. Mediante la incubación con una sonda radioactiva específica para Kv2.3 se observó que las células CHO transfectadas con el DNAC de Kv2.3 expresaron el correspondiente RNAm (ver Fig. 26, línea 3) mientras que no se observó ninguna señal de hibridación de la sonda con RNAm extraído de células sin transfectar (Fig. 26, línea 1) o transfectadas con la subunidad Kv2.1 (Fig.

26, línea 2). En segundo lugar, se determinó la capacidad del RNAm de Kv2.3 para producir su correspondiente proteína. Como se observa en la Fig. 27, la transcripción-traducción *in vitro* del DNAc de Kv2.3 produjo una proteína con el peso molecular esperado (~59 Kd).



**Fig. 26.** Análisis por *Northern blot* de la expresión del RNAm de Kv2.3. Se analizó el RNA total de células CHO no transfectadas (Línea 1), transfectadas con el DNAc de Kv2.1 (Línea 2), o transfectadas con Kv2.3 (Línea 3). Los grupos se hibridaron usando una sonda específica para Kv2.3, marcada radioactivamente. Como se observa en la figura, la flecha indica la presencia de una banda de aproximadamente 1.6 Kb que se corresponde con el tamaño esperado para el RNAm de Kv2.3. El asterisco indica la señal de hibridación con el RNAm de la ciclofilina utilizada como control de la cantidad de RNA cargada en cada línea.



**Fig. 27.** Transcripción-traducción *in vitro* del DNAc de Kv2.3. 2  $\mu$ l de reacción se fraccionan en un gel de SDS-poliacrilamida al 9%. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína Kv2.3 con un peso molecular de aproximadamente 59 Kd.

La ausencia de corrientes de  $K^+$  en células CHO transfectadas con el DNAC de Kv2.3 podía deberse a que la eficiencia de las transfecciones realizadas era muy baja. Dado que los registros de *patch clamp* se realizaron en células seleccionadas arbitrariamente y registradas una a una, era posible que sólo se hubiesen registrado células no transfectadas, o células transfectadas con una baja eficiencia que, por tanto, tenían bajos niveles de expresión. Con el fin de descartar estas posibilidades se empleó un protocolo experimental que permitió identificar las células transfectadas eficientemente. Dicho protocolo se basó en el uso de la proteína de fluorescencia verde GFP (Chalfie et al., 1994) la cual emite fluorescencia tras ser expuesta a irradiación con luz UV (ver *Materiales y métodos*). Para ello, se transfectaron células CHO con el DNAC de la GFP y con el DNAC de Kv2.3 y se registraron únicamente las células que emitían una fluorescencia intensa tras la irradiación con luz UV. Como control experimental se registraron células CHO cotransfectadas con el DNAC de la GFP y con el DNAC de la subunidad Kv2.1. En todas las células CHO cotransfectadas con GFP y Kv2.1, y que emitían una fluorescencia intensa, se registraron corrientes macroscópicas de  $K^+$  con características cinéticas (activación e inactivación) similares a las descritas previamente para los canales Kv2.1 (Frech et al., 1989; Fig. 28, A). También se registraron corrientes de  $K^+$  en células que emitían una menor intensidad de fluorescencia, siendo estas corrientes de menor amplitud pero con las mismas características cinéticas (datos no mostrados). Por el contrario, la cotransfección de la GFP y Kv2.3, aunque dió lugar a células que tenían una fluorescencia intensa, no produjo en ningún caso corrientes macroscópicas de  $K^+$  detectables (Fig. 28, B). Por lo tanto, aunque las células CHO pueden sintetizar RNAm de Kv2.3 a partir del DNAC clonado y este DNAC es capaz de convertirse en proteína, no parece que en estas células la proteína Kv2.3 se incorpore en la membrana para formar canales iónicos funcionales.

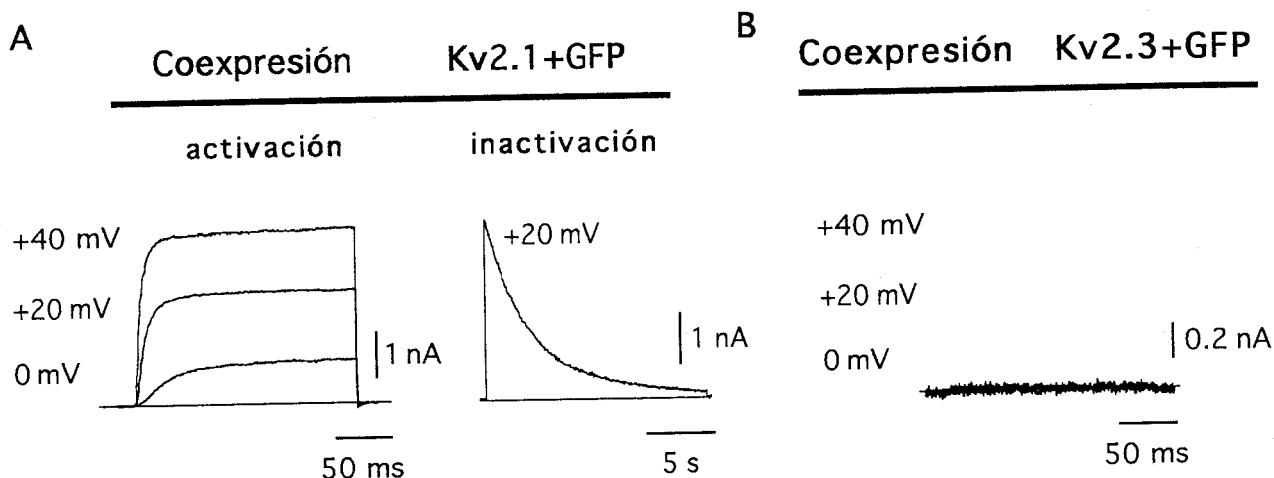


Fig. 28. Coexpresión de la GFP con dos subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  diferentes. Corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1+GFP (A) o en células cotransfectadas con Kv2.3+GFP (B). Nótese en B la ausencia de corrientes macroscópicas de  $K^+$  tras la cotransfección de Kv2.3+GFP. En cada figura se indican los valores a los que se fijó el potencial de membrana durante los registros.

La causa por la que la proteína Kv2.3 no produce canales iónicos funcionales no se ha estudiado con detalle, aunque podría deberse a las divergencias que se observan en su secuencia respecto de residuos que están muy conservados en los canales iónicos y que son determinantes de algunas características cinéticas o de la propia conducción iónica. Entre estos cambios los más importantes son los que afectan a los aminoácidos en las posiciones 234, 268, 382, 386, 402 y 412 de Kv2.3 (ver *Apéndice 3*). El aminoácido en la posición 402 es una arginina cuyo equivalente en Kv2.1 es la tirosina en la posición 480 (ver *Apéndice 3*) o la treonina en la posición 449 de *Shaker*. Los residuos en estas posiciones determinan en gran medida la sensibilidad de los canales de  $K^+$  al bloqueo por TEA extracelular, lo que se facilita por la presencia de aminoácidos con anillo fenólico como tirosina o fenilalanina (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y MacKinnon, 1992; Molina et al., 1997). El sitio de unión extracelular a TEA influye también en la modulación de la probabilidad de apertura de algunos canales por el potasio extracelular (Pardo et al., 1992; López-Barneo et al., 1993) y se sabe que la mutación Y480R en Kv2.1 da lugar a

canales no funcionales (Pascual, 1995). En células transfectadas con Kv2.3 no se observó la aparición de corrientes iónicas incluso en presencia de 70 mM K<sup>+</sup> extracelular (lo que supuestamente facilitaría la probabilidad de apertura de los canales). La expresión de la subunidad Kv2.3 mutante R402Y tampoco dió lugar a canales funcionales ni alteró su capacidad reguladora sobre Kv2.1 (datos no mostrados). Por lo tanto, la presencia del aminoácido arginina en la posición 402 de Kv2.3 no parece ser la responsable de la pérdida de función de esta subunidad. Estas observaciones sugieren que Kv2.3 es una subunidad  $\alpha$  de canal de K<sup>+</sup> eléctricamente silente, es decir, que carece de la capacidad para formar canales homoméricos funcionales.

## **1.2. La proteína Kv2.3 es una subunidad $\alpha$ de canal de K<sup>+</sup> con características reguladoras**

### **1.2.1. La subunidad Kv2.3 regula selectivamente a los canales miembros de la familia Kv2**

Uno de los mecanismos generadores de diversidad estructural y funcional de los canales de K<sup>+</sup> dependientes del voltaje es la formación de canales heteroméricos, constituídos mediante la interacción entre subunidades diferentes pero con un alto grado de homología en su estructura primaria (ver *Introducción*). Se ha descrito que los canales heteroméricos tienen características cinéticas diferentes de las observadas en los canales producto del ensamblaje homomérico entre subunidades (Isacoff et al., 1990; Ruppertsberg et al., 1990; Covarrubias et al., 1991; Li et al., 1992; Sheng et al., 1993; Wang et al., 1993). Con objeto de estudiar si Kv2.3 podía dar lugar a la formación de canales heteroméricos, se realizaron experimentos de coexpresión de Kv2.3 y de varios canales de K<sup>+</sup> dependientes del voltaje miembros de diferentes familias génicas. Para ello, se estudiaron los efectos funcionales de la cotransfección, en células CHO, de los DNAs de Kv2.3 y de las subunidades *Shaker* B  $\Delta$ 6-46, Kv1.1 (RBK1),

Kv1.2, Kv1.4 (RCK4), Kv2.1, Kv3.3 (ShIIID) y Kv4.2. En los experimentos se utilizaron siempre las mismas cantidades de DNAC (3  $\mu$ g de DNAC para la expresión en solitario y 6  $\mu$ g para las coexpresiones; 3  $\mu$ g de cada subunidad). Como se ilustra en la Fig. 29, únicamente las corrientes de K<sup>+</sup> registradas tras la coexpresión de Kv2.3 con Kv2.1 tuvieron cinéticas de activación e inactivación claramente diferentes de las registradas tras la expresión en solitario de Kv2.1. Resultados similares se obtuvieron tras la coexpresión de Kv2.3 con la subunidad Kv2.2 (datos no mostrados). Por el contrario, las cinéticas de activación e inactivación de los canales registrados tras la coexpresión de Kv2.3 con *Shaker* B  $\Delta$ 6-46, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv2.1, Kv3.3 o Kv4.2 fueron similares a las observadas cuando estas subunidades se expresaron en solitario (ver Fig. 29; datos de la coexpresión de Kv1.4+Kv2.3 no mostrados). Estas observaciones sugieren que la subunidad Kv2.3 forma canales heteroméricos específica y selectivamente con las subunidades miembros de la familia Kv2, modificando su función. Ya que la subunidad Kv2.3 comparte su mayor homología con los canales de la familia Kv2, los resultados sugieren que Kv2.3 no es capaz de formar canales heteroméricos funcionales con subunidades con las que no comparte un alto grado de homología en su estructura primaria.

Dado que la proteína Kv2.3 no parece formar canales homoméricos conductores pero puede modificar selectivamente la función de los canales miembros de la familia Kv2, postulamos que el posible papel funcional de Kv2.3 es el de actuar como **subunidad  $\alpha$  reguladora** de canales de K<sup>+</sup>. Este mecanismo de regulación tiene precedentes bien conocidos en los canales iónicos activados por ligandos. Se ha descrito que existen subunidades transmembranarias eléctricamente silentes que pueden interaccionar con otras subunidades que forman canales y regular su función (Chen et al., 1993; Liman y Buck, 1994).

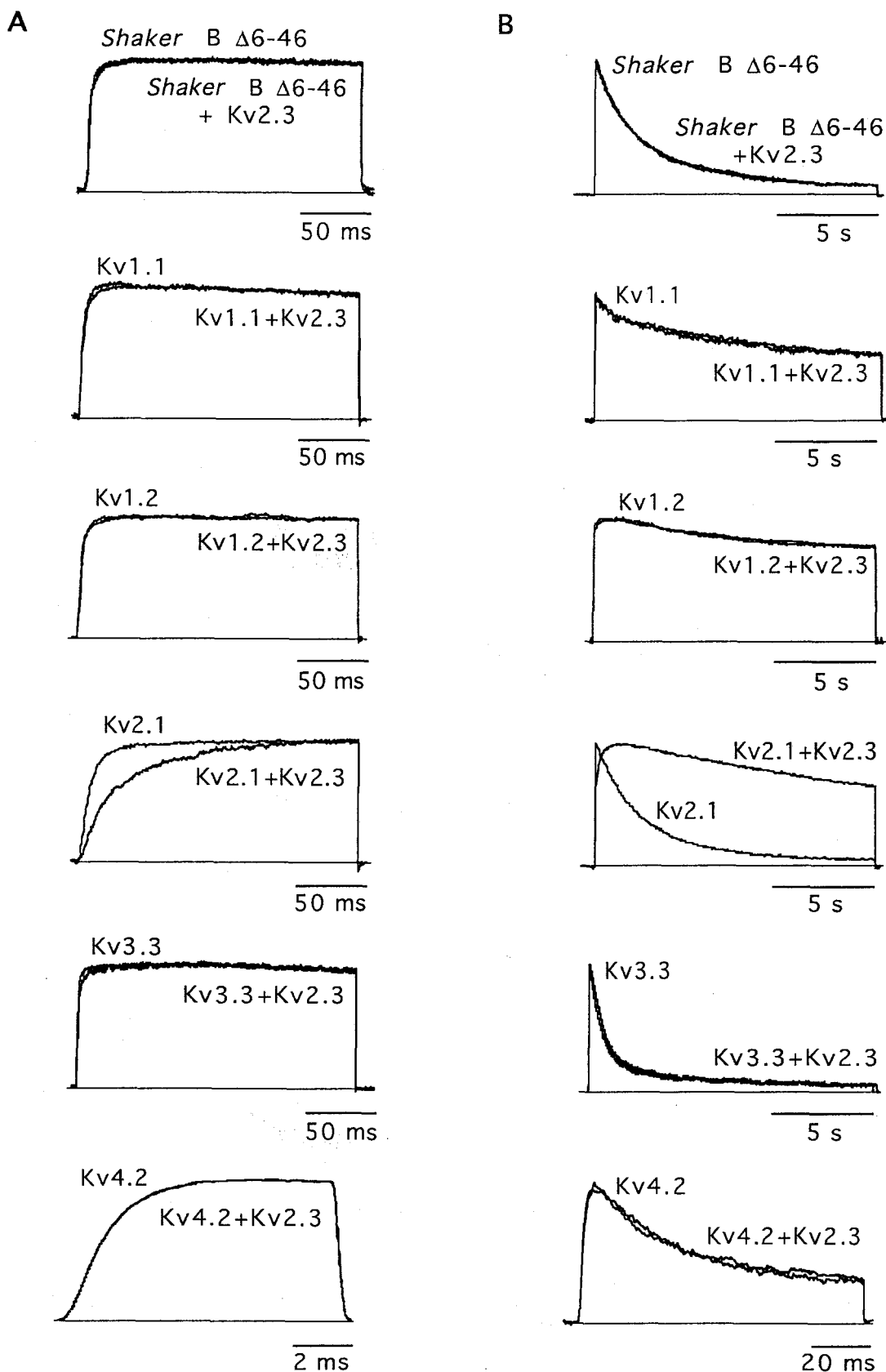


Fig. 29. Corrientes obtenidas en células CHO transfectadas con el DNAC de *Shaker B Δ6-46*, *Kv1.1*, *Kv1.2*, *Kv2.1*, *Kv3.3* o *Kv4.2*, y en células cotransfectadas con cada subunidad +*Kv2.3*. El potencial de membrana se fijó en -80 mV y se aplicaron pulsos a +20 mV para estudiar la activación (panel A) y la inactivación (panel B) de los canales (ver base de tiempo). Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar su comparación.



### 1.2.2. Caracterización de los efectos reguladores de Kv2.3 sobre Kv2.1

Como se ha mencionado en la sección 1.2.1 de este apartado, tras la coexpresión de las subunidades Kv2.3 y Kv2.1, en células CHO, se detectan corrientes macroscópicas de  $K^+$  con propiedades cinéticas diferentes de las observadas cuando Kv2.1 se expresó en solitario. Para caracterizar con más detalle los efectos inducidos por la subunidad Kv2.3 sobre la función de Kv2.1, se estudiaron los procesos de activación, relación conductancia/voltaje, inactivación y cierre de los canales producto de la coexpresión de Kv2.3+Kv2.1.

#### a) Activación

En la Fig. 30, se muestra cualitativamente el curso temporal de la activación de las corrientes de  $K^+$  registradas en una célula CHO transfectada con el DNAc de Kv2.1 o en una célula cotransfectada con los DNAc de Kv2.3+Kv2.1. Como se aprecia en la figura, las corrientes producto de la coexpresión Kv2.3+Kv2.1 tuvieron cinéticas de activación marcadamente más lentas que las observadas en la subunidad Kv2.1 (ver tabla 2, Pag. 99). Nótese en la Fig. 30 como el enlentecimiento de la activación inducido por Kv2.3 tiene una marcada dependencia de los valores del potencial de membrana. Este efecto de enlentecimiento se ilustra cuantitativamente en la Fig. 31, en la que se resumen los datos de los registros obtenidos en 8-15 células diferentes. Cuando el potencial de membrana alcanzó valores inferiores a +20 mV (como 0 ó -10 mV), el curso temporal de la activación de los canales Kv2.3+Kv2.1 fue ~3-6 veces más lento que el de los canales Kv2.1. Por el contrario, las cinéticas de activación fueron muy similares cuando el potencial de membrana fue más positivo (+30 ó +40 mV; ver Fig. 31).

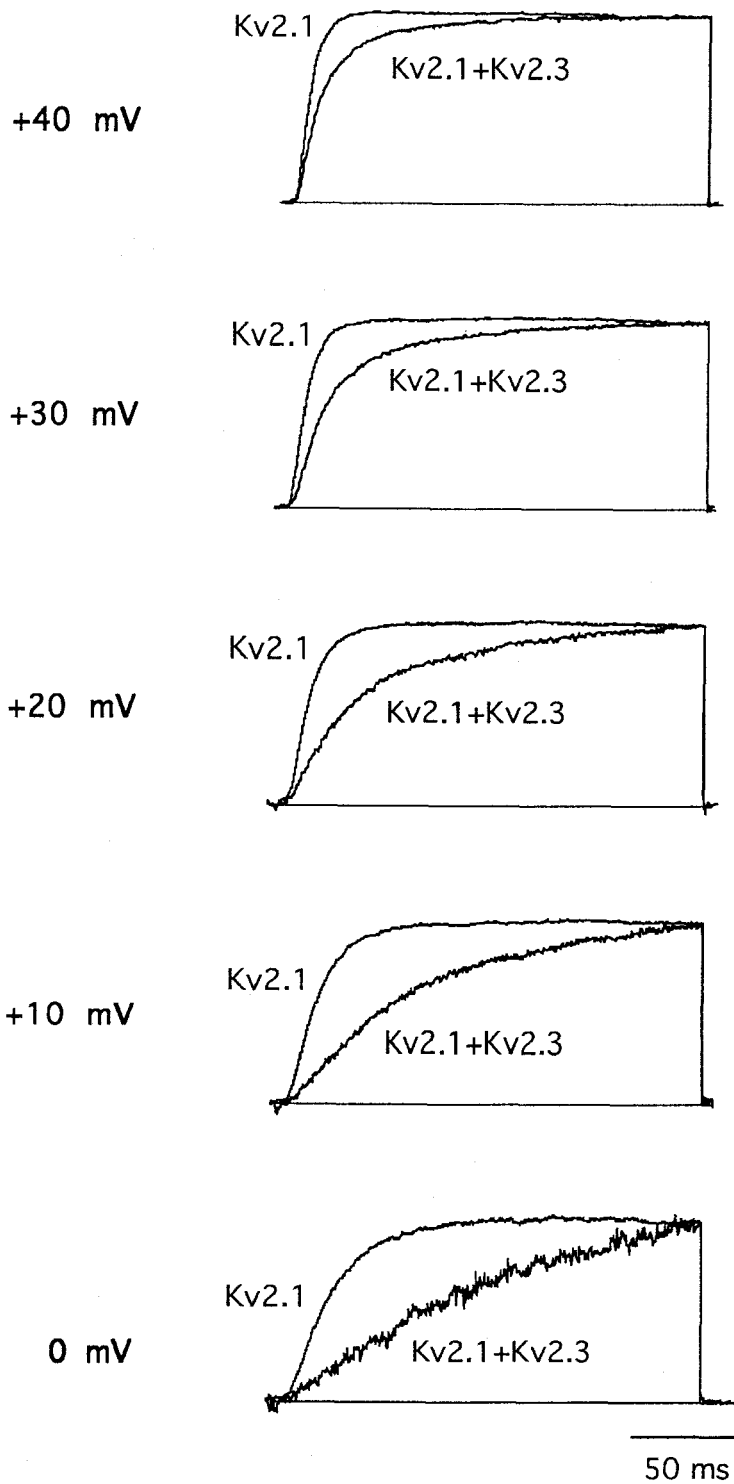


Fig. 30. Comparación del curso temporal de la activación de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células transfectadas con el DNAc de Kv2.1 o cotransfectadas con los DNAc de Kv2.1+Kv2.3. Las corrientes (registradas a diferentes valores de potencial de membrana) se muestran superpuestas y escaladas para facilitar su comparación.

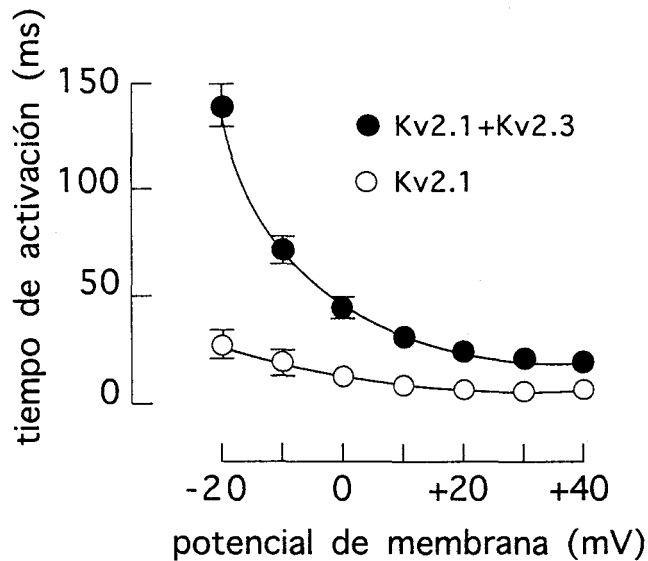


Fig. 31. Valores del tiempo de activación de corrientes macroscópicas de Kv2.1 o de la coexpresión Kv2.1+Kv2.3 (ordenada) en función del potencial de membrana (abscisa). Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de 8-15 experimentos.

### b) Relación conductancia/voltaje

Además del efecto de enlentecimiento de la activación, Kv2.3 también indujo un desplazamiento de la curva conductancia/voltaje de  $\sim 20$  mV hacia potenciales de membrana más positivos, respecto de lo observado en Kv2.1. En la Fig. 32 se representan los valores promedio obtenidos en 4-7 experimentos diferentes realizados en células transfectadas con el DNAc de Kv2.1 o con los DNAc de Kv2.3+Kv2.1. Nótese como el potencial de membrana requerido para alcanzar el 50% de la conductancia total ( $V_{50}$ ) es de  $\sim 2$  mV para Kv2.1 y de  $\sim 22$  mV para los canales producto de la coexpresión Kv2.3+Kv2.1. Para construir la curva corriente/voltaje, las corrientes se registraron utilizando una solución externa con 70 mM  $K^+$ . La relación conductancia/voltaje se estimó midiendo la amplitud de las corrientes obtenidas mediante pulsos hiperpolarizantes a  $-80$  mV, precedidos por pulsos despolarizantes (de  $-30$  mV a  $50$  mV). Los valores de amplitud de las corrientes se normalizaron respecto al valor máximo y los datos se representaron en un diagrama cartesiano ajustándolos a una función de la forma:  $Y=1-[1/1+\exp((V_m-V_{50})/k)]$  (ver *Materiales y métodos*).

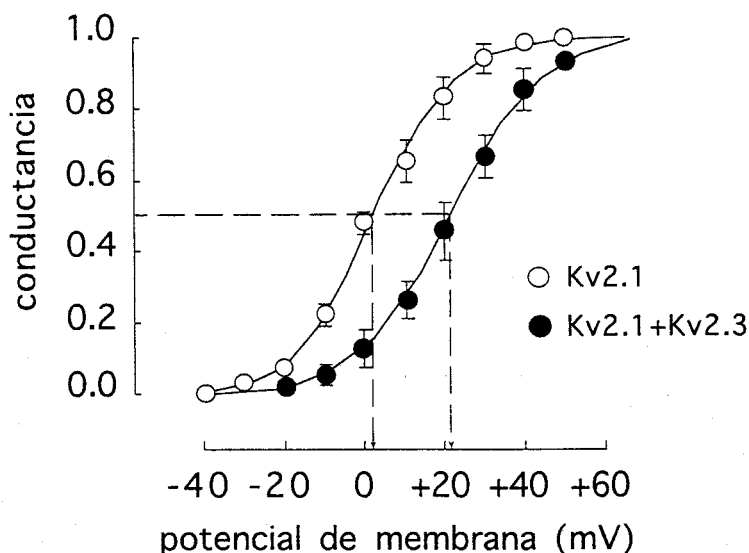


Fig. 32. Relación conductancia/voltaje obtenida a partir de las corrientes registradas en células CHO expresando Kv2.1 o coexpresando Kv2.1+Kv2.3. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4-7 experimentos. Las líneas discontinuas indican el valor de potencial de membrana requerido, en cada caso, para alcanzar el 50% de la conductancia total ( $V_{50}$ ).

### c) Inactivación

El curso temporal de la inactivación de las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con el DNAc de Kv2.1 o cotransfectadas con los DNAc de Kv2.1+Kv2.3 se muestra en la Fig. 33. Para el estudio del proceso de inactivación se aplicaron pulsos de voltaje de larga duración (ver base de tiempo en la Fig. 33) y las corrientes registradas en cada caso se escalaron con objeto de facilitar la comparación de sus cinéticas (véanse los protocolos de pulso en el apartado *Materiales y métodos*). Como se puede observar en la figura, las corrientes registradas tras la coexpresión Kv2.3+Kv2.1 tuvieron cinéticas de inactivación marcadamente más lentas que las observadas cuando Kv2.1 se expresó en solitario. Los valores promedio de la constante de tiempo de la inactivación de las corrientes obtenidas tras la coexpresión Kv2.3+Kv2.1 fueron  $\sim 4$  veces mayores que los de la expresión en solitario de Kv2.1 (ver tabla 3, Pág. 100).

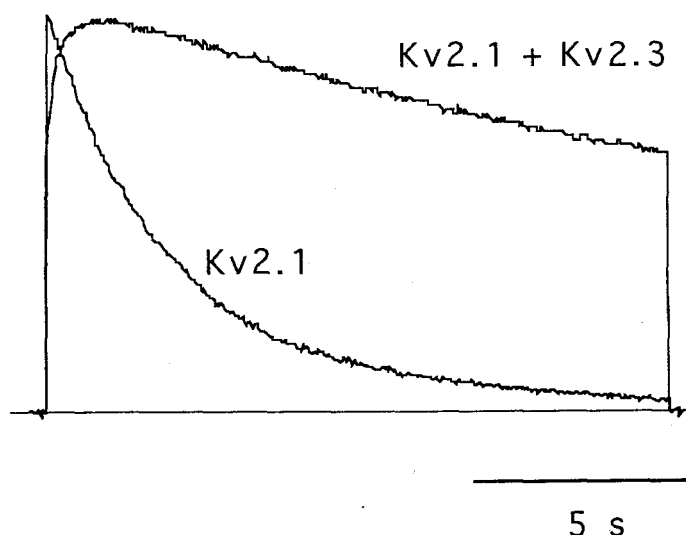


Fig. 33. Comparación del curso temporal de la inactivación de las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con el DNAc de Kv2.1 o cotransfectadas con los DNAc de Kv2.1+Kv2.3. Tras fijar el potencial de membrana en  $-80$  mV, se aplicó un pulso de  $100$  mV de amplitud y  $14$  s de duración. Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar su comparación.

#### d) Cierre

La subunidad Kv2.3 también tuvo efectos moduladores sobre la cinética de cierre de Kv2.1. En la Fig. 34, A, se muestran las cinéticas de las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1 o cotransfectadas con Kv2.1+Kv2.3. Para el registro de las corrientes se fijó el potencial de membrana en  $-80$  mV y se aplicaron pulsos a  $+20$  mV, al final de los cuales se aplicaron pulsos a  $-80$  mV y  $-60$  mV, respectivamente, que permitieron registrar las corrientes de cierre (ver base de tiempo en Fig. 34, A). Como se observa en la figura, tras la aplicación de pulsos despolarizantes se registraron corrientes salientes con cinéticas de activación más lentas para los canales producto de la coexpresión Kv2.3+Kv2.1 que para los canales Kv2.1, tal como se había observado anteriormente. Así mismo, la cinética de cierre de los canales producto de la coexpresión Kv2.1+Kv2.3 fue más lenta que la de los canales Kv2.1 (compárense las corrientes de cierre a  $-80$  mV y a  $-60$  mV en cada caso). El enlentecimiento de la desactivación inducido por la subunidad Kv2.3 se aprecia mejor al escalar y superponer las corrientes de cierre registradas, tal como se muestra en la Fig. 34, B.

En resumen, todas estas observaciones indican que las subunidades Kv2.3 y Kv2.1 forman canales de K<sup>+</sup> heterotetraméricos que tienen cinéticas de activación, inactivación y cierre marcadamente más lentas que las de los canales homoméricos de Kv2.1. El efecto de enlentecimiento que Kv2.3 ejerce sobre la cinética de los canales Kv2.1 sugiere que la subunidad Kv2.3 podría estar implicada *in vivo* en la modulación de los procesos fisiológicos mediados por los canales de K<sup>+</sup> miembros de la familia Kv2.

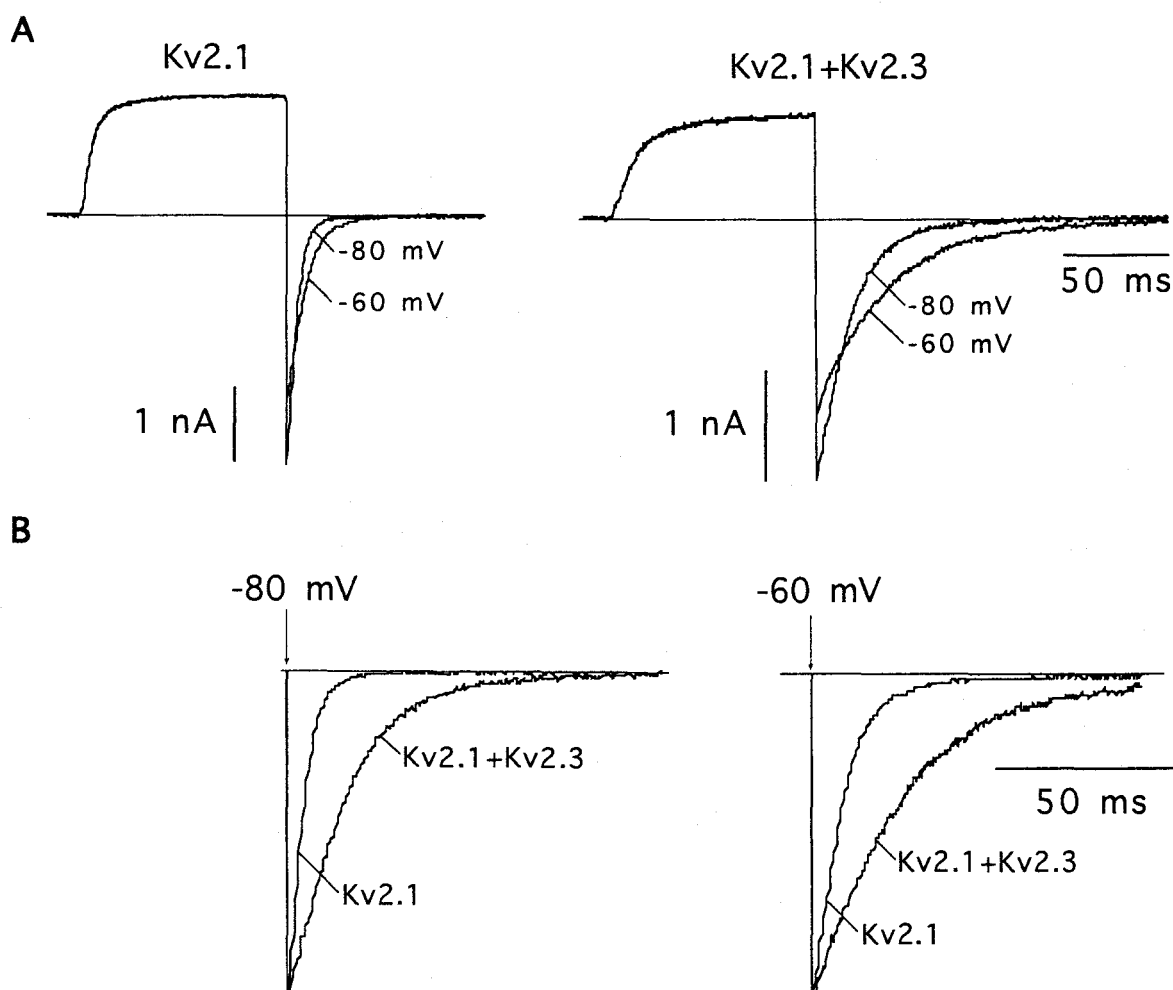


Fig. 34. Comparación del curso temporal del cierre de los canales registrados en células CHO transfectadas con Kv2.1 o cotransfectadas con Kv2.1+Kv2.3. (A) El curso temporal de las corrientes de cierre se registró a -60 mV y -80 mV, respectivamente. (B) Comparación de las cinéticas de las corrientes de cierre. Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar su comparación.

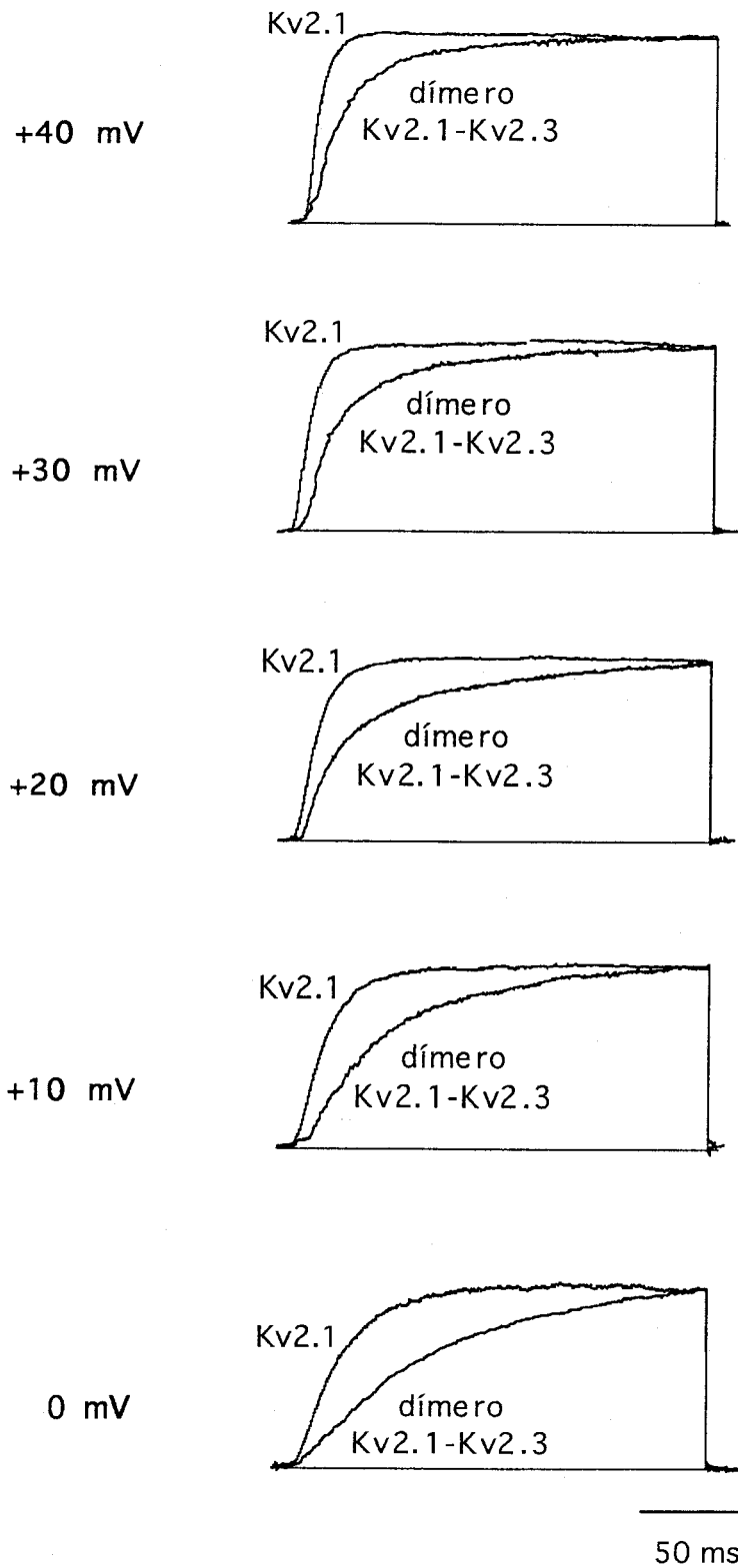
### 1.3. La subunidad Kv2.3 se inserta en la bicapa lipídica y forma canales heteroméricos con Kv2.1

#### 1.3.1. Estudio funcional de la proteína dimérica Kv2.1-Kv2.3

Los estudios electrofisiológicos realizados en células CHO cotransfectadas con los DNAC de las subunidades Kv2.3+Kv2.1 indicaban que Kv2.3 era capaz de formar canales heteroméricos funcionales con Kv2.1. Con objeto de demostrar que la formación de heterotetrámeros entre estas subunidades era compatible con los datos electrofisiológicos obtenidos en dichos experimentos, se procedió a la construcción y estudio del dímero Kv2.1-Kv2.3, generado mediante la fusión secuencial de los DNAC de Kv2.1 y de Kv2.3 (ver *Materiales y métodos*). De este modo se obtuvieron canales de K<sup>+</sup> heterotetraméricos con una estequiometría 2:2. El DNAC del dímero Kv2.1-Kv2.3 se transfectó en células CHO con objeto de estudiar el curso temporal de sus procesos de activación, inactivación y cierre, así como la relación conductancia/voltaje de las corrientes registradas.

##### a) Activación

En la Fig. 35, se muestra el curso temporal de la activación de las corrientes registradas en una célula CHO transfectada con el DNAC de Kv2.1 o en una célula transfectada con el DNAC del dímero Kv2.3-Kv2.1. Como se puede observar en la figura, los canales producto de la expresión del dímero Kv2.3-Kv2.1 tuvieron una cinética de activación más lenta que la de los canales homoméricos formados por la subunidad Kv2.1. El enlentecimiento de la cinética de activación inducido por Kv2.3 también tuvo una marcada dependencia de los valores del potencial de membrana (tal como se observó en la coexpresión Kv2.3+Kv2.1; ver Fig. 30 y Fig. 31). Este efecto se ilustra cuantitativamente en la Fig. 36, en la que se resumen los datos experimentales obtenidos en 6-15 células diferentes.



**Fig. 35.** Comparación del curso temporal de la activación de las corrientes de  $K^+$  registradas en células transfectadas con el DNAc de Kv2.1 o transfectadas con DNAc del dímero Kv2.1-Kv2.3. Las corrientes (registradas a diferentes valores de potencial de membrana) se muestran superpuestas y escaladas para facilitar su comparación.



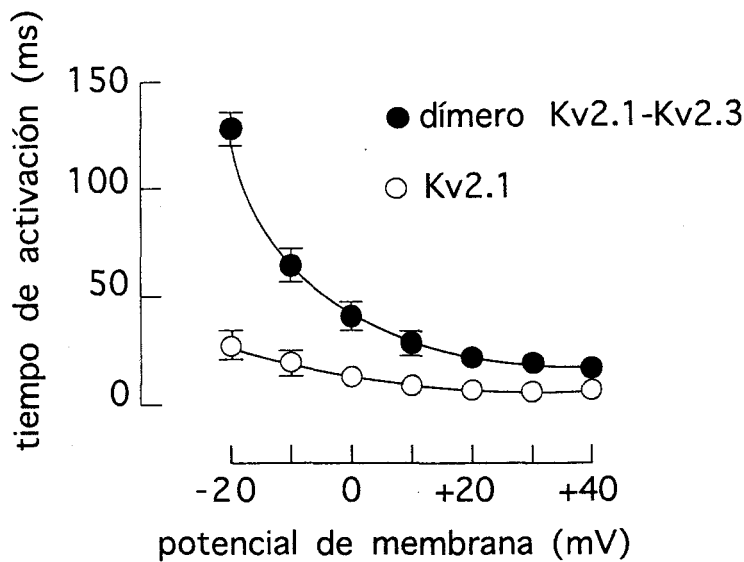


Fig. 36. Valores del tiempo de activación de corrientes macroscópicas de Kv2.1 o de la expresión del dímero Kv2.1-Kv2.3 (ordenada) en función del potencial de membrana (abscisa). Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de 6-15 experimentos.

### b) Relación conductancia/voltaje

Como se puede observar en la Fig. 37, las corrientes macroscópicas de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con el DNAc del dímero Kv2.1-Kv2.3 tuvieron un desplazamiento en la curva conductancia/voltaje de  $\sim 20$  mV hacia potenciales de membrana más positivos, en comparación con las corrientes registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1. En la figura se representan los valores promedio obtenidos en 4-6 experimentos diferentes. Nótese en la figura cómo el potencial de membrana requerido para alcanzar el 50% de la conductancia total ( $V_{50}$ ) es de  $\sim 2$  mV para los canales Kv2.1 y de  $\sim 22$  mV para los canales producto de la expresión del dímero Kv2.3-Kv2.1. Estos resultados fueron cualitativa y cuantitativamente similares a los obtenidos previamente en células CHO cotransfectadas con los DNAc de las subunidades Kv2.3+Kv2.1 (ver Fig. 32, B).

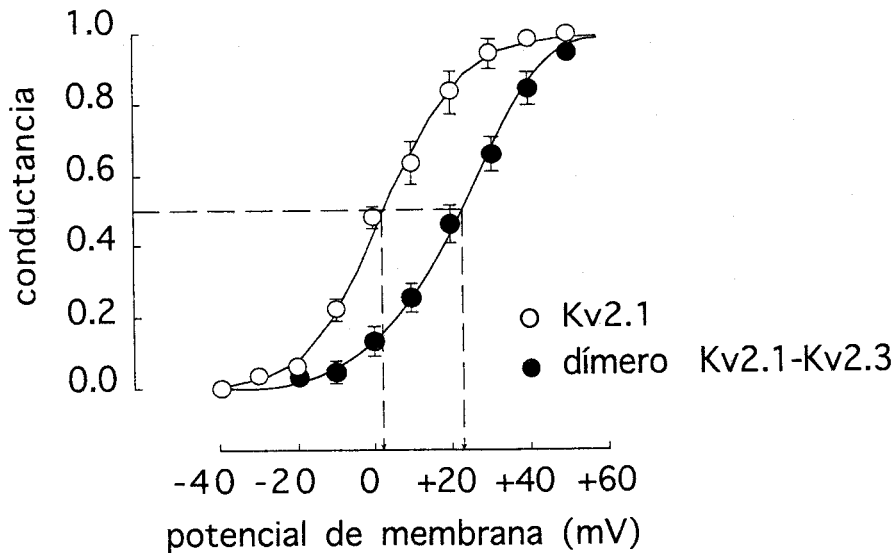


Fig. 37. Relación conductancia/voltaje obtenida a partir de las corrientes registradas en células CHO transfectadas con el DNAc de Kv2.1 o con el DNAc del dímero Kv2.1-Kv2.3. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4-6 experimentos. Las líneas discontinuas indican el valor de potencial de membrana requerido, en cada caso, para alcanzar el 50% de la conductancia total ( $V_{50}$ ).

### c) Inactivación

En la Fig. 38 se muestra el curso temporal de la inactivación de las corrientes de  $K^+$  registradas en una célula CHO transfectada con el DNAc de la subunidad Kv2.1 o en una célula transfectada con el DNAc del dímero Kv2.1-Kv2.3. Tal como se observó en células cotransfectadas con las subunidades Kv2.3+Kv2.1 (ver Fig. 33), los canales formados tras la expresión del dímero Kv2.3-Kv2.1 tuvieron cinéticas de inactivación marcadamente más lentas que las observadas cuando Kv2.1 se expresó en solitario (Fig. 38). Las corrientes registradas para el estudio del proceso de inactivación se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje de 100 mV de amplitud y 14 s de duración, desde un potencial de membrana de -80 mV (ver *Materiales y métodos*). Como se resume en la tabla 3 (Pag. 100), los valores promedio de la constante de inactivación de las corrientes obtenidas tras la expresión del dímero Kv2.3-Kv2.1 fueron  $\sim 4$  veces mayores que los de las corrientes producto de la expresión de Kv2.1.

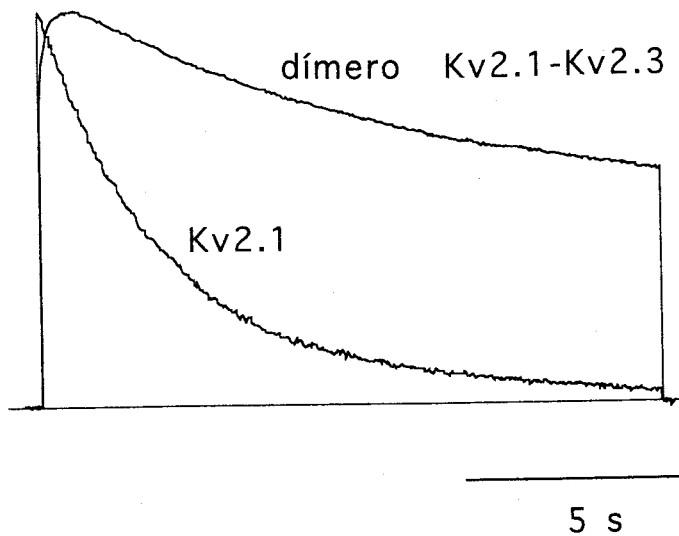
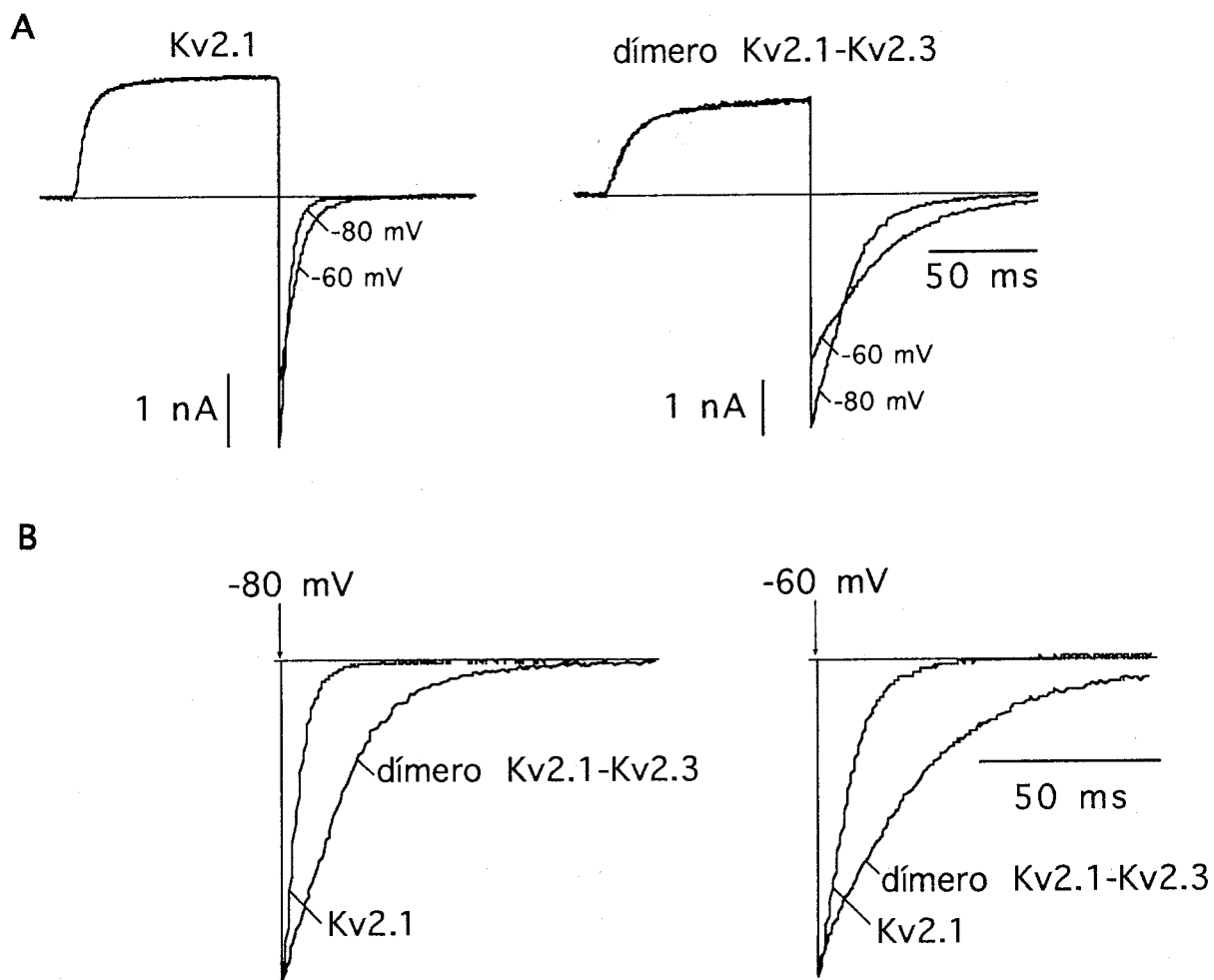


Fig. 38. Comparación del curso temporal de la inactivación de las corrientes de  $K^+$  registradas en células transfectadas con el DNAc de Kv2.1 o transfectadas con el DNAc del dímero Kv2.1-Kv2.3. Tras fijar el potencial de membrana en  $-80$  mV, se aplicó un pulso de  $100$  mV de amplitud y  $14$  s de duración. Las corrientes registradas se muestran superpuestas y escaladas para facilitar su comparación.

#### d) Cierre

Como se observó en los experimentos de coexpresión de Kv2.3+Kv2.1 (Fig. 34), los canales formados tras la expresión del dímero Kv2.1-Kv2.3 tuvieron un marcado enlentecimiento en sus cinéticas de cierre respecto de lo observado en los canales Kv2.1 (Fig. 39). Las corrientes de cierre se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos hiperpolarizantes a  $-80$  mV y  $-60$  mV, respectivamente, precedidos de un prepulso despolarizante a  $+20$  mV (ver *Materiales y métodos*). La diferencia en el curso temporal de las corrientes de cierre registradas en cada caso se aprecia mejor si éstas se escalan y se superponen, tal como se muestra en la Fig. 39, B. Como se resume en la tabla 4 (Pag. 101), las cinéticas de cierre de los canales formados por el dímero Kv2.1-Kv2.3 fueron  $\sim 4$  veces más lentas que las de Kv2.1 cuando el potencial de membrana era de  $-60$  mV. En general, el curso temporal del cierre de los canales formados por el dímero Kv2.1-Kv2.3 fue más lento que el de los canales Kv2.1 cuando el potencial de membrana alcanzaba valores superiores a  $-60$  mV (como  $-50$  mV o  $-40$  mV; datos no mostrados). Los resultados del estudio del dímero Kv2.1-Kv2.3 tuvieron un

parecido extraordinario a los obtenidos tras el estudio de la coexpresión de Kv2.1+Kv2.3. Estas observaciones indican que Kv2.1 y Kv2.3 forman canales heterotetraméricos funcionales con cinéticas de activación, inactivación y cierre marcadamente más lentas que las de los canales homoméricos de Kv2.1.



**Fig. 39.** Comparación del curso temporal del cierre de los canales registrados en células transfectadas con Kv2.1 o con el dímero Kv2.1-Kv2.3. (A) Comparación de la activación y cierre de los canales formados por las subunidades Kv2.1 y por el dímero Kv2.1-Kv2.3. Las corrientes de cierre se registraron a un potencial de membrana de -60 mV y -80 mV, respectivamente. (B) Comparación de las cinéticas de las corrientes de cierre. Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar su comparación.

### 1.3.2 Estudio funcional de la sensibilidad al $Zn^{2+}$ extracelular

Para demostrar que al formar canales heterotetraméricos con Kv2.1 la subunidad Kv2.3 se inserta en la bicapa lipídica y expone parte de su estructura al medio, estudiamos la sensibilidad a la aplicación de 1 mM  $Zn^{2+}$  extracelular en los canales formados por la coexpresión de Kv2.3+Kv2.1 y por el dímero Kv2.1-Kv2.3. Se sabe que el  $Zn^{2+}$  aplicado extracelularmente actúa como un poderoso bloqueante de algunos canales de  $K^+$ . Existen canales, como por ejemplo Kv1.1, con una  $K_d$  para el bloqueo por  $Zn^{2+}$  en el rango  $\mu M$ , mientras que otros canales (como Kv2.1), son particularmente insensibles al bloqueo inducido por  $Zn^{2+}$  extracelular y tienen una  $K_d$  en el rango de mM (Pardal y Ortega-Sáenz, comunicación personal; De Biasi et al. 1993a). Aunque las secuencias de aminoácidos de Kv2.3 y Kv2.1 comparten una homología de ~50% en su región central (ver apartado *Introducción*), ambas subunidades tienen marcadas divergencias en sus lazos extracelulares. Por tanto, los canales heteroméricos constituidos por la combinación en la membrana de las subunidades Kv2.1 y Kv2.3 podían tener una sensibilidad al bloqueo por  $Zn^{2+}$  diferente de la que tienen los canales homoméricos de Kv2.1. Efectivamente, tal como se ilustra en la Fig. 40, los canales formados tras la coexpresión de las subunidades Kv2.3+Kv2.1, así como el dímero Kv2.1-Kv2.3, fueron más sensibles al bloqueo inducido por  $Zn^{2+}$  (~30-40% de inhibición en la amplitud de las corrientes, obtenidas mediante pulsos a +20 mV) que los canales Kv2.1 (~12-15% de inhibición de las corrientes a +20 mV). Estos resultados nos permitieron concluir que las subunidades Kv2.3 y Kv2.1 formaban canales heterotetraméricos funcionales presentes en la bicapa lipídica. Además, el efecto de inhibición de las corrientes inducido por  $Zn^{2+}$  se utilizó en los experimentos de coexpresión con quimeras para detectar la formación de heterotetrámeros entre éstas y Kv2.1 (ver más adelante).

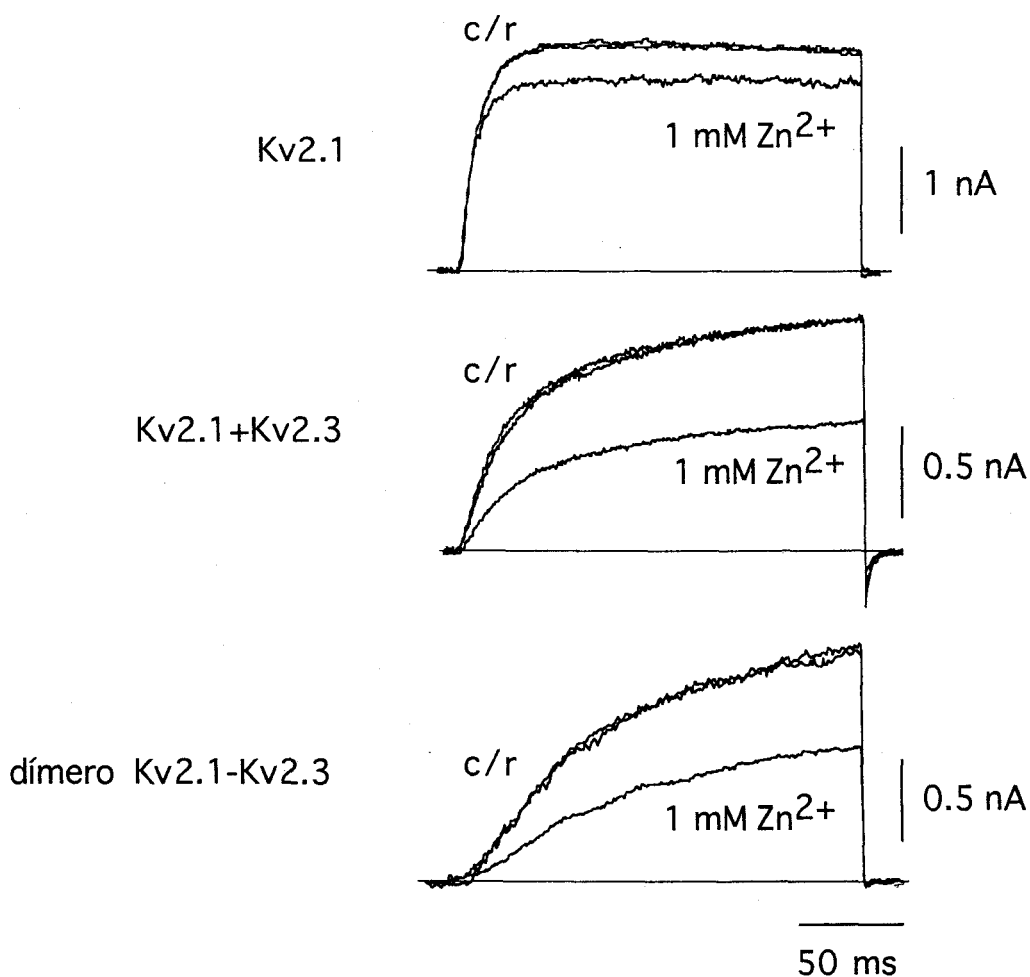


Fig. 40. Efecto de la aplicación de  $1 \text{ mM Zn}^{2+}$  sobre las corrientes de  $\text{K}^+$  registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1, cotransfectadas con Kv2.1+Kv2.3 ó transfectadas con el dímero Kv2.1-Kv2.3. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de voltaje (a  $+20 \text{ mV}$ ) desde un potencial de membrana de  $-80 \text{ mV}$  (base de tiempo en la figura). c/r = control/recuperación.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este apartado 1 indican que el papel funcional de la subunidad Kv2.3 no es el de constituir por sí misma canales funcionales sino el de regular selectivamente las características biofísicas de los canales miembros de la familia Kv2. Este mecanismo modulador parece basarse en la formación de canales heterotetraméricos constituidos mediante el coensamblaje selectivo entre las subunidades Kv2.1 y Kv2.3. Estos resultados sugieren la posibilidad de que, *in vivo*, Kv2.3 pueda actuar como una subunidad  $\alpha$  reguladora de canales de  $\text{K}^+$  dependientes del potencial de membrana.

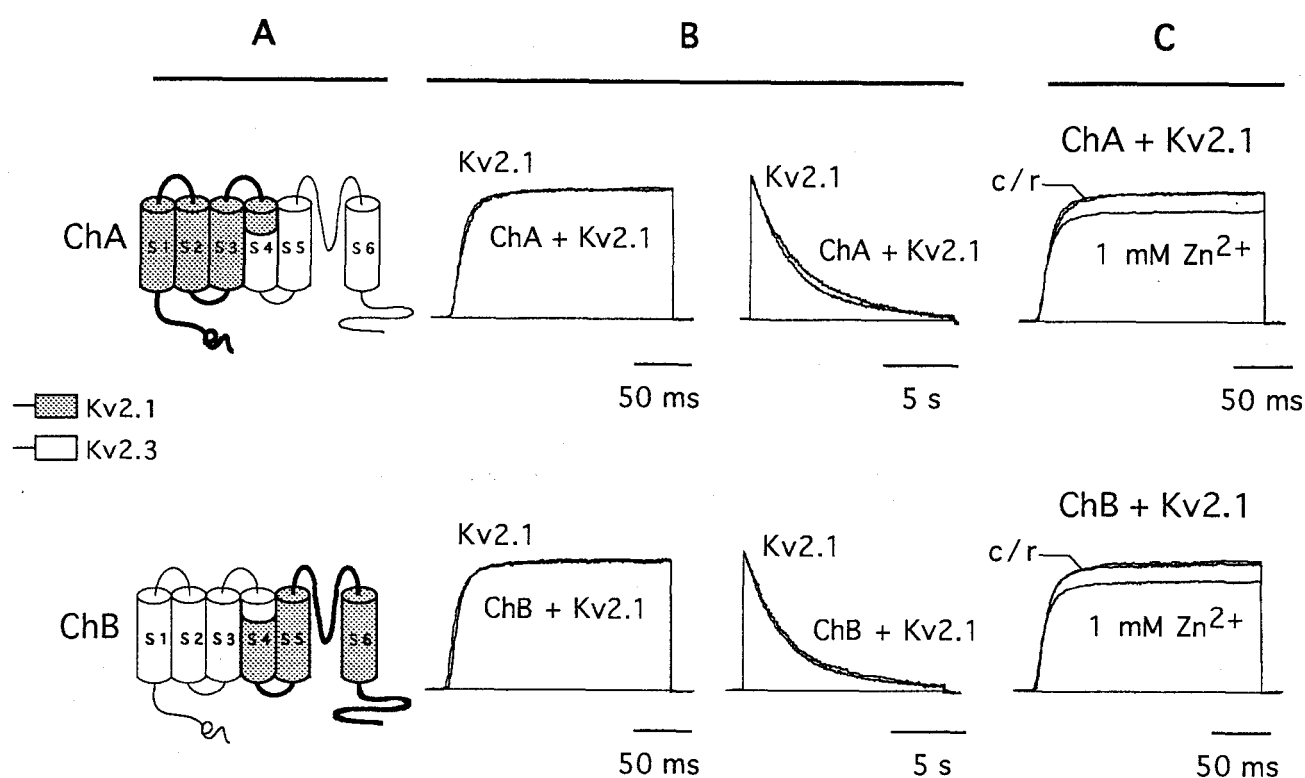
## 2. Identificación de los determinantes moleculares responsables de la acción reguladora ejercida por Kv2.3

Para identificar los determinantes moleculares responsables de la función reguladora inducida por Kv2.3 sobre Kv2.1 se construyeron varias proteínas quiméricas intercambiando diferentes regiones entre Kv2.1 y Kv2.3. Cada una de estas quimeras se coexpresó con Kv2.1 en células CHO con objeto de estudiar las características cinéticas de las corrientes de K<sup>+</sup> resultantes y compararlas con las obtenidas tras la expresión en solitario de Kv2.1. Los resultados obtenidos en dicho estudio se describen a continuación.

### 2.1. Estudio de las quimeras ChA y ChB

Como primer paso para la identificación de las regiones de Kv2.3 que determinan su acción reguladora se construyeron las quimeras ChA y ChB, en las que se intercambiaron cualquiera de las dos mitades de Kv2.1 con las de Kv2.3 (ver *Materiales y métodos*). La coexpresión de ChA+Kv2.1 dió lugar a corrientes de K<sup>+</sup> con cinéticas de activación e inactivación similares a las de Kv2.1 expresado en solitario (Fig. 41, B; ver tablas 2 y 3, páginas 99 y 100), indicando que ChA no contiene los dominios de Kv2.3 que le confieren su acción reguladora. Con objeto de examinar si las regiones de Kv2.3 eliminadas en ChA, y presentes en ChB, eran las responsables de la acción reguladora de Kv2.3, se estudiaron los efectos de la coexpresión de la quimera ChB+Kv2.1. Las cinéticas de las corrientes producto de esta coexpresión también fueron similares a las de Kv2.1 (Fig. 41, B; ver tablas 2, 3 y 4, páginas 99 a 101). La ausencia de acción moduladora de ChA y de ChB no parecía deberse a errores de transcripción o traducción de sus DNAs, ya que éstos dieron lugar, *in vitro*, a proteínas del tamaño esperado. Los efectos de la aplicación de 1 mM Zn<sup>2+</sup> sobre las corrientes registradas en células cotransfectadas ChA+Kv2.1 o ChB+Kv2.1 fueron similares a los observados en Kv2.1 (Fig. 41, C; ver tabla 5), indicando que las quimeras

ChA y ChB no son capaces de formar canales heteroméricos con Kv2.1. La falta de interacción entre Kv2.1 y las quimeras ChA y ChB posiblemente se debe a que las modificaciones introducidas en las quimeras afectan el reconocimiento y coensamblaje entre subunidades. Se ha sugerido que la interacción entre los extremos amino y carboxilo terminales de algunos canales de  $K^+$  determina la oligomerización (ver Jerng y Cobarrubias, 1997). Por tanto, es posible que las quimeras ChA y ChB no formen heterómeros con Kv2.1 debido a que en éstas sus dominios amino y carboxilo terminales pertenecen a subunidades diferentes.



**Fig. 41.** Comparación de las cinéticas de las corrientes de  $K^+$  registradas en células transfectadas con Kv2.1 ó en células cotransfectadas con ChA+Kv2.1 ó ChB+Kv2.1. (A) Esquema de las quimeras. (B) Curso temporal de la activación (columna izquierda) e inactivación (columna derecha) de las corrientes registradas. Los registros se muestran superpuestos y escalados para facilitar su comparación. (C). Inhibición reversible de las corrientes por la aplicación de 1 mM  $Zn^{2+}$  a la solución externa (c/r = control/recuperación). Todas las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV (ver base de tiempo en la figura).

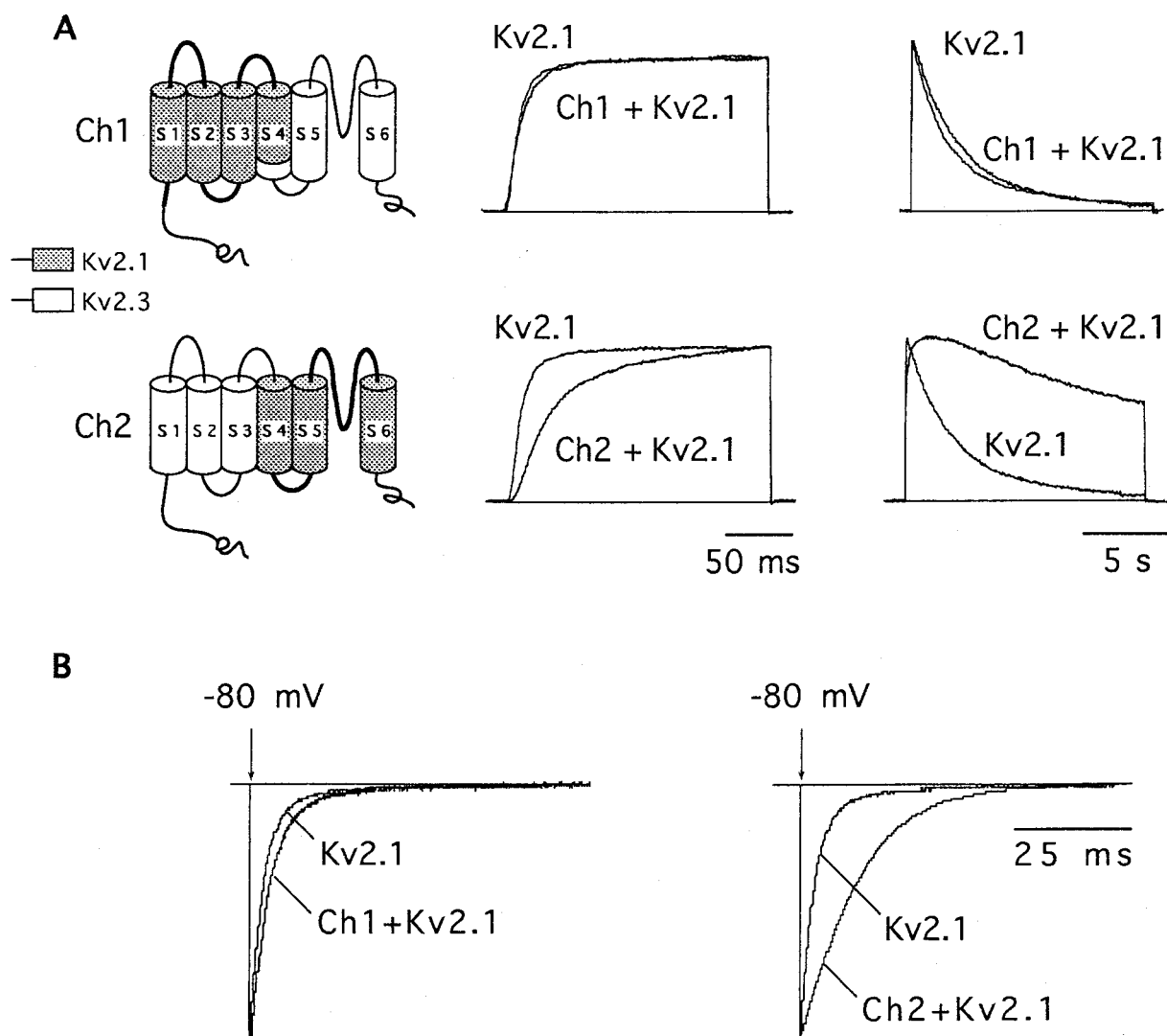


## 2.2. Estudio de las quimeras Ch1 y Ch2

Dado que el estudio de las quimeras ChA y ChB no permitió identificar las regiones de Kv2.3 responsables de su acción reguladora se construyeron otras proteínas quiméricas (Ch1 a Ch9) con extremos amino y carboxilo terminales de la misma subunidad (ver apartado *Materiales y métodos*). Cada una de estas subunidades quiméricas se coexpresó con Kv2.1 en células CHO para su estudio electrofisiológico.

La coexpresión Ch1+Kv2.1 dió lugar al registro de corrientes de K<sup>+</sup> con características cinéticas similares a las de las corrientes registradas cuando Kv2.1 se expresó en solitario (Fig. 42; ver tablas 2, 3 y 4), sugiriendo que en Ch1 se habían eliminado el dominio molecular de Kv2.3 que le confiere su acción reguladora. Por el contrario, las corrientes registradas en células cotransfectadas con Ch2+Kv2.1 tuvieron cinéticas de activación, inactivación y desactivación ~2-4 veces más lentas que las de Kv2.1, indicando que la quimera Ch2 contiene en su secuencia los dominios moleculares responsables de la acción reguladora de Kv2.3 (ver Fig. 42; tablas 2, 3 y 4).

En la Fig. 43 se muestran dos ejemplos representativos de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células CHO cotransfectadas con Ch1+Kv2.1 o con Ch2+Kv2.1. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje a +20 mV de amplitud, con una duración de 200 ms, desde un potencial de membrana de -80 mV. En ambos casos (Ch1+Kv2.1 y Ch2+Kv2.1), las corrientes registradas tuvieron una mayor sensibilidad al bloqueo inducido por la aplicación extracelular de 1mM Zn<sup>2+</sup> que las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1 (Fig. 43; ver tabla 5). Estas observaciones indican que las quimeras Ch1 y Ch2 son capaces de formar canales heterotetraméricos funcionales con la subunidad Kv2.1.



**Fig. 42.** Comparación del curso temporal de las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1 ó cotransfectadas con Ch1+Kv2.1 ó Ch2+Kv2.1. (A) Esquema de las quimeras (columna izquierda) y curso temporal de la activación (columna central) e inactivación (columna derecha) de las corrientes. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV (ver base de tiempo en la figura). (B) Comparación de las cinéticas de las corrientes de cierre a un potencial de membrana de -80 mV. Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar la comparación del curso temporal del cierre.

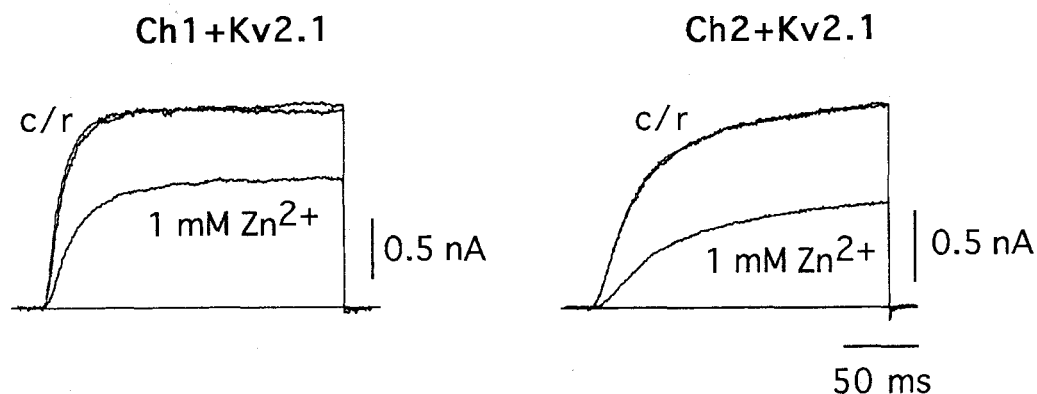
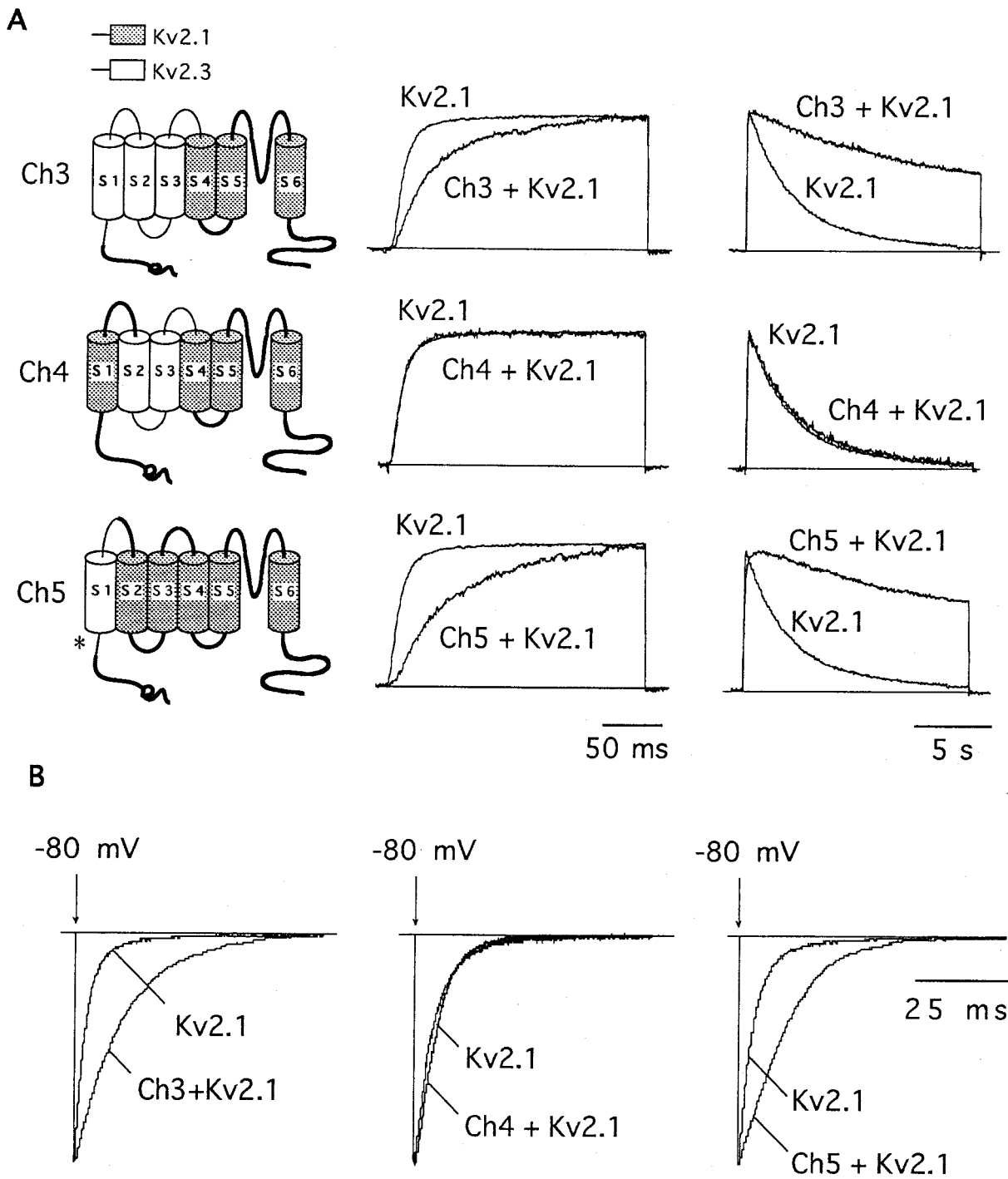


Fig. 43. Efecto reversible de la aplicación de 1 mM  $Zn^{2+}$  externo sobre las corrientes registradas en células cotransfectadas con Ch1+Kv2.1 o con Ch2+Kv2.1. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV (ver base de tiempo en la figura). c/r= control/recuperación.

### 2.3. Estudio de las quimeras Ch3, Ch4 y Ch5

Los resultados del estudio de la quimera Ch2 indicaban que ésta contenía la región de Kv2.3 que determina su acción moduladora. Para definir más precisamente esta región se estudió la quimera Ch3, en la que los aminoácidos 122-293 de Kv2.1 se sustituyeron por los aminoácidos 147-314 de Kv2.3 (ver *Materiales y métodos*). En células cotransfectadas con Ch3+Kv2.1 se registraron corrientes con cinéticas de activación, inactivación y cierre más lentas que las registradas en células transfectadas con Kv2.1 (Fig. 44). Estas corrientes fueron más sensibles a la inhibición por 1 mM  $Zn^{2+}$  que las corrientes de Kv2.1 (Fig. 45), indicando que Ch3 y Kv2.1 formaban canales heteroméricos. Por lo tanto, la localización del dominio responsable de la acción reguladora de Kv2.3 se delimitó a una región contenida en la secuencia de aminoácidos 147-314 de Kv2.3. Para definir con más precisión esta región se estudiaron las quimeras Ch4 y Ch5, derivadas de Ch3. Las corrientes registradas en células cotransfectadas con Ch4+Kv2.1 tuvieron cinéticas similares a las registradas en células transfectadas con Kv2.1 (Fig. 44; tablas 2, 3 y 4). Por el contrario, tras la coexpresión Ch5+Kv2.1 se registraron corrientes de  $K^+$  con cinéticas de activación, inactivación y cierre ~2-4 veces más lentas que las observadas tras la expresión de Kv2.1 (Fig. 44; tablas 2, 3 y 4).



**Fig. 44.** Comparación del curso temporal de las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1 o cotransfectadas con Ch3+Kv2.1, Ch4+Kv2.1 o Ch5+Kv2.1. (A) Esquema de las quimeras (columna izquierda) y curso temporal de la activación (columna central) e inactivación (columna derecha) de las corrientes. (B) Comparación de las cinéticas de las corrientes de cierre a un potencial de membrana de -80 mV. Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar la comparación del curso temporal de la desactivación.

Las corrientes macroscópicas de  $K^+$  registradas en células CHO cotransfectadas con Ch4+Kv2.1 o con Ch5+Kv2.1 tuvieron una mayor sensibilidad al bloqueo inducido por 1 mM  $Zn^{2+}$  que las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1 (ver Fig. 45). Es decir, las subunidades quiméricas Ch4 y Ch5 pueden interaccionar con Kv2.1 y formar canales de  $K^+$  heteromultiméricos. Los efectos moduladores inducidos por la quimera Ch5 sobre las características cinéticas de Kv2.1 fueron similares a los ejercidos por la subunidad reguladora Kv2.3, indicando que las estructuras moleculares de Kv2.3 presentes en la subunidad quimérica Ch5 contienen los aminoácidos responsables de la acción reguladora de Kv2.3.

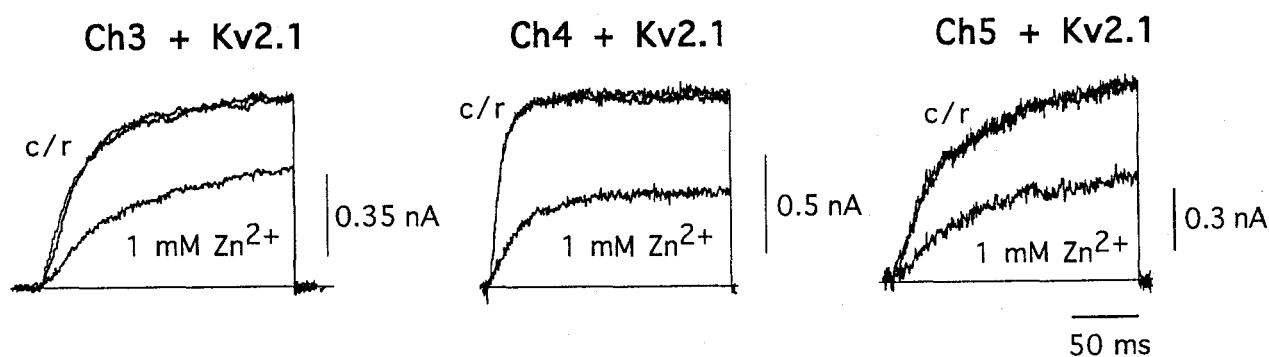


Fig. 45. Efecto reversible de la aplicación de 1 mM  $Zn^{2+}$  sobre las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1 o cotransfectadas con Ch3+Kv2.1, Ch4+Kv2.1 y Ch5+Kv2.1. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje despolarizantes a +20 mV de amplitud, desde un potencial de membrana de -80 mV (ver base de tiempo en la figura). c/r= control/recuperación.

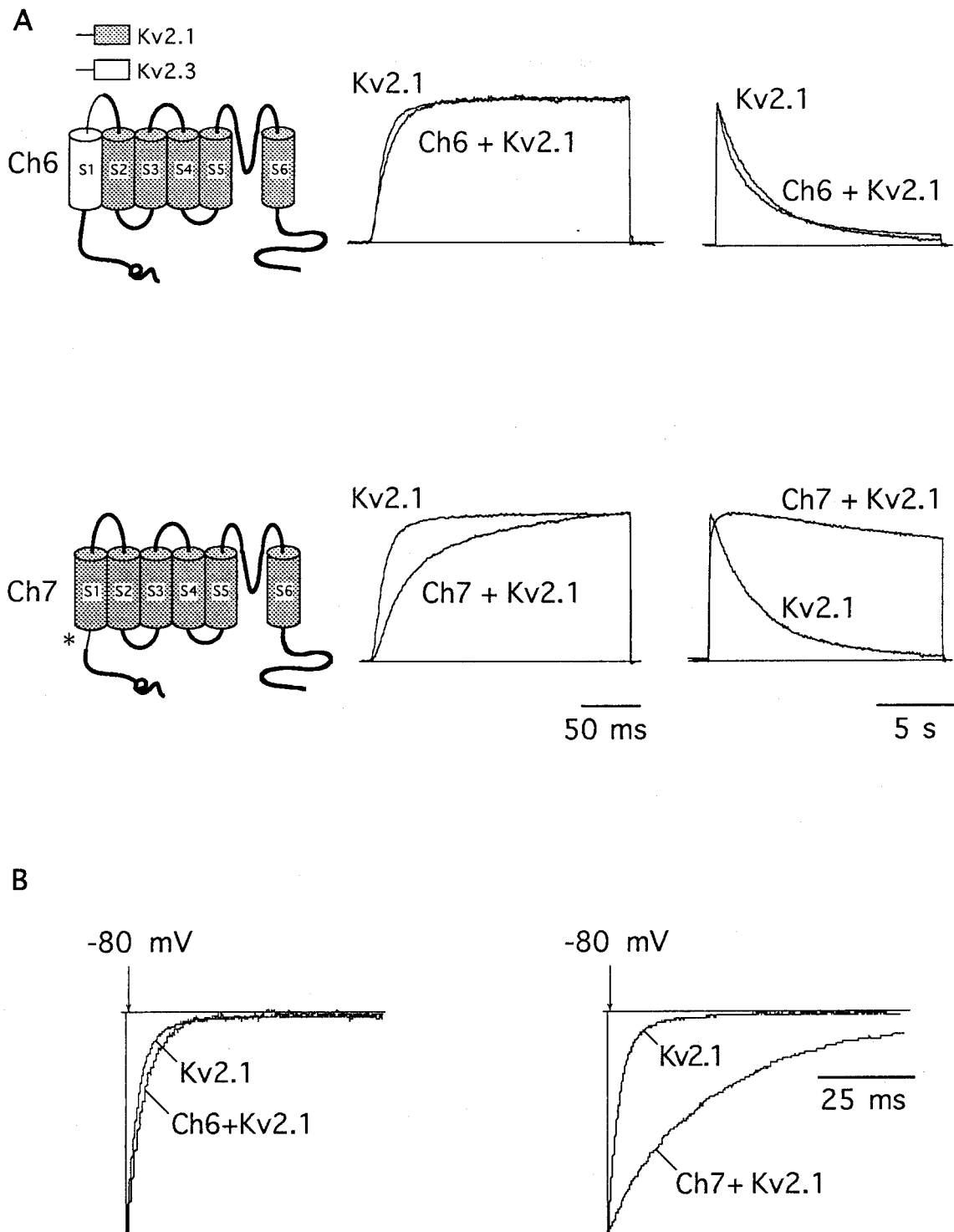
#### 2.4. Estudio de las quimeras Ch6 y Ch7.

Con objeto de determinar más precisamente los dominios moleculares que confieren a Kv2.3 su acción reguladora se estudiaron las quimeras Ch6 y Ch7. En la quimera Ch6, las regiones que corresponden a Kv2.3 comprenden desde el segmento S1 hasta la región inicial de lazo extracelular S1-S2, mientras que las regiones restantes corresponden a la subunidad Kv2.1 (ver esquema en Fig. 46). Como se ilustra en esta figura, tras la coexpresión de Ch6+Kv2.1, en células CHO, se registraron corrientes

macroscópicas de  $K^+$  con características cinéticas similares a las de Kv2.1. No obstante, las corrientes de Ch6+Kv2.1 tuvieron una mayor inhibición por 1 mM  $Zn^{2+}$  que las corrientes de Kv2.1 (Fig. 47), indicando que la quimera Ch6 formaba canales heteroméricos con Kv2.1. El estudio de la quimera Ch6 delimitó la región reguladora de la subunidad Kv2.3 a una zona de 59 aminoácidos, localizados en el extremo amino terminal. Para demostrar que dicha secuencia de aminoácidos era la responsable de los efectos moduladores inducidos por Kv2.3 se procedió a la construcción y estudio de la subunidad quimérica Ch7 (ver *Materiales y métodos*).

Las corrientes producto de la coexpresión de Ch7+Kv2.1 tuvieron cinéticas de activación, inactivación y cierre notablemente más lentas que las de las corrientes obtenidas en células expresando Kv2.1 (ver Fig. 46; tablas 2, 3 y 4). Estos resultados fueron similares a los obtenidos tras la coexpresión de Kv2.1 con Kv2.3 o con las quimeras Ch2, Ch3 ó Ch5 (cómparese los valores en tablas 2, 3 y 4). La cinética de las corrientes de cierre registradas tras la coexpresión Ch7+Kv2.1 fue ~13-15 veces más lenta que la de las corrientes obtenidas en células expresando Kv2.1 (ver tabla 4).

El efecto de inhibición por 1 mM  $Zn^{2+}$  sobre las corrientes producto de la coexpresión de Ch7+Kv2.1 fue similar al observado en células expresando Kv2.1 (Fig. 47; tabla 5). Este efecto era esperable, ya que Ch7 no contiene regiones de Kv2.3 que estén expuestas al medio extracelular y, por tanto, su estructura externa es igual a la de Kv2.1. No obstante, el efecto modulador que Ch7 induce sobre las cinéticas de Kv2.1, tal como se observó en la coexpresión de Kv2.1 con Kv2.3 o con las quimeras Ch1 a Ch6, indica que Ch7 y Kv2.1 pueden formar canales heteromultiméricos y que Ch7 contiene la estructura molecular que determinan la actividad reguladora de Kv2.3.



**Fig. 46.** Comparación del curso temporal de las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1, con Ch6+Kv2.1 o con Ch7+Kv2.1. (A) Esquema de las quimeras (columna izquierda) y curso temporal de la activación (columna central) e inactivación (columna derecha) de las corrientes. (B) Comparación de las cinéticas de las corrientes de cierre a un potencial de membrana de  $-80$  mV. Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar la comparación del curso temporal de la deactivación.

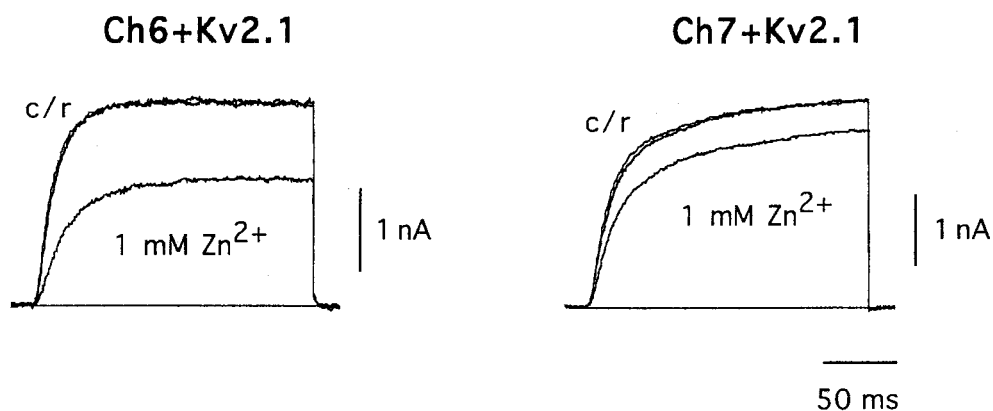
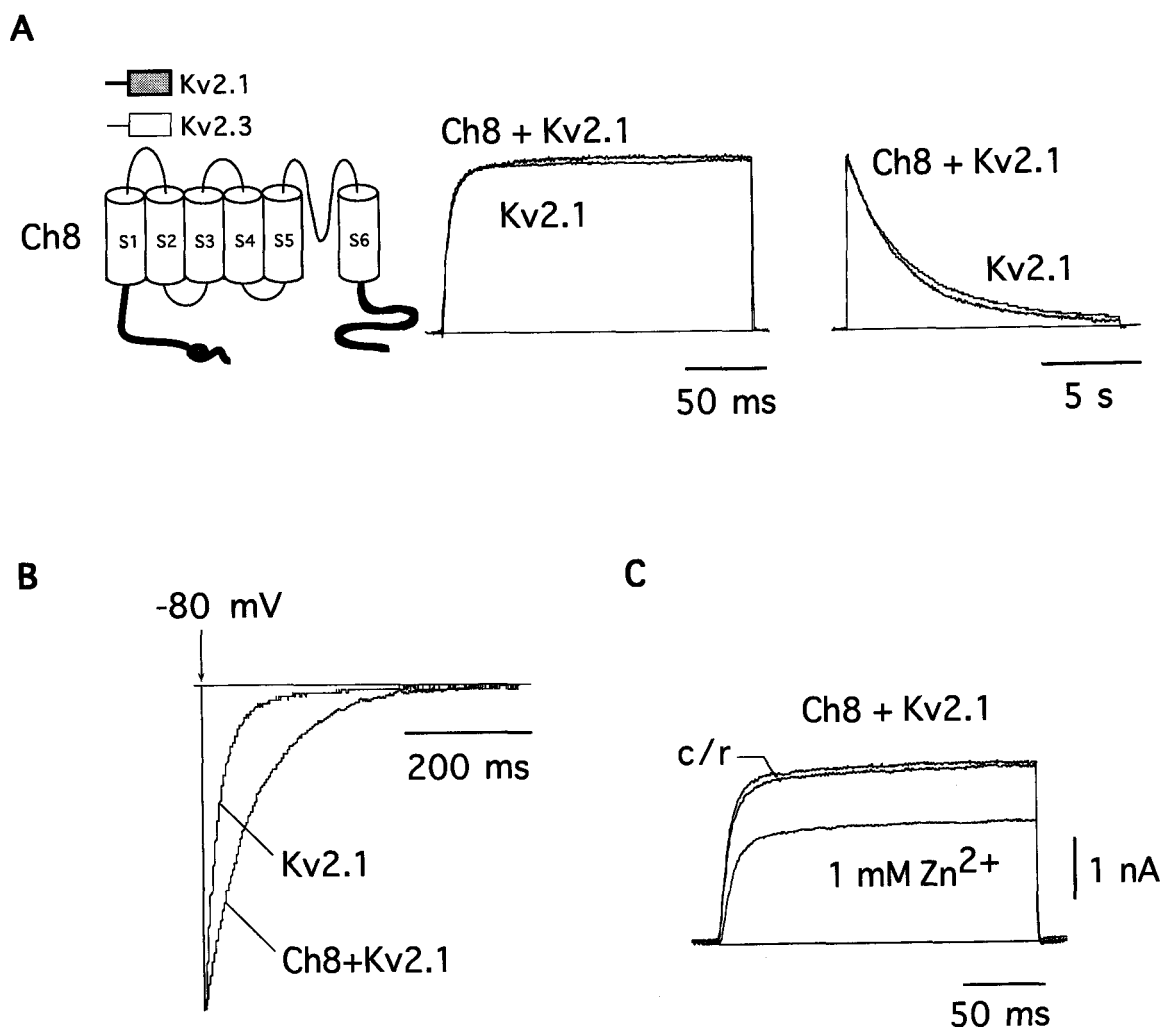


Fig. 47. Efecto reversible de la aplicación de 1 mM  $Zn^{2+}$  sobre las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO cotransfectadas con Ch6+Kv2.1 o con Ch7+Kv2.1. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de un pulso despolarizante a +20 mV (con una duración de 200 ms), desde un potencial de membrana de -80 mV. c/r = control/recuperación.

En resumen, los resultados obtenidos a partir de los estudios moleculares y electrofisiológicos realizados con las diferentes proteínas quiméricas indican que una región de 59 aminoácidos, localizados en el extremo amino terminal de la secuencia de Kv2.3 (y presente en las quimeras Ch2, Ch3, Ch5 y Ch7), es la responsable de la acción reguladora ejercida por dicha subunidad. Este dominio (asterísco en Ch7; Fig. 46, A), comprende desde el aminoácido 148 (cerca de la denominada caja B) hasta el aminoácido 206 (adyacente al segmento transmembrana S1). Esta región reguladora ha sido denominada NRD (N-terminal Regulatory Domain) en razón de su localización y de sus características funcionales. El papel funcional del dominio NRD en la actividad reguladora de Kv2.3 se vió corroborado tras el estudio de la quimera Ch8. Esta quimera contiene las regiones amino (incluyendo el dominio NRD) y carboxilo terminales de Kv2.1, mientras que el resto corresponde a Kv2.3 (Fig. 48). Las corrientes registradas en células cotransfectadas con Ch8+Kv2.1 tuvieron cinéticas de activación e inactivación similares a las de Kv2.1. Sin embargo, Ch8 produjo un ligero enlentecimiento de la cinética de cierre (Fig. 48, B). Los determinantes moleculares del proceso de cierre de los canales de  $K^+$  no se conocen con exactitud (ver *Introducción*). No obstante, es posible que la

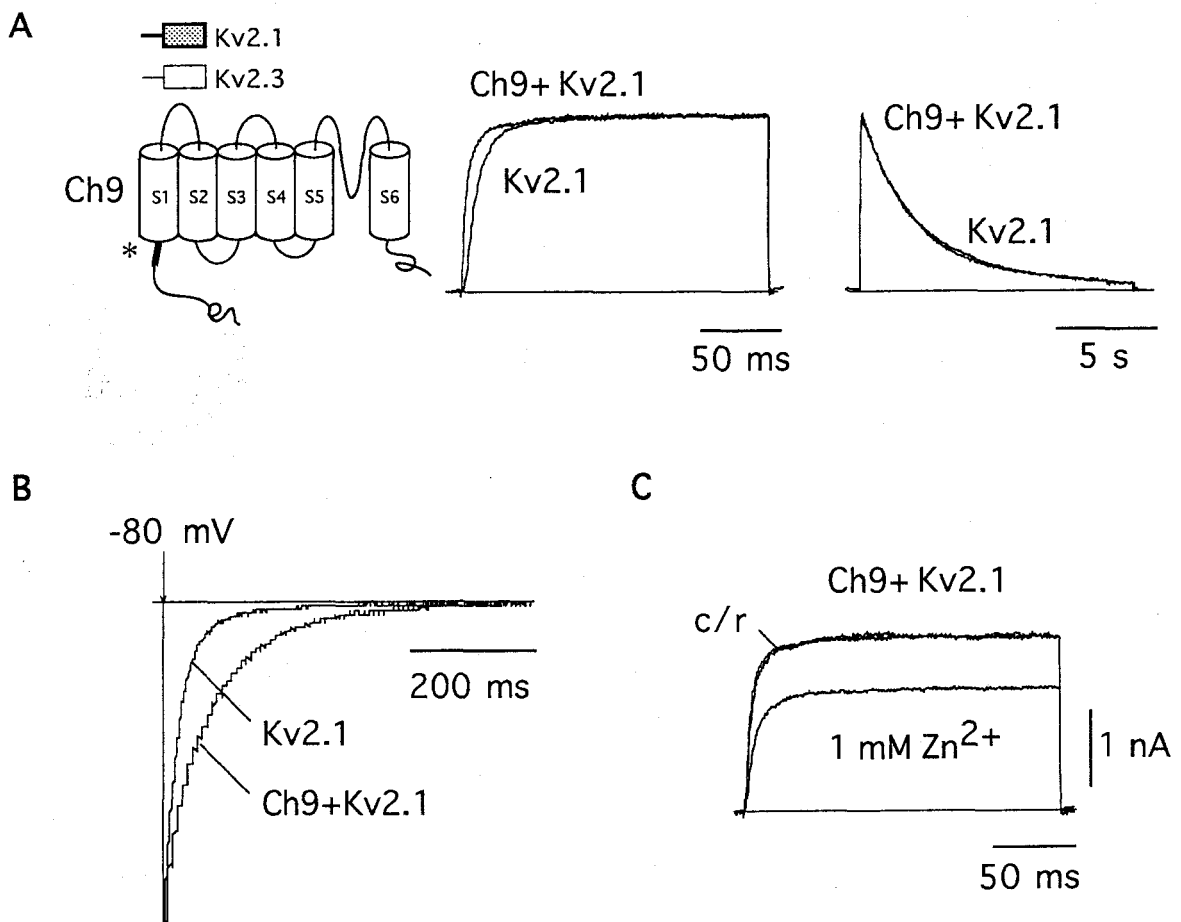


modificación simultánea de los extremos amino y carboxilo terminales alteren la función de los heterómeros de Kv2.1/Kv2.3 (ver Jerng y Covarrubias, 1997). Como era esperable, las corrientes producto de la coexpresión de Ch8+Kv2.1 fueron más sensibles a la inhibición por 1 mM  $Zn^{2+}$  que las registradas en células expresando Kv2.1, indicando que Ch8 y Kv2.1 forman heterotetrámeros (ver Fig. 48, C).



**Fig. 48.** Comparación del curso temporal de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1 o cotransfectadas con Ch8+Kv2.1. (A) Esquema de la quimera Ch8 (izquierda) y curso temporal de la activación (centro) e inactivación (derecha) de las corrientes. (B) Comparación de las cinéticas de las corrientes de cierre registradas a un potencial de membrana de -80 mV. Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar la comparación del curso temporal de la deactivación. (C) Efecto reversible de la aplicación de 1 mM  $Zn^{2+}$  externo sobre las corrientes registradas (c/r = control/recuperación).

En base a estos resultados postulamos que si, en efecto, la región NRD es necesaria y suficiente para la acción reguladora ejercida por Kv2.3 sobre Kv2.1, la sustitución exclusivamente del dominio NRD en Kv2.3 por la correspondiente región de Kv2.1 debería producir la pérdida de su función reguladora. Para comprobar esta posibilidad se estudió la subunidad quimérica Ch9, en la que la región NRD de la secuencia codificadora de Kv2.3 se sustituyó por la región equivalente de la subunidad Kv2.1 (asterísco en Fig. 49; A).



**Fig. 49.** Comparación del curso temporal de las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1 o cotransfectadas con Ch9+Kv2.1. (A) Esquema de la quimera Ch9 (izquierda) y curso temporal de la activación (centro) e inactivación (derecha) de las corrientes. (B) Comparación de las cinéticas de las corrientes de cierre registradas a un potencial de membrana de -80 mV. Las corrientes se muestran superpuestas y escaladas para facilitar la comparación del curso temporal del cierre. (C) Efecto reversible de la aplicación de 1 mM Zn<sup>2+</sup> externo sobre las corrientes (c/r = control/recuperación).

Las corrientes macroscópicas de  $K^+$  registradas en células cotransfectadas con Ch9+Kv2.1 tuvieron cinéticas de activación e inactivación similares a las obtenidas de células transfectadas con Kv2.1 (ver Fig. 49, A). Sin embargo, como se puede observar en la Fig. 49 (B), el curso temporal de las corrientes de cierre también se vió enlentecido respecto de lo observado en Kv2.1, tal como se observó en la coexpresión de Ch8+Kv2.1 (compárense Fig. 48 y Fig. 49; ver apartado *Discusión*). En ambos casos (Ch8+Kv2.1 y Ch9+Kv2.1), es posible que el efecto de enlentecimiento de la desactivación se deba a la modificación simultánea de los extremos amino y carboxilo terminales o a que el dominio NRD participa en la regulación del proceso de cierre mediante su interacción con una región receptora aún no identificada. Las corrientes obtenidas tras la coexpresión Ch9+Kv2.1 fueron más sensibles al bloqueo por 1 mM  $Zn^{2+}$  que las corrientes de Kv2.1 (ver Fig. 49, C), indicando que Ch9 y Kv2.1 forman canales heteroméricos. Los datos cuantitativos de los experimentos descritos en este apartado se resumen en las tablas 2 a 5 (páginas 99 a 102). En este trabajo no se hicieron estudios estadísticos debido a que las corrientes de  $K^+$  cuyo curso temporal fue lento siempre tuvieron diferencias muy claras y aparentes respecto de lo observado en Kv2.1, como se puede observar en los datos mostrados en las tablas 2 a 5 (páginas 99 a 102) y cualitativamente en las figuras de este apartado.

En resumen, los resultados descritos indican que la mayor parte de los determinantes estructurales responsables de la actividad reguladora de Kv2.3 subyacen en el dominio NRD. Nuestros datos indican que la región NRD participa principalmente en la modulación del curso temporal de la inactivación, aunque también puede inducir modificaciones significativas sobre la cinética de activación y posiblemente contribuya al proceso de cierre de los canales Kv2.1 mediante su interacción con un dominio molecular aún no identificado.

	tiempo de activación 20% a 80% (ms)		
	0 mV	+20 mV	+40 mV
Kv2.1	22 ± 6 (10)	13 ± 3 (10)	11 ± 2 (10)
Kv2.1 + Kv2.3	51 ± 9 (14)	21 ± 3 (10)	19 ± 3 (22)
dímeroKv2.1-Kv2.3	55 ± 6 (10)	25 ± 3 (10)	21 ± 3 (10)
Kv2.1 + ChA	21 ± 4 (8)	14 ± 2 (8)	12 ± 3 (8)
Kv2.1 + ChB	20 ± 4 (8)	12 ± 4 (8)	11 ± 4 (8)
Kv2.1 + Ch1	21 ± 6 (8)	13 ± 5 (8)	10 ± 3 (8)
Kv2.1 + Ch2	86 ± 6 (8)	43 ± 8 (8)	24 ± 4 (8)
Kv2.1 + Ch3	100 ± 13 (9)	58 ± 12 (9)	34 ± 9 (9)
Kv2.1 + Ch4	21 ± 5 (13)	12 ± 4 (13)	10 ± 3 (13)
Kv2.1 + Ch5	97 ± 8 (10)	78 ± 15 (11)	49 ± 14 (11)
Kv2.1 + Ch6	22 ± 4 (19)	12 ± 3 (15)	10 ± 2 (15)
Kv2.1 + Ch7	106 ± 9 (10)	42 ± 15 (6)	14 ± 3 (7)
Kv2.1 + Ch8	23 ± 3 (8)	14 ± 3 (8)	12 ± 2 (8)
Kv2.1 + Ch9	24 ± 4 (8)	15 ± 3 (8)	13 ± 2 (8)

**Tabla 2.** Comparación de los valores del tiempo de activación (20% a 80%), de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células transfectadas con Kv2.1, con el dímero Kv2.1-Kv2.3 o cotransfectadas con Kv2.1 y las quimeras ChA, ChB o Ch1 a Ch9. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. En la parte superior se indican los valores de los pulsos de voltaje utilizados para el registro de las corrientes (0 mV, +20 mV ó +40 mV, respectivamente, desde un potencial de membrana de -80 mV).

	<u>constante de tiempo de la inactivación (s)</u>
	+ 20 mV
Kv2.1	3 ± 1 (11)
Kv2.1 + Kv2.3	12 ± 3 (26)
dímero Kv2.1-Kv2.3	13 ± 3 (14)
Kv2.1 + ChA	3.3 ± 2 (6)
Kv2.1 + ChB	3.2 ± 3 (6)
Kv2.1 + Ch1	5 ± 1 (10)
Kv2.1 + Ch2	13 ± 3 (11)
Kv2.1 + Ch3	19 ± 1 (8)
Kv2.1 + Ch4	4 ± 1 (7)
Kv2.1 + Ch5	14 ± 3 (9)
Kv2.1 + Ch6	2 ± 1 (10)
Kv2.1 + Ch7	21 ± 10 (6)
Kv2.1 + Ch8	3.3 ± 3 (6)
Kv2.1 + Ch9	3 ± 1 (6)

**Tabla 3.** Comparación de los valores de la constante tiempo de la inactivación de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células transfectadas con Kv2.1, con el dímero Kv2.1-Kv2.3 o cotransfectadas con Kv2.1 y las quimeras ChA, ChB o Ch1 a Ch9. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. En la parte superior se indica el valor del pulso de voltaje (+20 mV) utilizado para el registro de las corrientes.

	constante de tiempo del cierre (ms)	
	-80 mV	-60 mV
Kv2.1	3 ± 1 (6)	5 ± 1 (6)
Kv2.1 + Kv2.3	13 ± 2 (9)	16 ± 3 (9)
dímero Kv2.1-Kv2.3	14 ± 3 (10)	18 ± 3 (10)
Kv2.1 + ChA	3 ± 1 (8)	5 ± 2 (8)
Kv2.1 + ChB	3 ± 2 (8)	4 ± 2 (8)
Kv2.1 + Ch1	3 ± 1 (4)	5 ± 1 (4)
Kv2.1 + Ch2	12 ± 1 (6)	23 ± 3 (6)
Kv2.1 + Ch3	12 ± 3 (6)	21 ± 6 (6)
Kv2.1 + Ch4	4 ± 1 (9)	6 ± 1 (9)
Kv2.1 + Ch5	19 ± 6 (9)	29 ± 8 (9)
Kv2.1 + Ch6	4 ± 1 (4)	6 ± 1 (4)
Kv2.1 + Ch7	47 ± 8 (5)	68 ± 6 (5)
Kv2.1 + Ch8	9 ± 2 (6)	15 ± 3 (6)
Kv2.1 + Ch9	8 ± 3 (6)	14 ± 3 (6)

Tabla 4. Comparación de los valores de la constante de tiempo de las corrientes de cierre registradas en células transfectadas con Kv2.1, con el dímero Kv2.1-Kv2.3 o cotransfectadas con Kv2.1 y las quimeras ChA, ChB o Ch1 a Ch9. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. En la parte superior se indican los valores de los pulsos de voltaje utilizados para el registro de las corrientes, registradas utilizando solución externa con 70 mM K<sup>+</sup>.

	% de inhibición de la amplitud de las corrientes (1 mM Zn <sup>2+</sup> )		
	0 mV	+20 mV	+ 40 mV
Kv2.1	21 ± 4 (7)	16 ± 4 (8)	13 ± 8 (9)
Kv2.1 + Kv2.3	40 ± 5 (9)	34 ± 4 (24)	29 ± 4 (28)
dímero Kv2.1-Kv2.3	46 ± 5 (10)	38 ± 4 (10)	29 ± 3 (10)
Kv2.1 + ChA	20 ± 4 (8)	14 ± 5 (8)	12 ± 6 (8)
Kv2.1 + ChB	23 ± 3 (8)	17 ± 4 (8)	13 ± 6 (8)
Kv2.1 + Ch1	39 ± 7 (5)	24 ± 4 (4)	20 ± 5 (4)
Kv2.1 + Ch2	66 ± 4 (4)	45 ± 1 (4)	33 ± 4 (4)
Kv2.1 + Ch3	50 ± 8 (5)	43 ± 6 (5)	38 ± 6 (5)
Kv2.1 + Ch4	56 ± 8 (5)	41 ± 9 (5)	30 ± 6 (5)
Kv2.1 + Ch5	66 ± 9 (9)	55 ± 8 (9)	42 ± 6 (9)
Kv2.1 + Ch6	42 ± 7 (5)	32 ± 6 (5)	26 ± 5 (5)
Kv2.1 + Ch7	15 ± 5 (4)	13 ± 3 (4)	11 ± 5 (4)
Kv2.1 + Ch8	40 ± 6 (8)	34 ± 5 (8)	25 ± 3 (8)
Kv2.1 + Ch9	37 ± 3 (7)	27 ± 3 (7)	21 ± 4 (7)

Tabla 5. Comparación del porcentaje de inhibición por 1 mM Zn<sup>2+</sup> extracelular, de las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1, con el dímero Kv2.1-Kv2.3 o cotransfectadas con Kv2.1 y las quimeras ChA, ChB o Ch1 a Ch9. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. En la parte superior se indican los valores del potencial de membrana (0 mV, +20 mV o +40 mV) para los que se estudió el efecto de inhibición por Zn<sup>2+</sup>.

### 3. Propiedades cinéticas de los canales homoméricos formados por quimeras Kv2.1/Kv2.3

Los estudios electrofisiológicos de Kv2.3 indicaron que esta subunidad no puede formar por sí misma canales homoméricos de K<sup>+</sup>. No obstante, la cotransfección de los DNAC de Kv2.3 (o de las quimeras Ch2, Ch3, Ch5 y Ch7,) con Kv2.1, dió lugar a la formación de canales heteroméricos con cinéticas de activación e inactivación más lentas que las de los canales Kv2.1. Ello nos llevo a postular que estas modificaciones funcionales también podrían ocurrir en los canales homoméricos formados por las proteínas quiméricas construídas. Con objeto de estudiar esta posibilidad se transfectaron células CHO con los DNAC de las subunidades quiméricas ChA, ChB y Ch1 a Ch9, para su análisis electrofisiológico. Tras la expresión en solitario de las quimeras ChA, ChB, Ch1, Ch2, Ch8 y Ch9 no se detectaron, en ningún caso, corrientes macroscópicas de K<sup>+</sup>. No obstante, a partir de sus DNAC se obtuvieron (*in vitro*) proteínas con los pesos moleculares esperados, sugiriendo que estas quimeras contenían modificaciones estructurales que les impedían incorporarse en la bicapa lipídica o que, aún estando en la bicapa lipídica, no eran capaces de formar canales conductores. Por el contrario, la expresión en solitario de las quimeras Ch3 a Ch7 dió lugar, en cada caso, al registro de corrientes de K<sup>+</sup> (ver figuras 50 y 51), indicando que estas quimeras contenían los dominios moleculares necesarios para la oligomerización y/o para la formación de canales conductores. En la Fig. 50 y 51 se compara el curso temporal de las corrientes registradas en células transfectadas con el DNAC de Kv2.1 o en células transfectadas con el DNAC de las quimeras Ch3 a Ch7. De acuerdo a lo esperado, sólo las quimeras que contenían en su secuencia el dominio regulador NRD de Kv2.3 (Ch3, Ch5 y Ch7), formaron canales homoméricos con cinéticas de activación, inactivación y cierre significativamente más lentas que las de los canales Kv2.1 (Fig. 50 y 51; ver tablas 6, 7 y 8, páginas



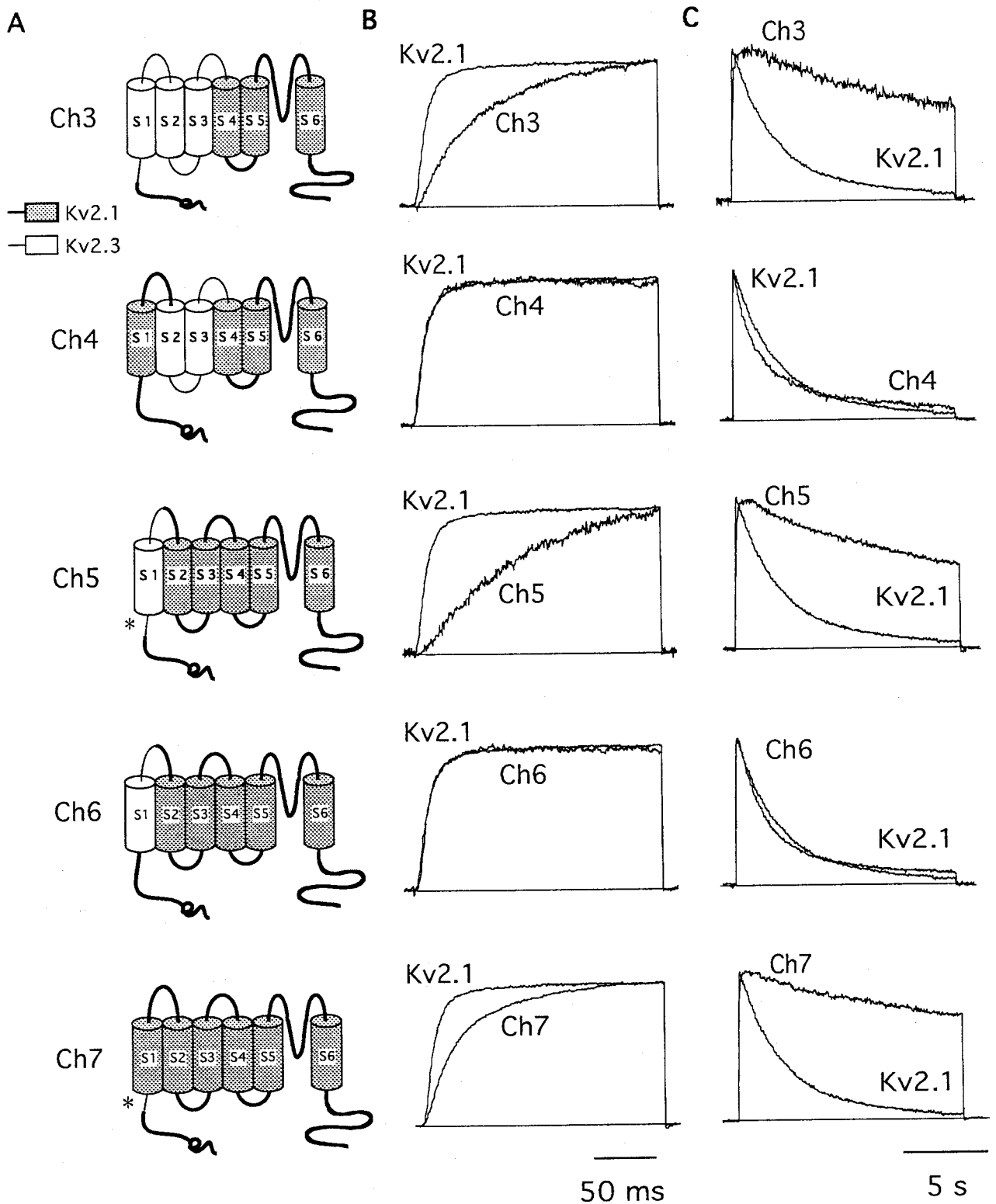
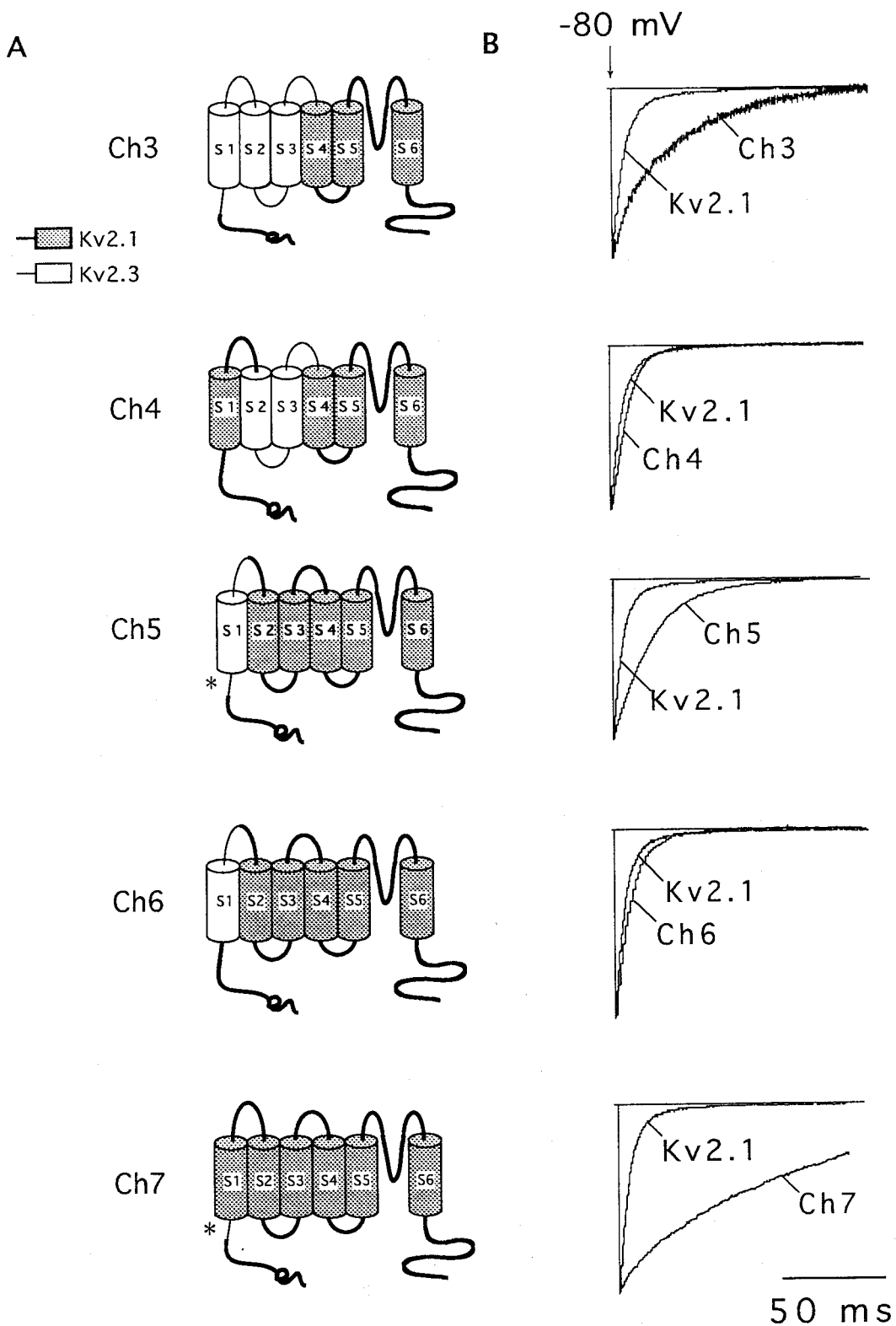


Fig. 50. Comparación del curso temporal de las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1 o con las quimeras Ch3 a Ch7. (A) Esquema de las quimeras. (B) Curso temporal de la activación. (C) Curso temporal de la inactivación. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV (ver base de tiempo en la figura). Los registros de corriente se muestran superpuestos y escalados para facilitar la comparación del curso temporal de la activación y la inactivación.

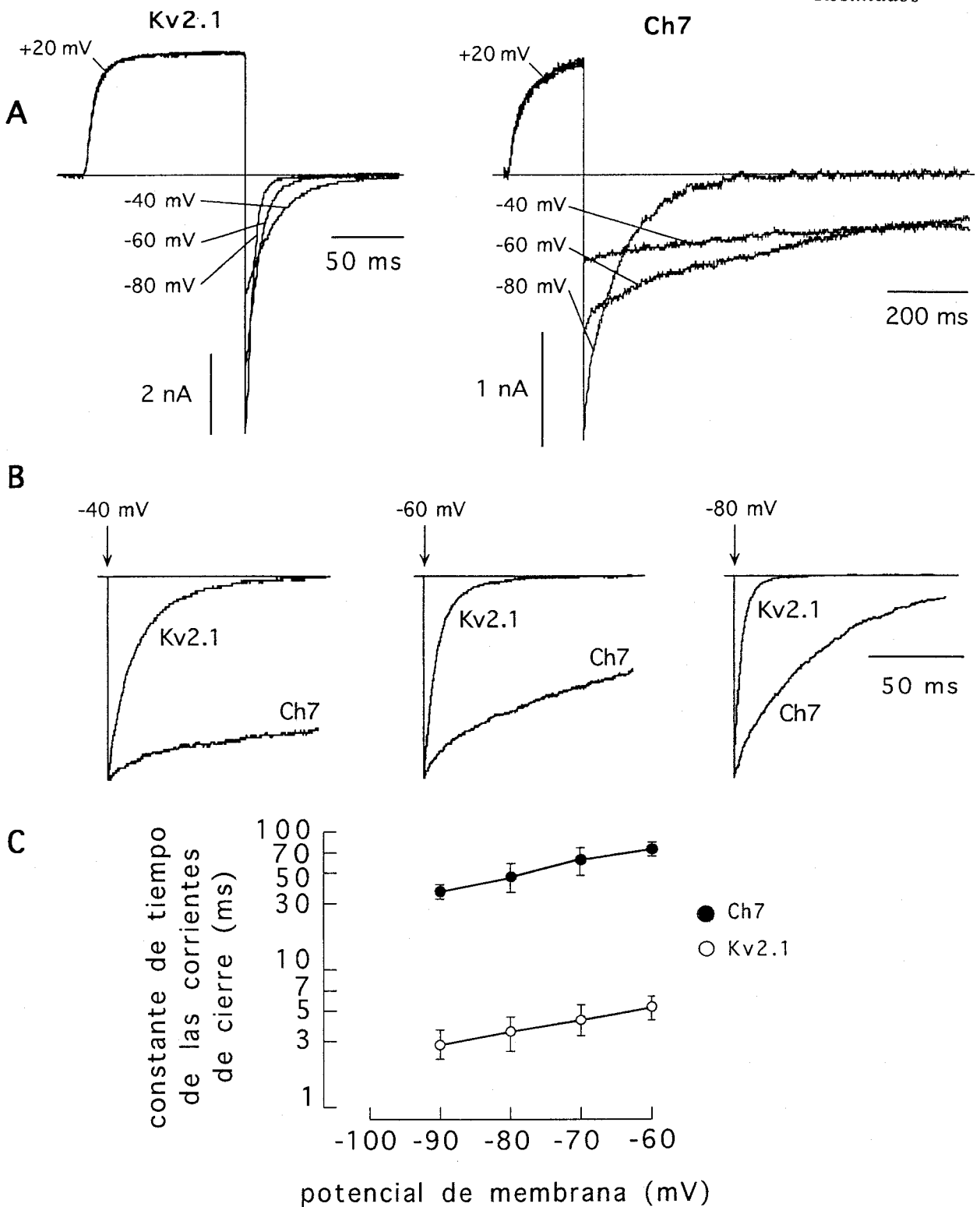
112 y 113). Estos resultados fueron similares a los obtenidos tras la coexpresión de dichas quimeras con Kv2.1 (ver Fig. 44 y Fig. 46). Por el contrario, tras la expresión en solitario de las quimeras Ch4 y Ch6 se detectaron corrientes macroscópicas de K<sup>+</sup> con características cinéticas similares a las de los canales homoméricos de Kv2.1 (Fig. 50 y Fig. 51; ver tablas 6, 7 y 8, páginas 112 y 113).

La expresión en solitario de la quimera Ch7 dió lugar a la formación de canales homoméricos de K<sup>+</sup> con una cinética de cierre considerablemente más lenta que la de los canales Kv2.1 (ver Fig. 52; tabla 8, página 113). Como se puede observar cualitativamente en el panel A de la Fig. 52, el curso temporal de las corrientes de cierre registradas en células transfectadas con la quimera Ch7 tuvo una notable dependencia del potencial de membrana. Este efecto se puede apreciar mejor en el panel B de la misma figura, en la que los registros de las corrientes de cierre se muestran superpuestos y escalados para facilitar la comparación de su curso temporal. Los resultados de estas observaciones se resumen cuantitativamente en el panel C de la Fig. 52, en la que se resumen los datos obtenidos en 6-12 experimentos diferentes.

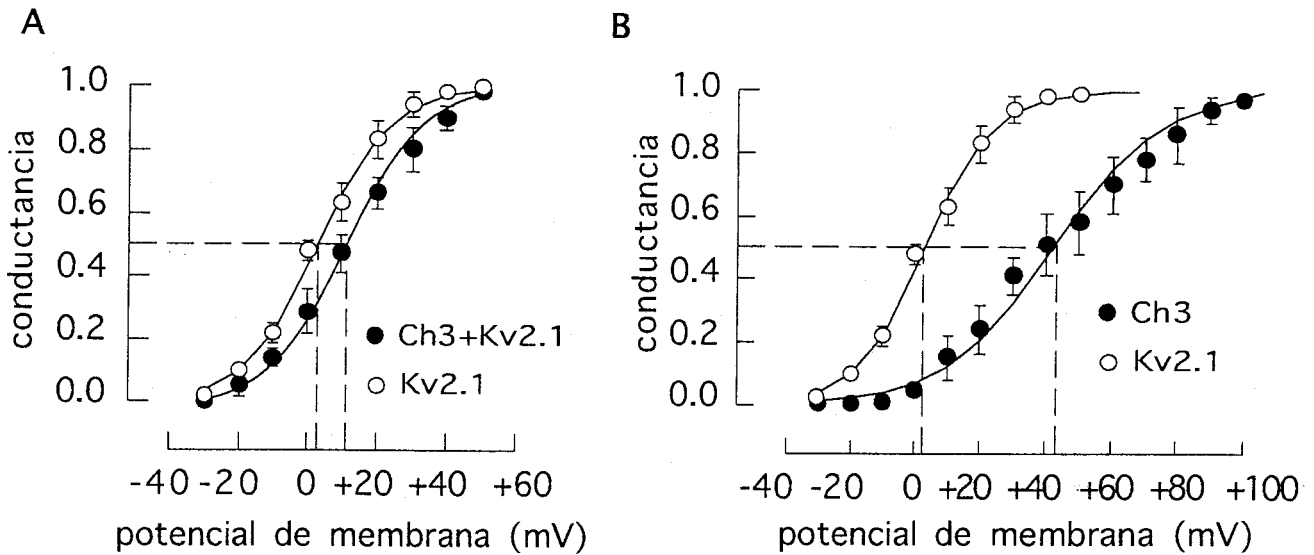
Las curvas G/V obtenidas tras la expresión de las quimeras Ch4, Ch5, Ch6 ó Ch7 fueron similares a la obtenida tras la expresión en solitario de Kv2.1 (datos no mostrados). Por el contrario, la curva G/V obtenida tras la expresión de la quimera Ch3 presentó un considerable desplazamiento (~40 mV) hacia potenciales de membrana más positivos, en comparación con lo observado en Kv2.1 (Fig. 53). El desplazamiento de la curva G/V obtenida tras la expresión de la quimera Ch3 no se observó cuando dicha quimera se coexpresó con Kv2.1, sugiriendo que cuando Ch3 y Kv2.1 son coexpresadas, la mayor proporción de canales formados corresponden a heterómeros Kv2.1/Ch3 y no a canales homoméricos.



**Fig. 51.** Comparación de la cinética de las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1 o con las quimeras Ch3 a Ch7. (A) Esquema de las quimeras. (B) Curso temporal de las corrientes de cierre. Las corrientes de cierre se obtuvieron utilizando una solución externa con 70 mM  $K^+$  y aplicando pulsos hiperpolarizantes de voltaje a -80 mV precedidos por un pulso a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV (ver base de tiempo en la figura; protocolos de pulso en *Materiales y métodos*). Los registros de corriente se muestran superpuestos y escalados para facilitar la comparación del curso temporal de la desactivación.



**Fig. 52.** Comparación del curso temporal de las corrientes registradas en células CHO transfectadas con el DNAc de Kv2.1 o de la quimera Ch7. (A) Corrientes de cierre obtenidas mediante pulsos de voltaje a  $-80$  mV,  $-60$  mV y  $-40$  mV, respectivamente, precedidos por un pulso a  $+20$  mV desde un potencial de membrana de  $-80$  mV (Nótese la diferencia en las bases de tiempo). (B) Comparación de las cinéticas de las corrientes de cierre. Los registros se muestran superpuestos y escalados para facilitar su comparación (las corrientes se obtuvieron utilizando una solución externa con  $70$  mM  $K^+$ ). (C) Representación de los valores de la constante de tiempo del cierre, en función del potencial de membrana, para Kv2.1 y Ch7. Los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 12 experimentos (Kv2.1) y 6 experimentos (Ch7), respectivamente (Nótese la escala logarítmica).



**Fig. 53.** (A) Curvas G/V obtenidas tras la expresión de Kv2.1 o tras la coexpresión Kv2.1+Ch3. (B) Curvas G/V obtenidas tras la expresión de Kv2.1 o de Ch3. Cada punto representa el valor de la media ( $\pm$  desviación estándar) de 5 experimentos diferentes. Las líneas discontinuas indican el valor de potencial de membrana requerido, en cada caso, para alcanzar el 50% de la conductancia total ( $V_{50}$ ).

Las corrientes registradas tras la expresión en solitario de las quimeras Ch3, Ch4, Ch5, ó Ch6, tuvieron una mayor inhibición por 1 mM  $Zn^{2+}$  que las corrientes registradas en células expresando canales Kv2.1 (Fig. 54; ver tabla 9, página 113). Por el contrario, y como cabría esperarse dado que la quimera Ch7 no contiene en su secuencia regiones de los lazos extracelulares de la subunidad Kv2.3, las corrientes registradas en células CHO transfectadas con el DNAC de la Ch7 tuvieron una inhibición por 1 mM  $Zn^{2+}$  similar a la observada en los canales Kv2.1 (Fig. 54; ver tabla 9, página 113). En resumen, sólo las quimeras que contenían en su secuencia el dominio NRD de Kv2.3 dieron lugar al registro de corrientes macroscópicas de  $K^+$  con un enlentecimiento significativo de sus cinéticas de activación, inactivación y cierre, en comparación con las cinéticas de las corrientes registradas en células expresando canales homoméricos de Kv2.1.

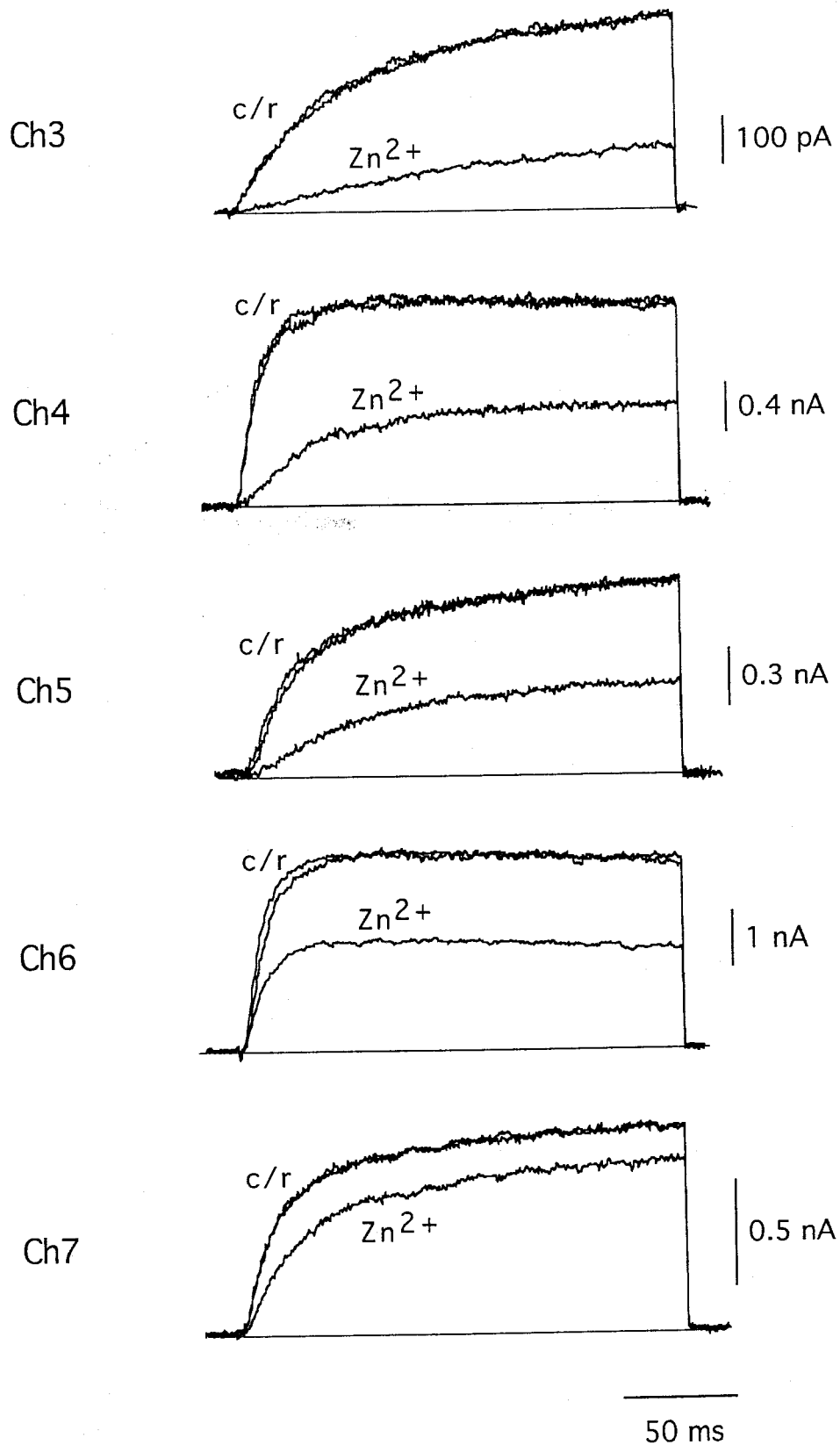


Fig. 54. Efecto reversible de la aplicación de 1 mM  $Zn^{2+}$  sobre las corrientes  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1 ó con las quimeras Ch3 a Ch7. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje (de 200 ms de duración) a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV (c/r= control/recuperación).

Los datos cuantitativos de los experimentos descritos en este apartado se resumen en las tablas 6 a 9 (páginas 112 y 113). Como ya se ha mencionado, no se hicieron estudios estadísticos de comparación entre las medias debido a que las corrientes de  $K^+$  cuyo curso temporal fue lento siempre tuvieron diferencias muy claras y aparentes respecto de lo observado en Kv2.1. En general, los resultados obtenidos son consistentes con los observados en los experimentos de coexpresión de las quimeras con Kv2.1 y corroboran la hipótesis de que la región NRD de Kv2.3 es la responsable del efecto regulador inducido por esta subunidad.

En resumen, todas estas observaciones indican que el dominio NRD es la estructura molecular responsable de las propiedades reguladoras ejercidas por la subunidad Kv2.3 y que, además, dicho dominio desempeña un papel de importancia fundamental en la modulación de las propiedades funcionales de los canales Kv2.1. En la Fig. 55, se muestra la secuencia de aminoácidos de las regiones amino terminales de las subunidades Kv2.3, Kv2.1 y Kv2.2. El dominio NRD de Kv2.3, indicado en la figura mediante una línea de trazo grueso, comprende desde el aminoácido 148 (ubicado cerca de la caja B) hasta el aminoácido 206 (adyacente al segmento transmembranario S1). Dado que los aminoácidos 197-206 presentes en la región NRD de la subunidad Kv2.3 están conservados en los tres tipos de canales, es muy probable que la región reguladora específica de Kv2.3 este comprendida en la secuencia de aminoácidos 148-196, la cual difiere significativamente de la secuencia de las subunidades Kv2.1 y Kv2.2. Mientras que la secuencia de aminoácidos 148-196 es casi idéntica en Kv2.1 y Kv2.2, su porcentaje de identidad respecto a Kv2.3 es menor del 20%.

Kv2.3	MDLSPRNRPLLDSSSS	[LDSGS]	[LTS]	[LDS]	[SVFCSEGE]	[EGEPL]	[ALGDCLTV]	[NVGG]	50
Kv2.1					[MTKHGSRST]	[SLPPEPME]	[VRSKACSRRV]	[RLNVGG]	35
Kv2.2	MAEKAPPG	[LNRKT]	[SRST]	[LSPPEPVD]	[IRSKITCSRRV]	[KIN]	[NVGG]	43	

**A**

Kv2.3	S	[RFVLSQQA]	[LSCFPH]	[TRLGKLA]	[VVVAS]	[YRRLGA]	[LAAAP]	[SPLELICDDA]	[NIPV]	100
Kv2.1	[LAHEV]	[LWRTLDR]	[LPRTLGLR]	.....	.....	[DCNTHD]	[SLLQV]	[CDDYSL]	[LE]	75
Kv2.2	[LNHEV]	[LWRTLDR]	[LPRTLGLR]	.....	.....	[DCNTHD]	[SLLQV]	[CDDYNLN]		83

**B**

Kv2.3	[DNEYFFDR]	[SSQAF]	[RYVLHY]	[YRTGR]	[LHVME]	[QLCALSF]	[LQEIQ]	[YWGIDE]	[LSI]	150
Kv2.1	[DNEYFFDR]	[HPGAFTS]	[ILNFYRTGR]	[LHMMEEM]	[CALSF]	[SQELD]	[YWGIDE]	[IYL]		125
Kv2.2	[ENEYFFDR]	[HPGAFTS]	[ILNFYRTGR]	[LHMMEEM]	[CALSF]	[GQELD]	[YWGIDE]	[IYL]		133

**NRD**

Kv2.3	[DSCCRDRY]	[FRRKEL]	[SL]	[ETLDFKKD]	[TDDQESQ]	[HESEQD]	[FSQGP]	[CPTV]	[RQKLW]	200
Kv2.1	[ESCQARY]	[HQKK]	...	[EQMNEEL]	[KREAET]	[LRE]	[REGEEF]	[DNTC]	[CAEKRKLW]	172
Kv2.2	[ESCQARY]	[HQKK]	...	[EQMNEEL]	[LREAET]	[MRD]	[GEGEEF]	[DNTC]	[CPEKRKLW]	180

**S1**

Kv2.3	[D]	[LLEKPG]	[SSITAA]	[RTFGV]	[TSTI]	[IFVAVS]	[IVNMA]	[LMS-A]	[ELSWL]	.....	[N]	[L]	242
Kv2.1	[DLLEKPN]	[SSVAAKIL]	[ATISIM]	[FIVLSTIALS]	[LNTLP]	[ELQSL]	[DEFGQS]	[TDN]					222
Kv2.2	[DLLEKPN]	[SSVAAKILA]	[IVSIL]	[FIVLSTIALS]	[LNTLP]	[ELQEN]	[DEFGQP]	[SDN]					230

Fig. 55. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del extremo amino terminal de las subunidades Kv2.3, Kv2.1 y Kv2.2. Se indican las posiciones de las cajas A y B, del denominado dominio regulador NRD así como del segmento transmembrana S1. Las regiones con secuencias idénticas se muestran en cajas cerradas.



	<b>tiempo de activación 20% a 80% (ms)</b>		
	<b>0 mV</b>	<b>+ 20 mV</b>	<b>+ 40 mV</b>
<b>Kv2.1</b>	22 ± 6 (10)	13 ± 3 (10)	11 ± 2 (10)
<b>Ch3</b>	98 ± 15 (5)	67 ± 10 (5)	61 ± 15 (6)
<b>Ch4</b>	21 ± 5 (14)	13 ± 3 (14)	10 ± 2 (14)
<b>Ch5</b>	110 ± 16 (11)	91 ± 14 (17)	68 ± 13 (17)
<b>Ch6</b>	22 ± 5 (16)	14 ± 3 (16)	12 ± 3 (16)
<b>Ch7</b>	110 ± 9 (7)	62 ± 11 (6)	18 ± 5 (5)

**Tabla 6.** Comparación de los valores del tiempo de activación (20% a 80%), de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células transfectadas con Kv2.1, o con las quimeras Ch3 a Ch7. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. En la parte superior se indican los valores de los pulsos de voltaje utilizados para el registro de las corrientes (0 mV, +20 mV ó +40 mV, respectivamente, desde un potencial de membrana de -80 mV). Con objeto de facilitar la comparación, los datos correspondientes a Kv2.1 que se muestran en esta tabla son los mismos que se mostraron en la tabla 2.

	<b>constante de tiempo de la inactivación (s)</b>
	<b>+ 20 mV</b>
<b>Kv2.1</b>	3 ± 1 (11)
<b>Ch3</b>	21 ± 3 (4)
<b>Ch4</b>	4 ± 1 (6)
<b>Ch5</b>	18 ± 7 (8)
<b>Ch6</b>	2 ± 0.4 (16)
<b>Ch7</b>	13 ± 3 (6)

**Tabla 7.** Comparación de los valores de la constante tiempo de la inactivación de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células transfectadas con Kv2.1 o con las quimeras Ch3 a Ch7. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. En la parte superior se indica el valor del pulso de voltaje (+20 mV) utilizado para el registro de las corrientes. Con objeto de facilitar la comparación, los datos correspondientes a Kv2.1 que se muestran en esta tabla son los mismos que se mostraron en la tabla 3.

	constante de tiempo del cierre (ms)	
	-80 mV	-60 mV
Kv2.1	3 ± 1 (6)	5 ± 1 (6)
Ch3	13 ± 2 (4)	28 ± 4 (3)
Ch4	4 ± 1 (9)	5 ± 1 (9)
Ch5	22 ± 7 (7)	36 ± 6 (6)
Ch6	4 ± 1 (6)	6 ± 1 (6)
Ch7	47 ± 11 (5)	74 ± 8 (4)

**Tabla 8.** Comparación de los valores de la constante de tiempo de las corrientes de cierre registradas en células transfectadas con Kv2.1 o con las quimeras Ch3 a Ch7. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. En la parte superior se indican los valores de los pulsos de voltaje utilizados para el registro de las corrientes, registradas utilizando solución externa con 70 mM K<sup>+</sup>. Con objeto de facilitar la comparación, los datos correspondientes a Kv2.1 que se muestran en esta tabla son los mismos que se mostraron en la tabla 4.

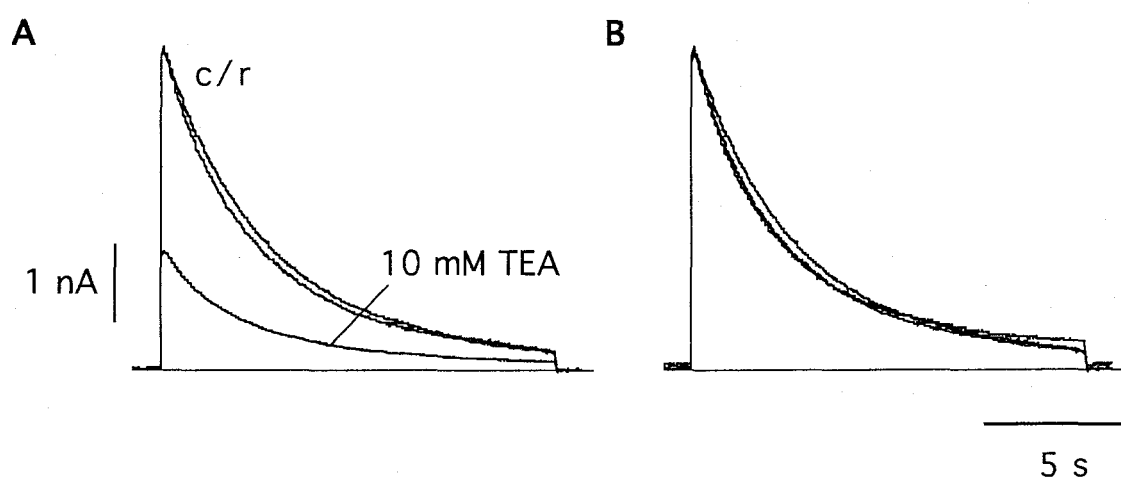
	% de inhibición de la amplitud de las corrientes (1 mM Zn <sup>2+</sup> )		
	0 mV	+ 20 mV	+ 40 mV
Kv2.1	21 ± 4 (7)	16 ± 4 (8)	13 ± 8 (9)
Ch3	88 ± 8 (4)	82 ± 8 (3)	59 ± 7 (3)
Ch4	65 ± 4 (8)	52 ± 7 (8)	37 ± 4 (8)
Ch5	72 ± 8 (10)	60 ± 6 (10)	50 ± 8 (10)
Ch6	63 ± 2 (4)	51 ± 4 (5)	44 ± 5 (5)
Ch7	14 ± 5 (4)	12 ± 4 (4)	10 ± 3 (4)

**Tabla 9.** Comparación del porcentaje de inhibición por 1 mM Zn<sup>2+</sup> extracelular, de las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1 o con las quimeras Ch3 a Ch7. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. En la parte superior se indican los valores del potencial de membrana (0 mV, +20 mV o +40 mV) para los que se estudió el efecto de inhibición por Zn<sup>2+</sup>. Con objeto de facilitar la comparación, los datos correspondientes a Kv2.1 que se muestran en esta tabla son los mismos que se mostraron en la tabla 5.

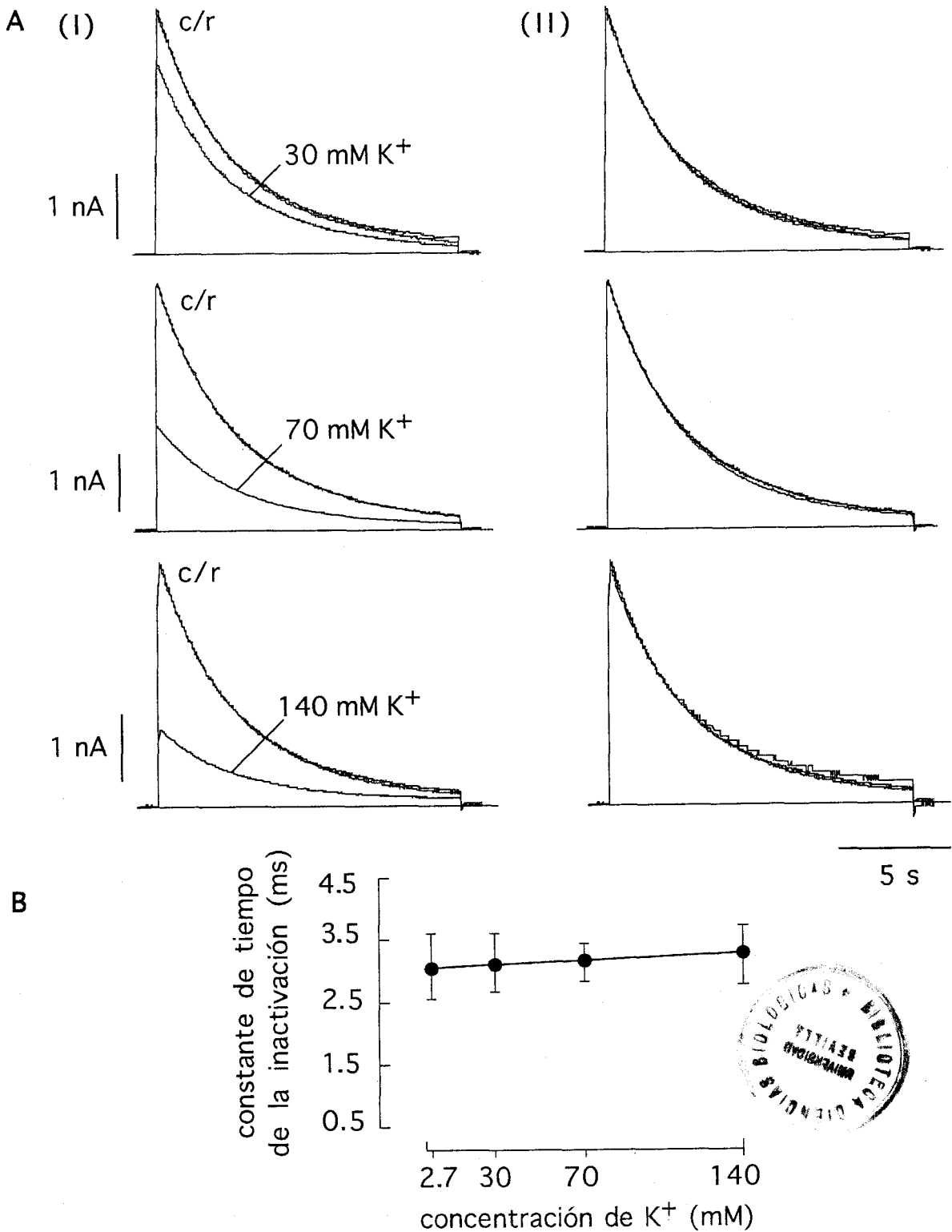
#### 4. Estudio del proceso de inactivación de los canales Kv2.1

Los resultados obtenidos del estudio de los canales homoméricos formados por quimeras Kv2.1/Kv2.3 demuestran que en los canales Kv2.1 las modificaciones en la secuencia equivalente al dominio NRD afectan a la inactivación, sugiriendo que este dominio podría interactuar con la compuerta de inactivación, o formar parte de ella. Los determinantes moleculares de la inactivación de Kv2.1 no se conocen con exactitud. Estos canales tienen un mecanismo de inactivación diferente del denominado tipo-N y más parecido al tipo-C o tipo-P (De Biasi et al., 1993b). Se ha descrito que aunque la inactivación de Kv2.1 es modulada por regiones de su extremo N-terminal, ésta no depende intrínsecamente de los dominios amino o carboxilo terminales (VanDongen et al., 1990). En base a estas observaciones, decidimos estudiar el proceso de inactivación de los canales Kv2.1 y su relación con los denominados mecanismos de inactivación tipo-N y tipo-C. Para ello se estudiaron los efectos de la aplicación extra o intracelular de TEA o de alto  $K^+$  externo sobre la inactivación. Como se mencionó en la *Introducción*, se sabe que la inactivación tipo-N y tipo-C pueden diferenciarse por su respuesta a los cationes externos y que la aplicación intra o extracelular de TEA o la aplicación de alto  $K^+$  externo producen efectos diferentes sobre estos dos tipos de inactivación (Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1991; López-Barneo et al., 1993). El TEA enlentece la inactivación tipo-N sólo si se aplica internamente, ya que los dominios responsables de dicho proceso se localizan a nivel intracelular. Aunque el TEA también puede enlentecer la inactivación tipo-C, este efecto sólo se observa cuando el catión se aplica extracelularmente, indicando que la inactivación tipo-C depende principalmente de regiones moleculares expuestas al medio externo. La aplicación de alto  $K^+$  externo no afecta a la cinética de inactivación tipo-N pero enlentece el curso temporal de la inactivación tipo-C, tal como ocurre con el TEA (Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1991; López-Barneo et al., 1993, Molina et al., 1997).

En la Fig. 56, se muestran registros representativos de las corrientes de  $K^+$  registradas en células transfectadas con el DNAc de Kv2.1. Las corrientes se registraron en presencia de solución externa control o solución externa con 10 mM TEA, que puede actuar como bloqueante de los canales de  $K^+$ . El TEA produjo una disminución reversible en la amplitud de las corrientes de  $\sim 60\%$  (Fig. 56, A). La comparación de estas corrientes, mediante el escalado de los registros, muestra que el TEA no afectó el curso temporal de la inactivación (ver Fig. 56, B). El valor promedio de la constante de inactivación de Kv2.1 (en segundos) fue de  $2.9 \pm 0.4$  ( $n=12$ ) en presencia de solución externa control y de  $2.9 \pm 0.3$  ( $n=8$ ) en presencia de 10 mM TEA externo. La aplicación de alto  $K^+$  externo también produjo una disminución en la amplitud de las corrientes, pero no afectó el curso temporal de la inactivación (Fig. 57). Los valores promedio de la constante de inactivación de Kv2.1 (en segundos) en presencia de 30 mM, 70 mM o 140 mM  $K^+$  externo fueron de  $3.0 \pm 0.4$  ( $n=6$ ),  $3.1 \pm 0.3$  ( $n=6$ ) y  $2.9 \pm 0.4$  ( $n=6$ ), respectivamente (tabla 10, página 124).



**Fig. 56.** Efecto reversible de la aplicación de TEA extracelular sobre la inactivación de las corrientes de  $K^+$  registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1. (A) Efecto del TEA (c/r= control/recuperación). (B) Comparación de la cinética de las corrientes. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje de 14 s de duración y 100 mV de amplitud, desde un potencial de membrana de -80 mV. Los trazos de corriente se muestran superpuestos y escalados para facilitar la comparación del curso temporal de la inactivación.



**Fig. 57.** Efecto reversible de la aplicación de diferentes concentraciones de K<sup>+</sup> externo sobre la inactivación de las corrientes registradas en células CHO transfectadas con Kv2.1. **A:** (I) Efecto del K<sup>+</sup> extracelular (c/r= control/recuperación). (II) Comparación de la cinética de las corrientes. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje de 14 s de duración y 100 mV de amplitud, desde un potencial de membrana de -80 mV. Los trazos de corriente se muestran superpuestos y escalados para facilitar la comparación del curso temporal de la inactivación. **B:** Representación de los valores del curso temporal de la inactivación en función de la concentración de K<sup>+</sup> extracelular (los valores se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de 6 experimentos diferentes).

La ausencia de enlentecimiento de la inactivación tras la aplicación de TEA o de alto  $K^+$  externo sugiere que los canales  $Kv2.1$  tienen un proceso de inactivación diferente del denominado tipo-C. Como control experimental se estudió el efecto de la aplicación extracelular de 30 mM TEA (que produce ~50% de inhibición en la amplitud de la corriente) o de 70 mM  $K^+$  sobre la inactivación de los canales *Shaker B*  $\Delta 6-46$ . Estos canales carecen del péptido inactivante responsable de la inactivación tipo-N y, por tanto, tienen exclusivamente inactivación tipo-C.

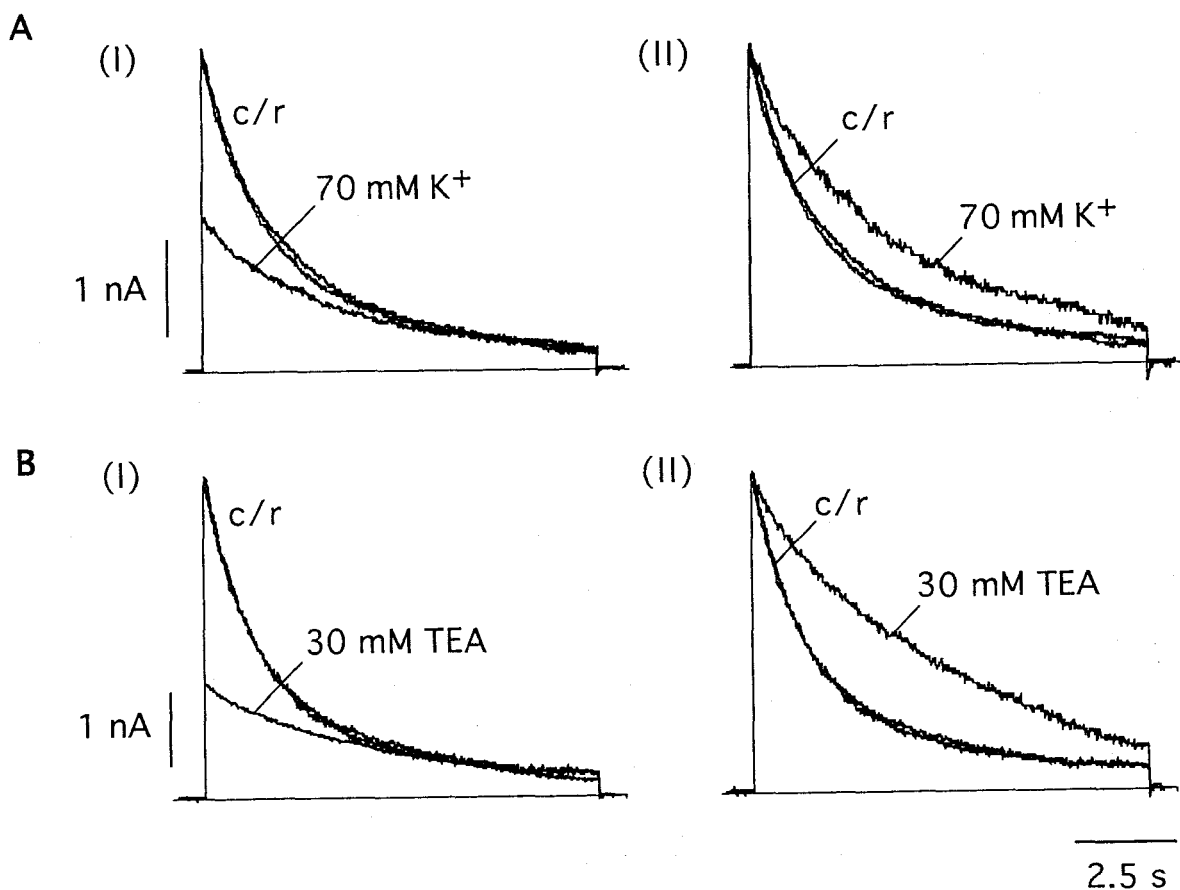


Fig. 58. Corrientes obtenidas en células transfectadas con *Shaker B*  $\Delta 6-46$  y registradas en presencia de TEA o de  $K^+$  externo. A: (I) Efecto reversible de la aplicación de 70 mM  $K^+$  externo. (II) Comparación de la cinética de las corrientes. B: (I) Efecto reversible de la aplicación de 30 mM TEA externo. Las corrientes se obtuvieron mediante pulsos de voltaje de 14 s de duración y 100 mV de amplitud, desde un potencial de membrana de -80 mV. (II) Comparación de la cinética de las corrientes. Los trazos de corriente se muestran superpuestos y escalados para facilitar la comparación del curso temporal de la inactivación. (c/r= control/recuperación).

En concordancia con lo previamente descrito para los canales *Shaker* B  $\Delta$ 6-46 (ver López-Barneo et al., 1993; Molina et al., 1997), la aplicación extracelular de 70 mM  $K^+$  produjo una disminución en la amplitud de las corrientes y un enlentecimiento de la cinética de inactivación (Fig. 58; ver tabla 10 página 124). El TEA externo también disminuyó de manera reversible la amplitud de la corriente, en ~50%, y produjo un enlentecimiento en la cinética de inactivación (Fig. 58; tabla 10; ver Choi et al., 1991). Por tanto, como se había descrito para los canales expresados en ovocitos, los canales *Shaker* B  $\Delta$ 6-46 expresados en células CHO tienen una inactivación tipo-C que es modulada por cationes externos.

Si los canales Kv2.1 no tienen el mecanismo de inactivación descrito como tipo-C (ya que su curso temporal no puede ser modulado por TEA o por  $K^+$  extracelular), es posible que la inactivación de Kv2.1 no dependa de dominios moleculares localizados a nivel extracelular sino que dependa de regiones intracelulares con las que el TEA interno pueda interactuar (tal como sucede en canales con la denominada inactivación tipo-N). Para estudiar esta posibilidad se examinaron los efectos de la aplicación intracelular de TEA sobre la cinética de inactivación de los canales Kv2.1. En la Fig. 59, se representan las corrientes de  $K^+$  registradas en dos células CHO diferentes, una dializada con solución interna control (Fig. 59, A) y otra dializada con solución interna que contiene 6 mM TEA (Fig. 59, B). Al comparar el curso temporal de las corrientes obtenidas en cada caso se puede observar que el TEA intracelular produce un enlentecimiento significativo de la cinética de inactivación (ver Fig. 59, C). El curso temporal de la inactivación de las corrientes registradas en presencia de 6 mM TEA interno fue ~4-5 veces más lento que el de las corrientes registradas en células dializadas con solución interna control (compárense los valores en la tabla 10, página 124).

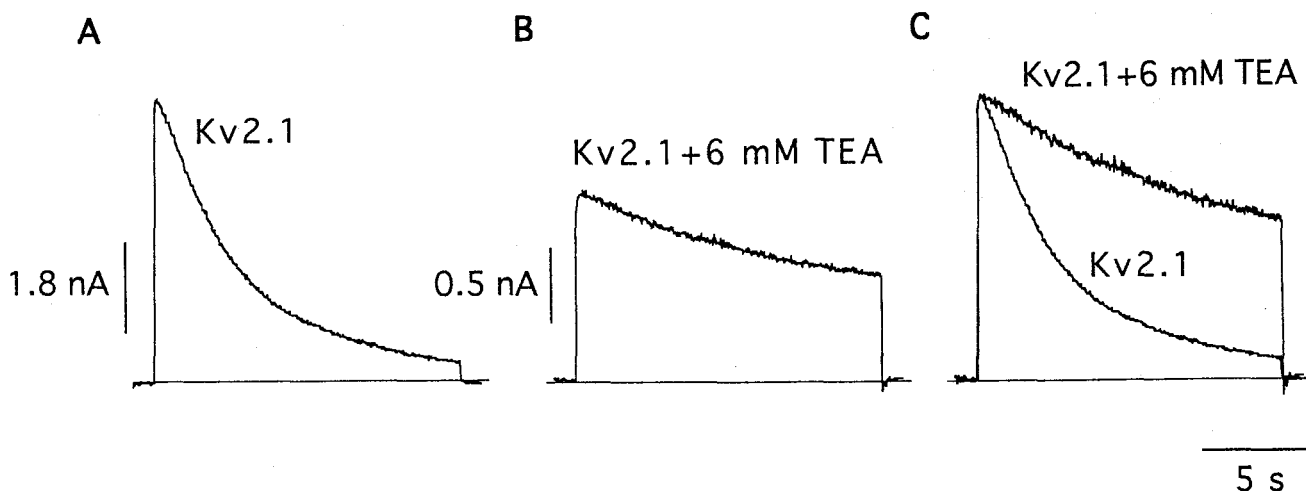
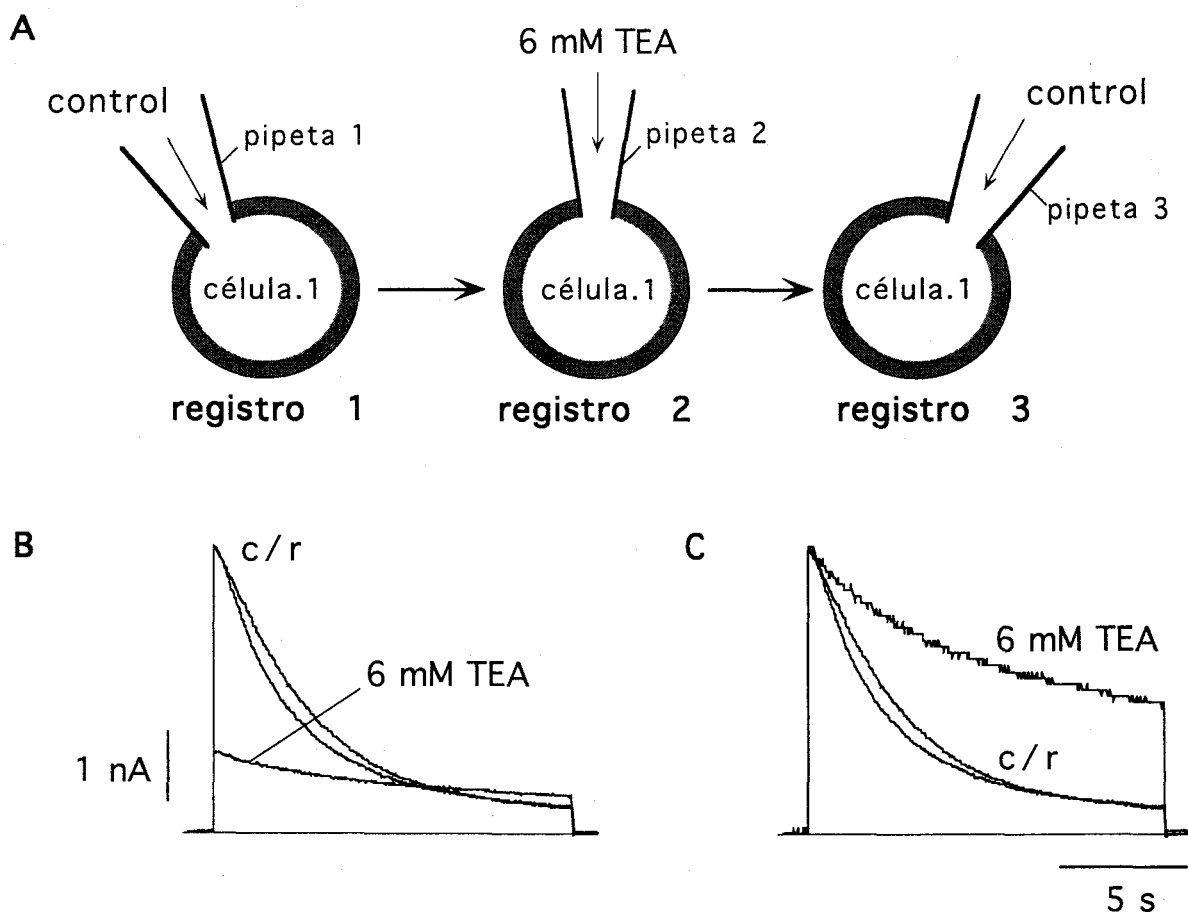


Fig. 59. Inactivación de las corrientes de  $K^+$  obtenidas en células CHO diferentes, transfectadas con Kv2.1 y registradas utilizando solución interna control ó solución interna con TEA. (A) Curso temporal de las corrientes registradas utilizando solución interna control. (B) Curso temporal de las corrientes registradas utilizando solución interna con 6 mM TEA. Las corrientes se obtuvieron aplicando pulsos de voltaje a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV (ver base de tiempo en la figura). (C) Comparación de la cinética de las corrientes. Los trazos de corriente se muestran superpuestos y escalados para facilitar la comparación del curso temporal de la inactivación. (c/r= control/recuperación).

Con objeto de estudiar en una misma célula el efecto del TEA intracelular sobre la inactivación de Kv2.1, se seleccionó una de las células transfectadas con Kv2.1 y se realizaron en ella 3 tipos de registros diferentes. El primer registro se obtuvo tras dializar la célula con solución interna control (ver Fig. 60, A). Para obtener el segundo registro se retiró muy lentamente la primera micropipeta y se utilizó una nueva pero con solución interna que contiene 6 mM TEA (Fig. 60, A). Finalmente, el tercer registro se obtuvo dializando la célula utilizando otra micropipeta que contenía, de nuevo, solución interna control (Fig. 60, A). Como se puede apreciar en la Fig. 60 (B), el TEA produjo una disminución de ~75% en la amplitud de las corrientes registradas. Las corrientes, recuperaron sus cinéticas y sus valores de amplitud iniciales cuando se retiró la micropipeta con TEA y se utilizó una nueva pipeta con solución interna



control. Al comparar las cinéticas de las corrientes obtenidas en estos registros encontramos que el TEA produjo un enlentecimiento de ~4-5 veces en la cinética de inactivación de los canales Kv2.1 (Fig. 60, C; ver tabla 10, página 124). Estos resultados, son similares a los observados cuando se registraron células diferentes utilizando, en cada caso, solución interna control o solución interna con TEA (ver tabla 10).



**Fig. 60.** (A) Esquema del protocolo utilizado para estudiar, en una misma célula, el efecto del TEA interno. (B) Corrientes obtenidas en un misma célula transfectada con Kv2.1 y registrada utilizando solución interna control ó solución interna con TEA. Las corrientes se obtuvieron mediante pulsos de voltaje a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV. (C) Comparación de la cinética de las corrientes; c/r= control/recuperación.

Como control, se realizaron experimentos aplicando TEA intracelular en células CHO transfectadas con la subunidad *Shaker B Δ6-46* (que carece de inactivación tipo-N). En la Fig. 61, se muestra un ejemplo representativo de las corrientes macroscópicas de K<sup>+</sup> registradas en una misma célula,

siguiendo el procedimiento ilustrado en la Fig. 60 (A). En concordancia con lo previamente descrito, el TEA inhibió en ~65% la amplitud de las corrientes pero no produjo un efecto de enlentecimiento del curso temporal de la inactivación de los canales *Shaker B*  $\Delta 6-46$  (Fig. 61; ver tabla 10, página 124).

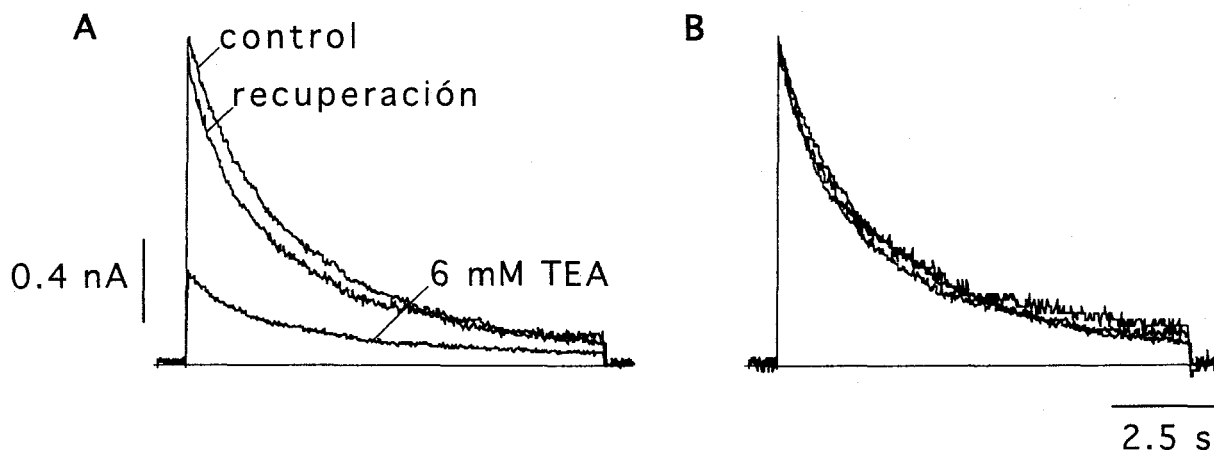
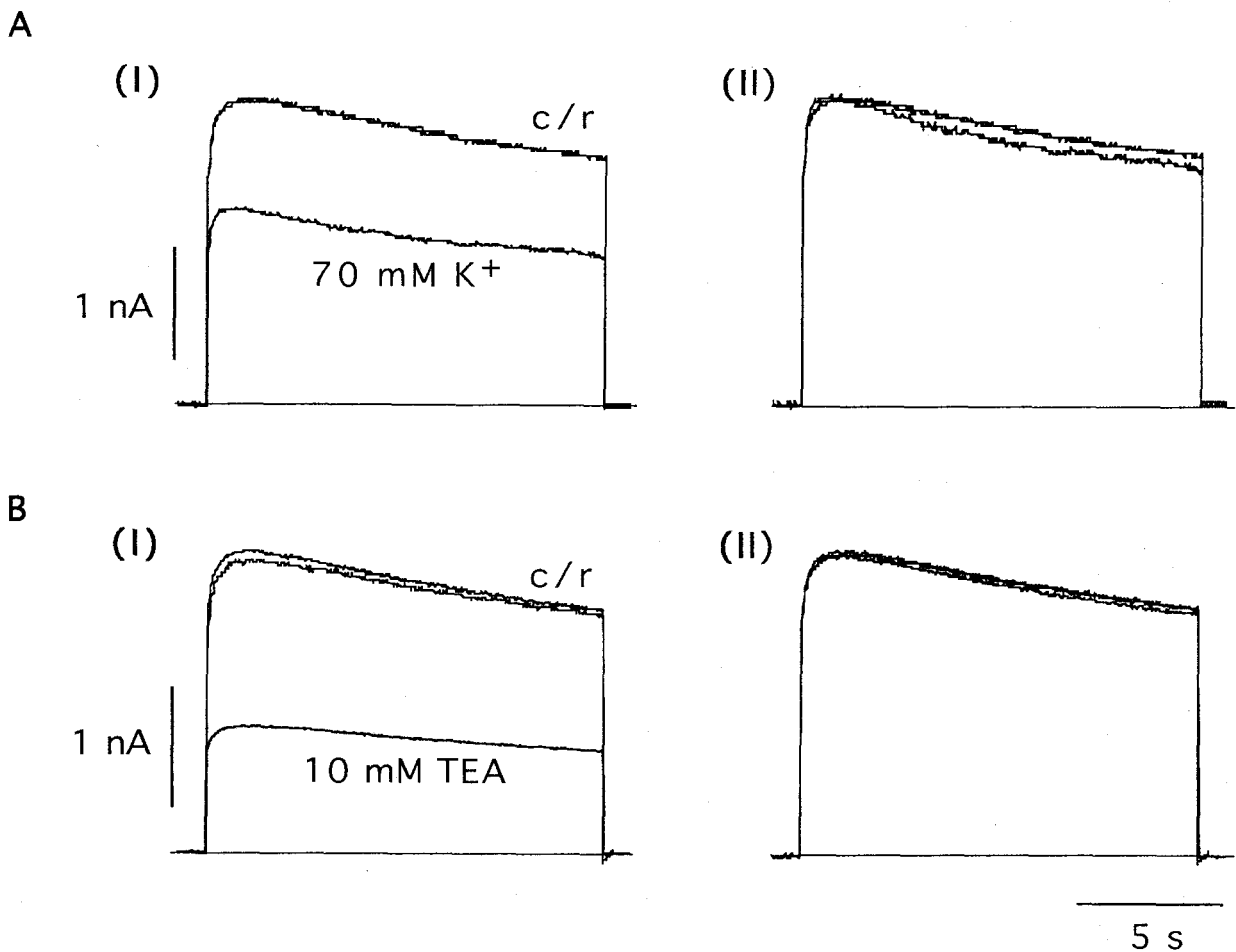


Fig. 61. Corrientes obtenidas en una célula transfectada con *Shaker B*  $\Delta 6-46$  y registrada usando solución interna control ó con 6 mM TEA. (A) Efecto reversible del TEA. Las corrientes se obtuvieron mediante pulsos de voltaje a +20 mV, desde un potencial de membrana de -80 mV. (B) Comparación de la cinética de las corrientes. c/r=control/recuperación.

Estas observaciones sugieren que la inactivación de Kv2.1 no es la denominada tipo-C, e indican que la inactivación de estos canales depende de dominios moleculares intracelulares. Estos resultados son consistentes con los obtenidos tras el estudio de las quimeras que contienen el dominio NRD de Kv2.3 y que pueden formar canales conductores. Por ejemplo, en la quimera Ch7 las alteraciones del dominio NRD de Kv2.1 produjeron cambios dramáticos en la cinética de inactivación, sugiriendo que la región NRD participa en el proceso de inactivación (ver *Resultados*, apartado 3). Por tanto, decidimos estudiar, en células diferentes, los efectos de la aplicación de TEA extracelular o de alto  $K^+$  externo, y de la aplicación intracelular de TEA, sobre la inactivación de los canales formados por la quimera Ch7. La aplicación de 70 mM  $K^+$  externo disminuyó la amplitud

de las corrientes obtenidas en células expresando Ch7, pero no afectó el curso temporal de la inactivación (Fig. 62; tabla 10). El TEA externo también disminuyó la amplitud de las corrientes en ~50% sin producir efectos sobre la cinética de inactivación (Fig. 62; tabla 10). Así mismo, en los experimentos realizados en una misma célula (siguiendo el procedimiento descrito en la Fig. 60, A, el TEA interno disminuyó la amplitud de las corrientes en ~60%, sin producir ningún efecto sobre el curso temporal de la inactivación (Fig. 63; tabla 10).



**Fig. 62.** Corrientes obtenidas en células diferentes, transfectadas con Ch7 y registradas en presencia de 70mM  $K^+$  externo o de 10 mM TEA externo. (AI) Efecto reversible del  $K^+$  externo. (AII) Comparación de la cinética de las corrientes. (BI) Efecto reversible del TEA externo. (BII) Comparación de la cinética de las corrientes. Las corrientes se obtuvieron mediante pulsos de voltaje a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV; c/r= control/recuperación.

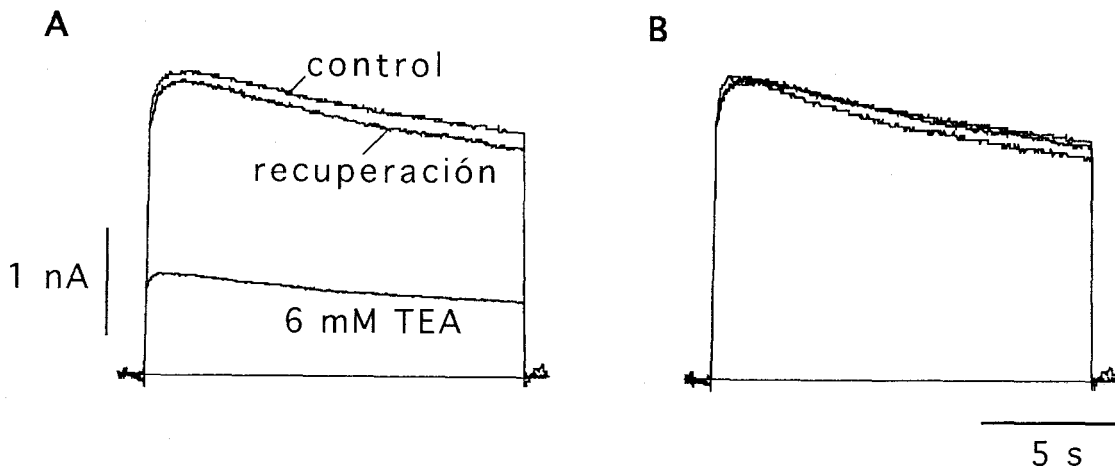


Fig. 63. Corrientes obtenidas en una misma célula, transfectada con Ch7 y registrada utilizando solución interna control o solución interna con TEA. (A) Efecto reversible del TEA interno. (B) Comparación de la cinética de las corrientes. Las corrientes se obtuvieron mediante pulsos de voltaje a +20 mV desde un potencial de membrana de -80 mV; c/r= control/recuperación.

En Kv2.1 el TEA intracelular produjo un enlentecimiento de la inactivación similar al observado cuando en estos canales se sustituyen sus aminoácidos 122-179 por los aminoácidos 147-206 de Kv2.3 (Ch7) que constituyen el dominio NRD. Por tanto, es posible que en el canal nativo Kv2.1, el TEA intracelular compita con el dominio NRD alterando su acción moduladora de la inactivación. En Ch7, esta competencia posiblemente desaparezca debido a que el dominio NRD de Kv2.1 ha sido sustituido por el de Kv2.3, con lo que se habría eliminado, al menos parcialmente, la acción de la región NRD como moduladora de la inactivación. En general, todas estas observaciones sugieren que el dominio molecular NRD desempeña un papel de fundamental importancia en la determinación del proceso de inactivación de los canales Kv2.1, posiblemente interaccionando con la boca interna de los canales produciendo directamente, o modulando, la inactivación.

	constante de tiempo de la inactivación (s)		
	Kv2.1	Shaker B $\Delta$ 6-46	quimera Ch7
2.7 mM K <sup>+</sup> externo	2.9 ± 0.4 (12)	2.3 ± 0.4 (8)	12.7 ± 1.2 (10)
30 mM K <sup>+</sup> externo	3 ± 0.4 (6)	—————	—————
70 mM K <sup>+</sup> externo	3.1 ± 0.3 (6)	4.3 ± 0.3 (9)	12.5 ± 1 (9)
140 mM K <sup>+</sup> externo	2.9 ± 0.4 (6)	—————	—————
10 mM TEA externo	2.9 ± 0.3 (8)	—————	13.1 ± 1.2 (10)
30 mM TEA externo	—————	4.2 ± 0.3 (9)	—————
6 mM TEA interno (misma célula)	13.9 ± 1.1 (4)	2.2 ± 0.3 (4)	12.2 ± 1 (5)
6 mM TEA interno (células diferentes)	13 ± 0.6 (6)	—————	13.5 ± 0.6 (6)

**Tabla 10.** Comparación de los valores de la constante tiempo de la inactivación de las corrientes de K<sup>+</sup> registradas en células transfectadas con Kv2.1, *Shaker* B  $\Delta$ 6-46 o la quimera Ch7. Los valores se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar y en paréntesis el número de observaciones realizadas. Los registros fueron obtenidos en presencia de solución externa control, con alto K<sup>+</sup>, con TEA o solución interna con TEA (las concentraciones se indican en la tabla). En la parte superior se indica el tipo de canal expresado en cada caso. Las corrientes se obtuvieron mediante la aplicación de pulsos de voltaje a +20 mV (y 14 s de duración), desde un potencial de membrana de -80 mV.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han estudiado las características moleculares y funcionales de la subunidad  $\alpha$  de canal de  $K^+$  denominada Kv2.3. Se ha descrito que aunque Kv2.3 no forma canales homoméricos funcionales puede regular de forma específica y selectiva a los canales miembros de la familia Kv2 y que dicha actividad moduladora depende de un fragmento de 59 aminoácidos, denominado NRD, localizado en el extremo amino terminal de Kv2.3. Estos resultados sugieren que el papel fisiológico de Kv2.3 *in vivo* es el de actuar como subunidad reguladora de los canales de  $K^+$  dependientes del potencial de membrana. Además, los experimentos realizados con las distintas quimeras construidas indican que la secuencia equivalente al dominio NRD en Kv2.1 es de importancia fundamental para la modulación de los procesos de activación, inactivación y cierre.

### **1. La proteína Kv2.3 es una subunidad $\alpha$ de canal de $K^+$ dependiente del voltaje eléctricamente silente**

La subunidad  $\alpha$  de canal de potasio Kv2.3, clonada en nuestro laboratorio (Castellano et al., 1996, 1997), tiene las características moleculares típicas de las subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. Sin embargo, cuando Kv2.3 se expresa en un sistema heterólogo no se detectan corrientes macroscópicas de  $K^+$ , sugiriendo que Kv2.3 no forma canales homoméricos funcionales. En paralelo a nuestro trabajo, Hugnot et al (1996) identificaron una subunidad  $\alpha$  de canal de  $K^+$  prácticamente idéntica a Kv2.3 pero clonada a partir del genoma de

hámster, denominada Kv8.1. Estos autores han descrito que tras la inyección del RNAm de Kv8.1 en ovocitos o la transfección de su DNAc en células CHO o COS-7 no se detectan corrientes de  $K^+$ . Estas observaciones parecen confirmar que Kv2.3 y Kv8.1 son subunidades  $\alpha$  que por sí mismas no forman canales conductores.

Nuestras observaciones indican que la ausencia de corrientes de  $K^+$  en células CHO transfectadas con el DNAc de Kv2.3 no se debe a errores relacionados con la transcripción o la traducción del DNAc, ya que los estudios mediante las técnicas de *Northern blot* y de expresión de proteína *in vitro* indican que dicho DNAc se transcribe adecuadamente a RNAm y da lugar a una proteína del tamaño esperado. Además, los experimentos realizados en células CHO cotransfectadas con Kv2.3+GFP sugieren que la ausencia de corrientes tampoco se debe a una baja eficiencia de las transfecciones.

En general, la incapacidad de Kv2.3 para formar canales conductores podría deberse bien a que la proteína no llega a membrana o a que, aún llegando a la membrana, no es capaz de formar un poro acuoso por el que puedan fluir los iones. Por ejemplo, es posible que las subunidades Kv2.3 sean incapaces de reconocerse y coensamblarse entre sí y que, por tanto, no se produzca la oligomerización. En este caso, las subunidades podrían quedar atrapadas en el citosol sin llegar a la membrana. Se ha descrito que los extremo amino terminales de la subunidad  $\alpha$  eléctricamente silente de canal de  $K^+$  denominada Kv6.1 no se reconocen entre sí, aunque pueden interactuar con los extremos aminos de Kv2.1 (Post et al., 1996). Por tanto, es posible que los extremos aminos de la subunidad Kv2.3 (como en Kv6.1) no interaccionen entre sí, lo que explicaría su incapacidad para formar canales homoméricos conductores. Salinas et al (1997a) han mostrado, utilizando anticuerpos específicos contra la subunidad Kv8.1, que cuando ésta se expresa en células COS se queda atrapada en el retículo endoplasmático y no llega a la membrana. No obstante, Kv8.1 alcanza la

bicapa lipídica cuando se coexpresa con Kv2.2. Estas observaciones sugieren que Kv2.3 no forma canales conductores posiblemente debido a que al no reconocerse e interaccionar entre sí las subunidades permanecen en el citosol y no se transportan a la bicapa lipídica para formar macromoléculas multiméricas.

Además de la importancia de los extremos aminos para el reconocimiento entre subunidades, recientemente se ha mostrado que, en una misma subunidad  $\alpha$  de canal de  $K^+$ , la interacción entre los extremos amino y carboxilo terminales determina la oligomerización y, por tanto, la formación de canales homoméricos funcionales (ver Jerng y Cobarrubias, 1997). En nuestro trabajo se construyeron varias proteínas quiméricas en las que se intercambiaron regiones de Kv2.1 y Kv2.3. De estas quimeras, sólo Ch3, Ch4, Ch5, Ch6 y Ch7 formaron canales homoméricos conductores (quimeras funcionales). Curiosamente, todas las quimeras funcionales contienen en su secuencia los extremos amino y carboxilo de la subunidad Kv2.1 (ver *Materiales y métodos*). Por el contrario, las quimeras ChA, ChB, Ch1, Ch2 y Ch8 no formaron homómeros funcionales (quimeras silentes) y contienen ya sea el extremo amino de Kv2.1 y el carboxilo de Kv2.3, el extremo amino de Kv2.3 y el carboxilo de Kv2.1, o ambos extremos (amino y carboxilo) de Kv2.3. Por tanto, es posible que las quimeras silentes no formen homómeros conductores debido a que los cambios introducidos en los extremos amino y carboxilo afecten el reconocimiento y coensamblaje entre subunidades.

Aunque no era uno de los objetivos planteados en este trabajo, el estudio de las quimeras silentes sugiere algunas pistas sobre los posibles determinantes estructurales de la incapacidad conductora de Kv2.3. Por ejemplo, la quimera Ch3, que puede formar canales homoméricos conductores (quimera funcional), contiene los extremos amino y carboxilo de la subunidad Kv2.1. Es posible que esta quimera forme canales conductores debido a que la presencia de los extremos amino y carboxilo de



Kv2.3 permiten la oligomerización y, por tanto, su transporte a la membrana. Además, también es posible que la presencia de las regiones S4-S6 de Kv2.1 favorezcan la formación de un poro conductor de iones  $K^+$ . Si se comparan las estructuras moleculares de las subunidades quiméricas Ch2 (quimera silente) y Ch3, podemos concluir que los segmentos S1-S3 y el dominio NRD de Kv2.3 no impiden la oligomerización ni la formación de canales conductores (ver Fig. 64). Por otra parte, la quimera Ch8, tal como Ch3, contiene los extremos amino y carboxilo terminales de Kv2.1 pero contiene las regiones S4-S6 de Kv2.3 (ver Fig. 64). La presencia de las regiones moleculares de Kv2.1 en Ch8 teóricamente podría corregir los errores de reconocimiento entre los extremos amino y carboxilo terminales y favorecer la oligomerización, tal como sucede en Ch3. Sin embargo, tras la expresión de la quimera Ch8 en células CHO no se detectan corrientes de  $K^+$ , indicando que ésta no forma canales conductores en la bicapa lipídica. Estas observaciones sugieren que las secuencias contenidas entre los segmentos S4-S6 y/o en los extremos amino y carboxilo de Kv2.3 podrían ser las estructuras moleculares responsables de la incapacidad de las subunidades Kv2.3 para autoensamblarse y formar proteínas multiméricas en la membrana o para la formación de un poro conductor.

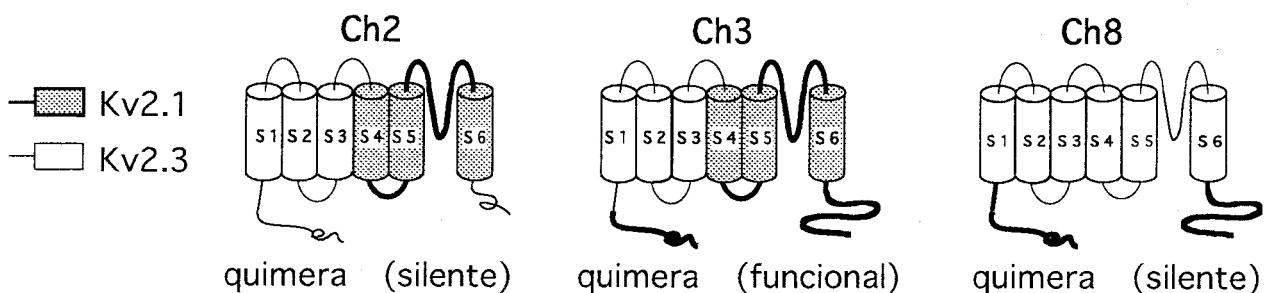


Fig. 64. Esquema de las subunidades quiméricas Ch2, Ch3 y Ch8. Tras la expresión funcional en células CHO de las quimeras Ch2 y Ch8 no se detectan corrientes de  $K^+$  (quimeras silentes) mientras que tras la expresión de la quimera Ch3 se registran corrientes macroscópicas de  $K^+$ , indicando que ésta puede formar canales homoméricos conductores presentes en la bicapa lipídica (quimera funcional). Nótesen las diferencias entre los extremos amino y carboxilo terminales así como en los segmentos transmembranarios S4-S6 de las quimeras.

Como ya se ha mencionado, existe la posibilidad de que las subunidades Ch8 lleguen a la membrana debido a que contienen las regiones amino y carboxilo de Kv2.1. La incapacidad de estas quimeras para formar canales conductores podría deberse a la presencia de los aminoácidos V382 (en el lazo que une S5-S6), W386 (en la región del poro), o A412 (en el segmento S6) de Kv2.3, los cuales difieren de residuos altamente conservados entre los canales de K<sup>+</sup> dependientes del voltaje. Aunque los aminoácidos S234 (en el lazo S1-S2) y K268 (en el lazo S2-S3) también difieren de las secuencias conservadas en los canales de K<sup>+</sup>, éstos no parecen ser imprescindibles para la formación de homómeros conductores, como se demuestra con la quimera Ch3.

En resumen, nuestros resultados sugieren que Kv2.3 es una subunidad  $\alpha$  de canal de K<sup>+</sup> eléctricamente silente posiblemente debido a que no forma proteínas multiméricas en la membrana o a que contiene estructuras moleculares que le impiden formar un poro hidrofílico conductor de iones K<sup>+</sup>.

## **2. La subunidad $\alpha$ reguladora Kv2.3 es específica y selectiva para los canales miembros de la familia Kv2**

Aunque la subunidades Kv2.3 no forman por sí mismas canales homoméricos de K<sup>+</sup> funcionales, pueden formar canales heteroméricos selectivamente con los canales pertenecientes a la familia Kv2 y regular su función. Tras la coexpresión de los DNAc de Kv2.3+Kv2.1, en células CHO, se detectan corrientes de K<sup>+</sup> con un curso temporal más lento y con un desplazamiento de ~15 mV en la curva G/V hacia potenciales de membrana más positivos, respecto de lo observado tras la expresión en solitario de Kv2.1. Por el contrario, la coexpresión con Kv2.3 no induce modificaciones en las propiedades cinéticas de los canales *Shaker* B $\Delta$ 6-46, Kv1.1, Kv1.2, Kv3.3 o Kv4.2. La subunidad Kv2.3 tiene su mayor homología estructural (44%) con los canales miembros de la familia Kv2 (Kv2.1 y

Kv2.2). Las secuencias de aminoácidos de la región comprendida entre los segmentos S1-S6 de Kv2.3 y de Kv2.1 tienen una homología de ~50%. Además, en Kv2.3 se encuentra conservada la secuencia CALSF (aminoácidos 132-136 de la caja B), que es específica de las subunidades  $\alpha$  de la familia Kv2 (Salkoff et al., 1992). Por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo y el análisis de las secuencias de aminoácidos de Kv2.3 y Kv2.1 sugieren que la subunidad Kv2.3 no es capaz de interactuar con subunidades  $\alpha$  con las que no comparte un alto grado de homología estructural e indican que Kv2.3 es una subunidad  $\alpha$  reguladora específica y selectiva para canales miembros de la familia Kv2. La interacción selectiva entre Kv2.3 y Kv2.1 parece deberse a la homología estructural que existe entre dominios moleculares específicos. Se sabe que el reconocimiento selectivo entre subunidades está determinado por las denominadas cajas A y B, secuencias localizadas en el extremo amino terminal (Li et al., 1992). La secuencia de aminoácidos de la caja A de Kv2.3 tiene una baja homología con las regiones equivalentes de Kv2.1 y de otras subunidades de canales de  $K^+$ , como *Shaker* B, Kv1.1, o Kv3.3. Sin embargo, la secuencia de la caja B de Kv2.3 tiene un alto grado de homología (~70%) con las cajas B de Kv2.1 y de Kv2.2, mientras que tal homología es inferior al 45% con cualquiera de las otras subunidades, por lo que es posible que la alta similitud en las cajas B explique que Kv2.3 pueda interactuar selectivamente con las subunidades  $\alpha$  de la familia Kv2 (Castellano et al., 1997).

Todas estas observaciones indican que Kv2.3 sólo puede interactuar con los canales miembros de la familia Kv2. Sin embargo, Hugnot et al., (1996) inicialmente publicaron que el RNAc de Kv8.1 inyectado en ovocitos de *Xenopus* inducía un bloqueo total de la función de canales miembros de las familias *Shab* (Kv2) y *Shaw* (Kv3) y, por tanto, sugirieron que Kv8.1 podía interactuar funcionalmente con los miembros de estas familias génicas. No obstante, éstos mismos autores demostraron que en células COS-7 Kv8.1 sólo modula a los canales miembros de la

familia Kv2 (Kv2.2) y no modifica la cinética de los canales miembros de la familia Kv3 (Salinas et al., 1997a). En este trabajo se ha descrito que Kv2.3 también puede producir una disminución en la amplitud de las corrientes cuando se coexpresa con subunidades  $\alpha$  miembros de diferentes familias génicas. Sin embargo, tal disminución sólo está acompañada de cambios en el curso temporal de las corrientes cuando se coexpresa con canales miembros de la familia Kv2 (ver Castellano et al., 1997). Además, el mismo efecto de disminución de la corriente se puede observar cuando algunos canales de  $K^+$  se coexpresan con otras proteínas diferentes, tales como la GFP o la  $\beta$  galactosidasa (ver Castellano, et al., 1997; Salinas et al., 1997b). Por lo tanto, la disminución en la amplitud de las corrientes inducido por Kv2.3 no implica necesariamente la existencia de una interacción funcional entre Kv2.3 y cualquiera de las subunidades con la que se coexpresa. De hecho, nuestros resultados experimentales indican que la acción moduladora de Kv2.3 sobre Kv2.1 se basa en la interacción selectiva entre estas subunidades para formar canales heterotetraméricos. Una indicación de que Kv2.3 y Kv2.1 forman heterotetrámeros se obtuvo a partir del estudio electrofisiológico del dímero Kv2.1-Kv2.3. El hecho de que las corrientes de  $K^+$  registradas tras la expresión de este dímero presenten las mismas características cinéticas y los mismos efectos sobre la curva G/V observados tras la coexpresión de Kv2.1+Kv2.3 indica que las subunidades Kv2.1 y Kv2.3 pueden formar canales heteroméricos funcionales.

La demostración de que Kv2.3 y Kv2.1 forman heterotetrámeros ensamblados en la membrana se obtuvo a partir de los experimentos realizados en presencia de 1 mM  $Zn^{2+}$ , que es un catión que actúa extracelularmente como bloqueante de algunos canales de  $K^+$ . Se sabe que los canales Kv2.1 son prácticamente insensibles a la aplicación de  $Zn^{2+}$  externo (De Biasi et al, 1993a). Además, como se mencionó en el apartado *Resultados*, Kv2.3 y Kv2.1 tienen marcadas divergencias en sus lazos extracelulares. Por tanto, era posible que los heterotetrámeros constituidos

por la combinación en la membrana de Kv2.1 y Kv2.3 tuvieran una sensibilidad al  $Zn^{2+}$  diferente de la de los canales Kv2.1. Efectivamente, las corrientes registradas en células cotransfectadas con Kv2.1 y Kv2.3, así como en células transfectadas con el dímero Kv2.1-Kv2.3, fueron más sensibles a la inhibición por  $Zn^{2+}$  que las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1. Por tanto, concluimos que Kv2.3 y Kv2.1 pueden formar heterotetrámeros funcionales presentes en la bicapa lipídica.

En resumen, nuestras observaciones indican que Kv2.3 es una subunidad  $\alpha$  reguladora de canales de  $K^+$  específica y selectiva para miembros de la familia Kv2. La interacción funcional entre Kv2.3 y Kv2.1 da lugar a la génesis de canales heterotetraméricos funcionales con características electrofisiológicas diferentes de las que tienen los canales homoméricos de Kv2.1. Con posterioridad a nuestra identificación de la proteína Kv2.3 como subunidad silente y reguladora (Castellano et al, 1996, 1997), otros autores han descrito la existencia de un mínimo de cuatro familias de subunidades  $\alpha$  eléctricamente silentes, denominadas Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9 (Post et al., 1996; Patel et al., 1997; Salinas et al., 1997a, 1997b; Zhu et al., 1998). Al igual que Kv2.3, todas estas subunidades ejercen efectos moduladores específicamente sobre los canales de la familia Kv2. Nuestros resultados sugieren que la coexpresión funcional entre Kv2.3 y Kv2.1 podría contribuir *in vivo* a aumentar la diversidad molecular y funcional de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje. La interacción entre subunidades silentes y subunidades funcionales tiene precedentes bien conocidos en los canales iónicos dependientes de un ligando (ver Monyer et al, 1992; Chen et al., 1993; Liman et al., 1994; Bertry y Changeux, 1995; McGehee y Role, 1995). Por ejemplo, los canales receptores de NMDA (Monyer et al, 1992) o de nicotina (McGehee y Role, 1995) también contienen subunidades transmembranarias que, aunque pueden formar canales heteromultiméricos funcionales, por sí mismas no forman homómeros conductores.

### 3. El dominio NRD es la región molecular de la subunidad Kv2.3 responsable de su actividad reguladora: participación en los procesos cinéticos de activación, inactivación y desactivación

Las características funcionales de las subunidades  $\alpha$  reguladoras conocidas han sido bien estudiadas y caracterizadas en experimentos *in vitro* (ver Castellano et al., 1996, 1997; Patel et al., 1997; Post et al., 1996; Salinas et al., 1997a, 1997b; Zhu et al., 1998). Sin embargo, los determinantes moleculares responsables de la acción moduladora de estas subunidades aún se desconocen. En el presente estudio hemos identificado un dominio en el extremo amino terminal de la subunidad  $\alpha$  reguladora Kv2.3 (denominado NRD) que es la estructura molecular responsable de su acción moduladora sobre los canales Kv2.1. La sólo presencia del dominio NRD de Kv2.3 en la subunidad Kv2.1 (quimera Ch7) le confiere a ésta la capacidad de modular a los canales nativos Kv2.1. Por el contrario, cuando en Kv2.3 se sustituye la región NRD por el dominio equivalente de Kv2.1 (quimera Ch9) se produce la pérdida casi total de su propiedad reguladora.

Salinas et al., (1997b) publicaron que los efectos de Kv8.1 sobre los canales Kv2.1 dependen de aminoácidos en el segmento S6 basándose en el hecho de que una quimera que contiene desde el extremo amino terminal hasta la región del poro de Kv8.1 (Kv8/Kv1) es incapaz de alterar las propiedades biofísicas de Kv2.1. Estos autores mostraron que los efectos de Kv8.1 sobre la cinética de inactivación se revierten parcialmente por dos mutaciones puntuales aditivas en el segmento S6. Sin embargo, en ninguno de estos experimentos se comprobó directamente la formación de canales heteroméricos entre la proteína quimérica (Kv8/Kv1) y Kv2.1. Por tanto, existe la posibilidad de que, en sus condiciones experimentales, dicha proteína quimérica no formase heterómeros funcionales con Kv2.1. Como ya se ha mencionado, en el presente estudio utilizamos el efecto de 1 mM

$Zn^{2+}$  como ensayo para detectar la interacción funcional entre las diferentes subunidades expresadas y la formación o no de canales heteroméricos. Además, aunque algunas mutaciones puntuales puedan alterar el efecto inducido por Kv8.1 (Salinas et al., 1997b), la sustitución de uno o dos aminoácidos en el segmento S6 de Kv2.3 no es suficiente para explicar completamente el efecto regulador inducido por Kv2.3 sobre los canales Kv2.1. Nuestros resultados demuestran que algunas quimeras (como Ch1, Ch8 o Ch9) que conservan intactas grandes regiones de Kv2.3 (incluido S6) pero que carecen del dominio NRD de Kv2.3, son incapaces de alterar las propiedades cinéticas de los canales Kv2.1. Por el contrario, las quimeras que contienen intacto el segmento S6 de Kv2.1 pero que contienen el dominio NRD de Kv2.3 (Ch2, Ch3, Ch5 y Ch7) inducen el mismo efecto modulador ejercido por la subunidad nativa Kv2.3. Con base en todas estas observaciones concluimos que el dominio NRD es el principal responsable de la acción reguladora ejercida por la subunidad Kv2.3. Este dominio es necesario y suficiente para la regulación del curso temporal de los procesos cinéticos de activación e inactivación de los canales Kv2.1.

El dominio NRD no solamente determina las propiedades reguladoras de la subunidad Kv2.3 sino que, además, la secuencia equivalente a esta región en los canales Kv2.1 participa en la modulación de los procesos cinéticos de activación, inactivación y cierre. La presencia del dominio NRD de Kv2.3 en las proteínas quiméricas que pueden formar canales homoméricos funcionales (Ch3, Ch5 y Ch7) produce cambios notables en los parámetros cinéticos de estos homómeros respecto de lo observado en los canales Kv2.1. Como se indicó anteriormente, se sabe que algunas regiones del extremo amino terminal (como las cajas A y B o el dominio T1) participan en el reconocimiento y ensamblaje selectivo entre subunidades  $\alpha$  de canales de  $K^+$  de rectificación retardada. (Li et al., 1992; Shen et al., 1995; Yu et al., 1996). Sin embargo, el papel funcional del extremo amino terminal en los procesos cinéticos está poco estudiado. En

canales de K<sup>+</sup> tipo HERG se ha demostrado que las deleciones de aminoácidos específicos del extremo amino terminal producen modificaciones en la dependencia del voltaje de la activación (ver Schönherr et al., 1996; Spector et al., 1996). También se ha descrito que algunas deleciones en el extremo amino terminal de los canales de K<sup>+</sup> tipo *eag* producen un desplazamiento de la dependencia del voltaje de la activación y una aceleración en el curso temporal de la activación (ver Terlau et al., 1997). Las deleciones de regiones amino terminales de los canales Kv2.1 producen modificaciones significativas de sus cinéticas de activación y cierre (VanDongen et al., 1990). Por ejemplo, la deleción de los 139 primeros aminoácidos de Kv2.1 (Kv2.1 $\Delta$ N139) produce un notable enlentecimiento de la activación, posiblemente debido a la eliminación de 6 aminoácidos cisteínas presentes en la región delecionada (Pascual et al., 1997; VanDongen et al., 1990). Sin embargo, sólo dos de estas cisteínas de Kv2.1 (C128 y C129) están presentes en la secuencia de aminoácidos del dominio NRD de Kv2.3 y se encuentran conservadas en las subunidades Kv2.1 y Kv2.2 (*Apéndice 2*). Por tanto, el enlentecimiento de la activación y el cierre inducido por el dominio NRD de Kv2.3 no parece deberse a la presencia en esta región de aminoácidos cisteínas.

Como ya se ha mencionado, la presencia del dominio NRD de Kv2.3 induce cambios significativos en el curso temporal de la desactivación de Kv2.1. Sin embargo, en estos canales el efecto de enlentecimiento del cierre no parece depender exclusivamente de la secuencia que forma el dominio NRD. En este trabajo mostramos que los efectos que el dominio NRD ejerce sobre la cinética de cierre no se revierten completamente cuando en Kv2.3 se sustituye dicho dominio por la correspondiente región de Kv2.1. Estas observaciones sugieren la posibilidad de que las subunidades Kv2.3 y Kv2.1 contengan otras regiones moleculares, además del dominio NRD, que participen en la modulación del proceso de cierre. Por ejemplo, los canales homoméricos formados por la quimera Ch7 presentan



modificaciones dramáticas de la cinética de cierre respecto de los canales registrados tras la coexpresión de Kv2.1+Kv2.3. Por tanto, se podría sugerir que el dominio NRD participa en la regulación del proceso de cierre probablemente a través de su interacción con una región receptora aún no identificada.

Además de modular los procesos de activación y cierre, el dominio amino terminal NRD de Kv2.3 también induce un enlentecimiento significativo en la cinética de inactivación de Kv2.1. Es bien conocido que los canales *Shaker* B presentan un tipo de inactivación (tipo-N) que depende de los 20 primeros aminoácidos de la región amino terminal (Armstrong y Bezanilla, 1977; Hoshi et al., 1990; Zagotta y Aldrich, 1990). Sin embargo, el mecanismo de inactivación de los canales Kv2.1 aun no ha sido bien caracterizado. Se ha postulado que estos canales tienen una inactivación que pudiera ser tipo-C o tipo-P (De Biasi et al., 1993b) más que una inactivación tipo-N (Hoshi et al., 1990; Tseng-Crank et al., 1993). No obstante, se sabe que algunas deleciones en aminoácidos del extremo amino terminal de Kv2.1 (canales Kv2.1 $\Delta$ N139) producen un efecto de enlentecimiento de la inactivación (VanDongen et al., 1990). En el presente estudio hemos descrito que otras regiones moleculares localizadas en el extremo amino terminal de Kv2.1, diferentes de las regiones delecionadas en los experimentos de VanDongen et al (1990), están involucradas en la determinación no sólo de la activación y la desactivación, sino también del proceso de inactivación. Nuestros resultados indican que las propiedades funcionales de los canales Kv2.1 pueden ser reguladas por el dominio NRD, una secuencia de 59 aminoácidos localizados en la región amino terminal próxima al segmento transmembranario S1. Es posible que la presencia de aminoácidos cargados negativamente en el dominio NRD determinen su interacción funcional con regiones receptoras aun no identificadas pero probablemente localizadas en la zona central del canal. El dominio NRD podría formar parte del vestíbulo interno de los canales

y/o interactuar con regiones moleculares a nivel del poro para modular la función de Kv2.1 (ver Marten y Hoshi, 1998). La identificación de los aminoácidos específicos del dominio NRD que confieren a Kv2.3 su acción reguladora, así como la elucidación de los mecanismos moleculares mediante los cuales NRD modula la actividad funcional de los canales miembros de la familia Kv2, constituyen líneas abiertas para futuros trabajos de investigación.

El estudio de las diferentes subunidades quiméricas, realizado con objeto de identificar los determinantes moleculares de la actividad reguladora de Kv2.3, ha arrojado algunas pistas sobre los dominios estructurales involucrados en la inactivación de los canales Kv2.1. Por esta razón, decidimos explorar con más detalle las características electrofisiológicas del proceso de inactivación de estos canales. Como se ha mencionado en la *Introducción*, los mecanismos de inactivación mejor conocidos son los tipo-N y tipo-C, que tienen determinantes moleculares diferentes los cuales pueden evidenciarse por los efectos producidos tras la aplicación de cationes extracelulares. Por ejemplo, en los canales *Shaker B* el TEA afecta el curso temporal de la inactivación tipo-N cuando se aplica intracelularmente pero no cuando se aplica extracelularmente, indicando que dicho proceso depende de dominios intracelulares (Choi et al., 1991). Por el contrario, cuando se aplica TEA o alto  $K^+$  externo en canales *Shaker B*  $\Delta 6-46$  se produce un enlentecimiento de la inactivación tipo-C, debido a que ésta depende de regiones moleculares localizadas a nivel extracelular (Choi et al., 1991; Hoshi et al., 1991; López-Barneo et al., 1993). Para estudiar el proceso de inactivación de Kv2.1, examinamos los efectos de la aplicación intra y extracelular de TEA y de alto  $K^+$  externo sobre la inactivación de estos canales. El TEA y el  $K^+$  extracelular no afectaron el curso temporal de la inactivación, pero el TEA intracelular sí produjo un enlentecimiento de la cinética de inactivación de Kv2.1, indicando que el mecanismo de inactivación de estos canales no es el previamente descrito

como tipo-C y sugiriendo que este proceso depende de dominios moleculares localizados intracelularmente. Como ya se ha mencionado, nuestras observaciones demuestran que, efectivamente, el dominio intracelular NRD juega un papel determinante en la inactivación de estos canales. Es posible que los efectos producidos por el TEA intracelular sobre la inactivación de Kv2.1 se deban a que el TEA compite con el dominio NRD durante el proceso de inactivación. Estas observaciones concuerdan con los resultados del estudio de las quimeras que forman homómeros conductores y que contienen la región NRD de Kv2.3, sugiriendo que esta región podría formar parte del dominio molecular responsable del proceso de inactivación de los canales Kv2.1. La aplicación intra o extracelular de TEA, así como la aplicación de alto  $K^+$  externo, no afectaron el curso temporal de la inactivación de los canales homoméricos formados por la quimera Ch7, que es idéntica a Kv2.1 excepto por la presencia del dominio NRD de Kv2.3. Por tanto, es posible que las modificaciones estructurales introducidas en Ch7 impidan que la región NRD actúe como dominio inactivante, eliminado la posible competencia entre la región NRD y el TEA intracelular. No obstante, es posible que el efecto del TEA interno sobre la inactivación de Ch7 esté enmascarado por la lenta cinética de inactivación que presentan estos canales quiméricos.

En resumen, nuestras observaciones indican que el dominio NRD es la estructura molecular responsable de las propiedades reguladoras de la subunidad  $\alpha$  Kv2.3. Este dominio se localiza en el extremo amino terminal y comprende los aminoácidos 148-206, ubicados después de las denominadas cajas A y B y adyacentes al segmento transmembrana S1. La divergencia existente entre la secuencia de la región NRD de Kv2.3 respecto de la secuencia equivalente en las subunidades Kv2.1 y Kv2.2 (ver Fig. 50) podría explicar los efectos reguladores ejercidos por la subunidad  $\alpha$  Kv2.3 sobre estos canales. Además, la secuencia equivalente al dominio NRD de los canales Kv2.1 podría actuar como región moduladora de la inactivación

o como partícula inactivante posiblemente interaccionando con una zona receptora a nivel de la boca interna del poro. El estudio de las características estructurales y funcionales del dominio regulador NRD podría dar lugar a la identificación de un nuevo mecanismo generador de inactivación en los canales de  $K^+$  dependientes del potencial de membrana.

#### **4. Importancia fisiológica de la existencia de subunidades $\alpha$ reguladoras de canales de $K^+$ dependientes del potencial de membrana**

Las características electrofisiológicas de las células nerviosas y otras células excitables dependen básicamente de su dotación de canales iónicos. El tipo y distribución de canales iónicos que expresa cada célula determina sus propiedades eléctricas intrínsecas, es decir, la forma en que procesa la información aferente (ver Llinás, 1988). Entre los diferentes tipos de canales iónicos conocidos, los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje son los principales responsables de la génesis del potencial de reposo, la repolarización de los potenciales de acción o el control del disparo repetitivo en neuronas y otras células excitables (Connor y Stevens, 1971; Rogawski, 1985; Rudy, 1988; Hille, 1992). Estos canales, también afectan a la actividad funcional de otro tipo de proteínas (como los canales de  $Ca^{2+}$ ) que participan en procesos metabólicos de importancia fundamental en la fisiología celular. Por tanto, la existencia de subunidades  $\alpha$  reguladoras de los canales de  $K^+$  activados por los cambios en el potencial eléctrico transmembrana podría tener, en condiciones fisiológicas, una relevancia funcional considerable. Es posible que, *in vivo*, la expresión selectiva de la subunidad  $\alpha$  reguladora Kv2.3 participe en la modulación de las propiedades eléctricas intrínsecas de neuronas concretas mediante la génesis de canales heterotetraméricos.

La expresión de Kv2.3 se restringe a áreas específicas del cerebro donde también existen altos niveles de expresión del RNAm de Kv2.1 o Kv2.2 (Trimmer, 1991; Drewe et al., 1992; Hwang et al., 1992; Castellano et

al., 1996, 1997; Hugnot et al., 1996). Además, los RNAm de las subunidades Kv2.1 y Kv2.2 se expresan en regiones diferentes del sistema nervioso central de mamíferos (Hwang et al., 1992, 1993), lo que sugiere que Kv2.3 podría formar canales heteroméricos funcionales con cualquiera de estas subunidades para regular su función. De hecho, en nuestro laboratorio se han realizado estudios preliminares que indican que los RNAm de Kv2.1 y de Kv2.3 se expresan en las mismas neuronas (datos no publicados).

Los efectos funcionales que la subunidad Kv2.3 ejerce sobre los canales Kv2.1 podrían ser muy importantes desde el punto de vista fisiológico si se considera que Kv2.1 es el canal de  $K^+$  que se expresa más ubicuamente y con los mayores niveles de expresión en el cerebro de mamíferos (Trimmer, 1991; Drewe et al., 1992). Además, recientemente se ha descrito que los canales Kv2.1 son los que contribuyen mayoritariamente a la génesis de corrientes de  $K^+$  de rectificación retardada en neuronas de hipocampo (ver Murakoshi y Trimmer, 1999). También se sabe que Kv2.1 se expresa de forma específica en el soma y en las dendritas proximales de células nerviosas del cerebro de mamíferos (ver Trimmer, 1991; Scannevin et al., 1996; Du et al., 1998; Murakoshi y Trimmer, 1999). Por tanto, es posible que los canales Kv2.1 participen en la regulación de la transmisión de las señales eléctricas desde y hacia el soma de las células nerviosas de hipocampo (ver Murakoshi y Trimmer, 1999).

Además de los efectos que Kv2.3 ejerce sobre los procesos cinéticos de activación, inactivación y desactivación, también es posible que *in vivo* Kv2.3 participe en la modulación de la sensibilidad al  $Zn^{2+}$  extracelular de los canales heteroméricos Kv2.1/Kv2.3. Se ha demostrado que las terminales nerviosas de las células de hipocampo contienen  $Zn^{2+}$  y que este catión puede alcanzar concentraciones en el rango de milimolar en las hendiduras sinápticas (ver Huang, 1997). Este tipo de modulación ha sido descrito previamente para los canales receptores de NMDA, cuya actividad

puede ser inhibida por  $Zn^{2+}$  (Westbrook y Mayer, 1987) y donde la sensibilidad al  $Zn^{2+}$  externo en los diferentes subtipos de receptores depende de la coexpresión de subunidades específicas (Chen et al, 1993). En resumen, todas estas observaciones sugieren que la coexpresión selectiva de Kv2.3 con Kv2.1 podría participar fisiológicamente en la génesis de un mayor número de fenotipos de canales de  $K^+$  dependientes del voltaje y contribuir a aumentar el grado de especialización funcional de las células nerviosas.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes de este trabajo son:

1. La subunidad Kv2.3 tiene características moleculares similares a las de las subunidades  $\alpha$  de canales de potasio dependientes del voltaje pero tras su expresión en sistemas heterólogos no se detectan corrientes macroscópicas de  $K^+$ . Por tanto, Kv2.3 es una subunidad  $\alpha$  de canal de  $K^+$  dependiente del voltaje eléctricamente silente, es decir, que por sí misma no forma canales homotetraméricos funcionales.
2. La incapacidad de Kv2.3 para formar canales conductores no se debe a errores de transcripción o traducción de su DNAC ni a la ausencia del aminoácido tirosina en la posición 402. Es posible que las subunidades Kv2.3 no formen proteínas multiméricas en la membrana debido a que sus extremos amino terminales no se reconocen entre sí o a que no se produce una interacción entre los extremos amino y carboxilo para la oligomerización. También es posible que los dominios estructurales contenidos en la región S4-S6 de Kv2.3 determinen su incapacidad para generar canales conductores de iones  $K^+$  y que ello se deba a que esta región contiene los aminoácidos V382, W386, y A412, que difieren de residuos muy conservados en los canales de  $K^+$  dependientes del voltaje.

3. Tras la coexpresión de Kv2.3 y Kv2.1 en células CHO se detectan corrientes de K<sup>+</sup> con cinéticas más lentas, más sensibles al Zn<sup>2+</sup> externo y con un desplazamiento en la curva conductancia/voltaje hacia potenciales de membrana más positivos, que las corrientes registradas tras la expresión en solitario de Kv2.1. Estos efectos moduladores no se observan cuando Kv2.3 se coexpresa con las subunidades *Shaker* B Δ6-46, Kv1.1, Kv1.2, Kv3.3 o Kv4.2. Estos resultados demuestran que Kv2.3 es una subunidad α reguladora de canales de K<sup>+</sup> específica y selectiva para los canales miembros de la familia Kv2.

4. Las corrientes de K<sup>+</sup> registradas tras la expresión del dímero Kv2.1-Kv2.3 tienen propiedades cinéticas y una relación conductancia/voltaje similares a las de las corrientes obtenidas tras la coexpresión de Kv2.1+Kv2.3. Además, las corrientes registradas en células cotransfectadas con Kv2.1+Kv2.3 o transfectadas con el dímero Kv2.1-Kv2.3 son más sensibles a la inhibición por 1 mM Zn<sup>2+</sup> que las corrientes registradas en células transfectadas con Kv2.1. En base a estos experimentos concluimos que las subunidades Kv2.3 y Kv2.1 se coensamblan y forman canales heteroméricos funcionales en la bicapa lipídica.

5. Hemos construido diferentes subunidades quiméricas intercambiando regiones entre las subunidades Kv2.1 y Kv2.3. Estas quimeras fueron coexpresadas con la subunidad Kv2.1, en células CHO, con objeto de examinar las propiedades cinéticas de las corrientes de K<sup>+</sup> resultantes. El estudio de las características moleculares y funcionales de las distintas quimeras nos ha permitido identificar una región (denominada NRD) en el extremo amino terminal de la subunidad α Kv2.3, que es la estructura molecular responsable de la función reguladora que esta ejerce sobre los canales Kv2.1.



El dominio NRD de Kv2.3 comprende los aminoácidos 148-206, localizados la región amino terminal posterior a la denominada caja B y adyacente al segmento transmembranario S1. En Kv2.3, la sustitución de esta región por la secuencia equivalente de Kv2.1 produce la pérdida casi total de sus propiedades moduladoras. Además, la sólo presencia del dominio NRD de Kv2.3 en Kv2.1 confiere a éste propiedades reguladoras similares a las de Kv2.3. La capacidad moduladora de Kv2.3 parece deberse a la divergencia en la secuencia de aminoácidos existente entre su región NRD y la secuencia equivalente de las subunidades pertenecientes a la familia Kv2.

6. El dominio NRD no sólo es responsable de las propiedades reguladoras de Kv2.3 sino que la secuencia equivalente a este dominio participa en la modulación de los procesos cinéticos de los canales Kv2.1. Las quimeras Ch3, Ch5 y Ch7, que forman homómeros funcionales y que contienen en su secuencia el dominio NRD de Kv2.3 tienen cinéticas de activación, inactivación y cierre significativamente más lentas que las de los canales homoméricos de Kv2.1. Por lo tanto, es posible que en estos canales el dominio NRD sea bien el responsable directo, o module, dichos procesos cinéticos.

7. El TEA y el  $K^+$  externo no afectan el curso temporal de la inactivación en los canales Kv2.1. Por el contrario, el TEA interno enlentece la cinética de inactivación de estos canales. Estas observaciones sugieren que el mecanismo de inactivación de los canales Kv2.1 depende de dominios moleculares localizados a nivel intracelular y no es el conocido como tipo-C.

8. El TEA intra o extracelular y el alto  $K^+$  externo no afectan la inactivación de los canales homoméricos formados por la quimera Ch7. Ello sugiere que los efectos del TEA intracelular sobre la inactivación de Kv2.1 se deben a que el TEA compite con el dominio NRD durante la inactivación. En base a estas observaciones postulamos que el dominio NRD podría modular la inactivación de los canales Kv2.1 mediante su interacción con una región receptora aún no identificada pero posiblemente localizada en la región de la boca interna de los canales.

9. La subunidad  $\alpha$  reguladora Kv2.3 se expresa en áreas del cerebro donde también existen altos niveles de expresión de Kv2.1 y Kv2.2 (subunidades que se expresan en regiones diferentes del sistema nervioso central de mamíferos). Además, nuestros estudios preliminares indican que los RNAm de Kv2.1 y de Kv2.3 se expresan en las mismas neuronas. Por tanto, es posible que Kv2.3, en condiciones fisiológicas, forme canales heterotetraméricos funcionales con estas subunidades y module tanto los procesos cinéticos de activación, inactivación y cierre como la sensibilidad al  $Zn^{2+}$  extracelular. Las subunidades  $\alpha$  reguladoras de los canales de  $K^+$  dependientes del potencial de membrana podrían participar, *in vivo*, en la modulación de los canales de  $K^+$  contribuyendo a diversificar las propiedades eléctricas intrínsecas de las células nerviosas.

## BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, S.K. and MacKinnon, R. (1996). Contribution of S4 segment to gating charge in the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16:1169-1177.

Almers, W. and Armstrong, C.M. (1981). Survival of K<sup>+</sup> permeability and gating currents in squid axons perfused with K<sup>+</sup>-free media. *J. Gen. Physiol.* 75:61-78.

Armstrong, C.M. (1966). Time course of TEA-induced anomalous rectification in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 50:491-503.

Armstrong, C.M. (1969). Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* 50:491-503.

Armstrong, C.M. (1971). Interaction of tetraethylammonium derivatives with the potassium channels of the giant axon. *J. Gen. Physiol.* 58:413-437.

Armstrong, C.M. and Bezanilla, F. (1973). Currents related to movement of the gating particle of the sodium channel. *Nature* 242:459-461.

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

Armstrong, C.M. and Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating currents experiments. *J. Gen. Physiol.* 70:567-590.

Armstrong, C.M. and Matteson, D.R. (1986). The role of the calcium ions in the closing of K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* 87:817-832.

Armstrong, C.M. and López-Barneo, J. (1987). External calcium ions are required for potassium channel gating in squid neurons. *Science* 236:712-714.

Armstrong, C.M. (1997). A closer picture of a K channel gate from ion trapping experiments. *J. Gen. Physiol.* 109: 523-524.

Armstrong, C.M. (1998). Voltage gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20:3 371-380.

Attali B., Lesage, F., Ziliani, P., Guillemare, E., Honoré, E., Waldmann, R., Hugnot, J.P., Mattéi, M.G., Lazdunski, M., Barhanin, J. (1993). Multiple mRNA isoforms encoding the mouse cardiac Kv1.5 delayed rectifier K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 268: 24283-24289.

Baukrowitz, W.K. and Yellen, G. (1995). Modulation of K<sup>+</sup> currents by frequency and external [K<sup>+</sup>]: a tale of two inactivating mechanisms. *Neuron* 15:951-960.

Baukrowitz, W.K. and Yellen, G. (1996). Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 271. 653-656.

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

Bezanilla, F., Perozo, E., Papazian, D.M. and Stefani, E. (1991). Molecular basis of gating charge immobilization in *Shaker* potassium channels. *Science* 254:679-683

Brown, A.M. (1993). Functional bases for interpreting aminoacid sequences of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* 22:173-198.

Busch, A.E., Hurst, R.S., North, R.A., Adelman, J.P. and Kavanaugh, M.P. (1991). Current inactivation involves a histidine residue in the pore of a rat lymphocyte K channel RGK5. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:1384-1390.

Cambell, D.T. (1982). Do protons block Na<sup>+</sup> channels by binding to a site outside the pore? *Nature* 298:165-167.

- Castellano, A. and López-Barneo, J. (1991). Sodium and calcium currents in dispersed mammalian septal neurons. *J. Gen. Physiol.* 97:303-320.
- Castellano A, Molina A, Mellström B, Naranjo JR, López-Barneo J. (1996). A neural K<sup>+</sup> channel transcript encodes for a regulatory alfa subunit. *Eur. J. Neurosci.* S9: 14.
- Castellano, A., Chiara, M.D., Mellström, B., Molina, A., Monje, F., Naranjo, J.R. and López-Barneo, J. (1997). Identification and functional characterization of a K<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunit with regulatory properties specific to brain. *J. Neurosci.* 17:4652-4661
- Catterall, W.A., (1998). Structure and function of Voltage-sensitive ion channels. *Science* 242: 50-61.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chandler, W.K. and Meves, H. (1965). Voltage-clamp experiments on internally perfused giant axons. *J. Physiol.* 180:788-820.
- Chandy, K.G. and Gutman, G.A. (1993). Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends. Pharmacol. Sci.* 14:434.
- Chen, T.Y., Peng, Y.W., Dhallan, R.S., Ahamed, B., Reed, R.R. and Yau K.W (1993). A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362:6422 754-767.
- Chiara, M.D., Monje, F., Castellano, A., López-Barneo, J. (1998). Molecular determinants of Kv2 channel modulation by a related regulatory  $\alpha$ -subunit (Kv2.3). *Eur. J. Neurosci.* S10: 114.
- Choi, K.L., Aldrich, R.W. and Yellen, G. (1991). Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5092-5095.
- Chouinard, S.W., Wilson, G.F., Schlingens, A.K., Ganetzky, B. (1995). A potassium channel  $\beta$ -subunit related to the aldo-keto reductase superfamily is encoded by the *Drosophila* Hiperkinetic locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6762-6767.
- Christie, M.J., Adelman, J.P., Douglass, J. and North, R.A. (1989). Expression of a cloned rat brain potassium channel in *Xenopus* oocytes. *Science* 244:221-224.

- Christie, M.J., North, R.A., Osborne, P.B., Douglass, J., Adelman, J.P. (1990). Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 2:405-411.
- Connor, J.P., Stevens C.F. (1971). Voltage-clamp studies of a transient outward current in gastropod neural somata. *J. Physiol. (Lond)* 213:1 21-30.
- Covarrubias, M., Wei, A.A. and Salkoff, L. (1991). *Shaker*, *Shal*, *Shab* and *Shaw* express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* 7:763-773.
- Dani, J. and Eisenman, G. (1987). Monovalent and divalent cation permeation in acetylcholine receptor channels. Ion transport related to structure. *J. Gen. Physiol.* 89:959-983.
- Deal, K.K., Lovinger, D.M. and Tamkun, M.M. (1994). The brain Kv1.1 potassium channel: *in vivo* and *in vitro* studies on subunit assembly and post-transcriptional processing. *J. Neurosci.* 14:1666-1676.
- De Biasi, M., Drewe, J.A., Kirsh, G.E., Brown, A.M. (1993a). Histidine substitution identifies a surface position and confers Cs<sup>+</sup> selectivity on a K<sup>+</sup> pore. *Biophys. J.* 65: 1235-1242
- De Biasi, M., Hartmann, H.A., Drewe, J.A., Tagliatela, M., Brown, A.M. and Kirsh, G.E. (1993b). Inactivation determined by a single site in the K channel pore. *Pflügers Arch.* 442:354-363.
- Demo, S. and Yellen, G. (1991). The inactivating gate of *Shaker* K<sup>+</sup> channels behaves like an open-channel blocker. *Neuron* 7:743-753.
- Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait B.T. and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Drewe, J.A., Verma, S., Frech, G. and Joho, R.H. (1992). Distinct spatial and temporal expression patterns of K<sup>+</sup> channels mRNAs from different subfamilies. *J. Neurosci.* 12:538-548.
- Du, J., Tao-Chang, J-H., Zefars, P. and McBain, C.J. (1998). The K<sup>+</sup> channel, Kv2.1, is apposed to astrocytic processes and is associated with inhibitory postsynaptic membranes in hippocampal and cortical principal neurons and inhibitory interneurons. *Neuroscience* 84: 37-48.
- Edsall, J.T. and McKenzie, H.A. (1978). Water and proteins. I. The significance and structure of water; its interaction with electrolytes and non-electrolytes. *Adv. Biophys.* 10:137-207.

- Fernández, A.M., Molina, A., Encinar, J.A., Gavilanes, F., López-Barneo, J. and González-Ros, J.M. (1996). Synthesis of a photoaffinity labeling analogue of the inactivating peptide of the *Shaker* B potassium channel. *FEBS Lett.* 398:81-86.
- Frankenhaeuser, B. and A.L. Hodgkin (1957). The action of calcium on the electrical properties of squid giant axons. *J. Physiol.* 37:218-244.
- Frech, G.F., VanDongen, A.M.J., Schuster, G., Brown, A.M. and Joho, R.H. (1989). A novel potassium channel with delayed rectifiers properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature* 340: 642-645.
- Gilly, W.F. and Armstrong, C.M. (1982). Slowing of sodium channel opening kinetics in squid axon by extracellular zinc. *J. Gen. Physiol.* 79: 935-964.
- Guy, H.R., and Conti, F. (1990). Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends. Neurosci.* 13: 201-206
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85-100.
- Hansen, A.J. and Zeuthen, T. (1981). Extracellular ion concentration during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol. Scand.* 113:437-445.
- Hartmann, H.A., Kirsh, G.E., Drewe, J.A., Tagliatela, M., Joho, R.H. and Brown, A.M. (1991). Exchange of conduction pathways between two related K<sup>+</sup> channels. *Science* 251:942-944.
- Heginbotham, L. and Mackinnon, R. (1992). The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 8: 483-491.
- Heginbotham, L., Abramson, T. and Mackinnon, R. (1992). A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K<sup>+</sup> channels. *Science* 258:1152-1155.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. and Mackinnon, R. (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* 66:1061-1067.
- Heinemann, S. H., Konnerth, A., Pumain, R. and Wadman, W.J. (1986). Extracellular calcium and potassium concentration changes in chronic epileptic brain tissue. *Adv. in Neurol.* 44:641-661.

Heinemann, S. H., Rettig, J., Wunder, F. and Pongs, O. (1992). Molecular and functional characterization of a rat brain Kvb3 potassium channel subunit. *FEBS Lett.* 377:383-389.

Hille, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. (2nd ed.), Sinauer Associates Inc. Sunderland, Mass., USA.

Hodgkin, A.L. and Huxley, F.A. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117:500-544.

Hodgkin, A.L. and Keynes, R.D. (1955). The potassium permeability of giant nerve fibre. *J. Physiol.* 128:61-68.

Holmgren, M., Jurman, M.E. and Yellen, G. (1996). N-type inactivation and the S4-S5 region of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 108: 195-206.

Holmgren, M., Smith, P. and Yellen, G. (1997). Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating. *J. Gen. Physiol.* 109: 527-535.

Hoshi, T., Zagotta, W.N. and Aldrich, R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanism of *shaker* potassium channel inactivation. *Science* 250: 533-538.

Hoshi, T., Zagotta, W.N. and Aldrich, R.W. (1991). Two types of inactivation in *Shaker* potassium channels; effects of alterations in the carboxyl terminal region. *Neuron* 7: 547-556.

Hoshi, T., Zagotta, W.N. and Aldrich, R.W. (1994). *Shaker* potassium channel gating I: Transitions near the open state. *J. Gen. Physiol.* 103: 249-278.

Huang, E.P. (1997). Metal ions and synaptic transmission: Think zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 13386-13387.

Hugnot, J.P., Salinas, M., Lessage, F., Guillemare, E., Weille, Heurteaux, J.C., Mattei M.G. and Lazdunski, M. (1996). Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards *Shab* and *Shaw* channels. *EMBO J.* 15: 3322-3331.

Hurst, R.S., Toro, L. and Stefani, E. (1996). Molecular determinants of external barium block in *Shaker* potassium channels. *FEBS: Letters* 388: 59-65.



Hwang, P.M., Glatt, C.E., Brecht, D.S., Yellen, G. and Snyder, S.H. (1992). A novel K<sup>+</sup> channel with unique localization in mammalian brain: molecular cloning and characterization. *Neuron* 8:473-481.

Hwang, P.M., Fotuhi, M., . Brecht, D.S., Cunningham, A.M. and Snyder, S.H. (1993). Contrasting immunohistochemical localizations in rat brain of two novel K<sup>+</sup> channels of the Shab subfamily. *J. Neurosci.* 13: 1569-1576.

Isacoff, E.Y., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1990). Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* 345: 530-533.

Isacoff, E.Y., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1991). Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *Nature* 353:86-90.

Iverson L.E. and Rudy, B. (1990). The role of the divergent amino and carboxyl domains on the inactivation properties of potassium channels derived from the *Shaker* gene of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 10:9 2903-2916.

Jan, Y.N., Jan L.Y., Dennis, M.J. (1977). Two mutations of synaptic transmission in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 198:1130 87-108.

Jan LY, Jan YN (1994) Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371: 119-122.

Jegla, T. and Salkoff, L. (1997). A novel subunit for *Shaker* K<sup>+</sup> channels radically alters activation and inactivation. *J. Neurosci.* 17: 32-44.

Jerng, H.H. and Covarrubias, M. (1997). K<sup>+</sup> channel inactivation mediated by the concerted action of the cytoplasmic N- and C-terminal domains. *Biophys. J.* 72:1 163-174.

Kamb, A., Iverson, L.E. and Tanouye, M.A. (1987). Molecular characterization of *Shaker*, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* 50:405-413.

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

Kaplan, W.D. and Trout, W.E. (1969). Genetic characterization of *Drosophila Shaker* mutant. *Genetics* 61: 399-409.

- Knaus, H.G., García-Calvo, M., Kaczorowski, G.J. and García, M.L. (1995). Subunit composition of the high-conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the *mSlo* and *slow poke* family of potassium channels. *J. Biol. Chem.* 269: 3921-3924.
- Kondoh, S., Ishi, K., Nakamura, Y., Taira, N. (1997). A mammalian transient type K<sup>+</sup> channel, rat Kv1.4, has two potential domains that could produce rapid inactivation. *J. Biol. Chem.* 272: 19333-18338.
- Kramer, J.W., Post, M.A., Brown, A.M., Kirsch, G.E. (1998). Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 alpha-subunits. *Am. J. Physiol.* 274: C1501-1510.
- Kreusch, A., Pfaffinger, P., Stevens, C.F. and Choe S. (1998). Crystal structure of the tetramerization domain of the *Shaker* potassium channel. *Nature* 392: 945-948.
- Kumpf, R.A. and Dougherty, D.A. (1993). A mechanism for ion selectivity in potassium channels: computational studies of cation-p interactions. *Science* 261: 1708-1710.
- Kwang, P.N., Glatt, C.E., Brecht, D.S., Yellen, G., Snyder, S.H. (1992). A novel K<sup>+</sup> channel with unique localization in mammalian brain: molecular cloning and characterization. *Neuron* 8: 473-481.
- Labarca, P. and MacKinnon, R. (1992). Permeant ions influence the rate of slow inactivation in *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *Biophys. J.* 66: 667-673.
- Larsson, H.P., Baker, O.S., Dhillon, D.S. and Isacoff, E.Y. (1996). Transmembrane movement of the *Shaker* K<sup>+</sup> channel S4. *Neuron* 16: 387-397.
- Latorre, R. and Miller, C. (1983). Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membr. Biol.* 71: 11-30.
- Levy, D.I. and Deutsch, C. (1996). Recovery from C-type inactivation is regulated by extracellular potassium. *Biophys. J.* 70: 798-805.
- Li, M., Jan, Y.N. and Jan L.Y. (1992). Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the *Shaker* potassium channel. *Science* 257: 1225-1230.
- Liman, E.R., Hess, P., Weaver, F. and Koren, G. (1991). Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 353: 752-756.

- Liman, E.R. and Buck, L.B. (1994). A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confer high sensitivity to cAMP. *Neuron* 13:3 611-621.
- Liu, Y., Jurman, M.E. and Yellen, G. (1996). Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K channel during gating. *Neuron* 16: 859-867.
- Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M.E. and Yellen, G. (1997). Gated access to the pore of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 19: 175-184.
- Llinás, R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242: 1654-1664.
- Loots, E., Isacoff, E.Y. (1998). Protein rearrangements underlying slow inactivation of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 112:4 377-389.
- López, G.A., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1994). Evidence that the S6 segment of the *Shaker* voltage-dependent K<sup>+</sup> channel comprises part of the pore. *Nature* 367: 179-182.
- López-Barneo, J. (1991). Voltage-dependent ionic channels: "whole-cell" recording by patch techniques. *Cell Membrane Transport.*, Yudilevich, D.L. et al. eds., pp 215-237. New York: Plenum.
- López-Barneo, J., Hoshi, T.W., Heinemann, S.H. and Aldrich, R. (1993). Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channel. *Recep. Ch.* 1: 61-71.
- Luneau, C.J., Williams, B., Marshall, J., Levitan, E.S., Oliva, C., Smith, J.S., Antanavage, J., Folander, K., Stein, R.B., Swanson, R., Kaczmarek, L.K., Buhrow, S.A. (1991). Alternative splicing contributes to K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3932-3936.
- McCormack, K., McCormack, T., Tanouye, M., Rudy, B and Stühmer, W. (1995). Alternative splicing of the human *Shaker* K<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 gene and functional expression of the  $\beta$ 2 gene product. *FEBS Lett.* 370: 32-36.
- McGehee, D.S., Role, L.W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 521-546.
- MacKinnon, R. and Miller, C. (1989). Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* 245: 1382-1385.

- MacKinnon, R., Latorre, R. and Miller, C. (1989). Role of surface electrostatics on the operation of a high conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. *Biochemistry* 28: 8092-8099.
- MacKinnon, R. and Yellen, G. (1990). Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated  $\text{K}^+$  channels. *Science* 250: 276-279.
- MacKinnon, R. (1991a). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350: 232-235.
- MacKinnon, R. (1991b). Using mutagenesis to study potassium channel mechanisms. *J. Bioenerg. Biomem.* 23: 647-663.
- MacKinnon, R., Cohen, S.L., Kuo, A., Lee, A. and Chait, B.T. (1998). Structural conservation in prokaryotic and eucaryotic potassium channels. *Science* 280: 106-109.
- McManus, O.B., Pallanck, L., Helms, L.M.H., Swanson, R. and Leonard, R.J. (1995). Functional role of the  $\beta$ -subunit of the high conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. *Neuron* 14: 645-650.
- Mannuzzu, L.M., Moronne, M.M. and Isacoff, E.Y. (1996). Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* 271: 213-216.
- Marcos, E. and Ribas, J. (1995). Kinetics of plasma potassium concentration during exhausting exercise in trained and untrained men. *Eur. J. Appl. Physiol.* 71: 207-214.
- Marten, I., Hoshi, T. (1998). The N-terminus of the potassium channel KAT1 controls voltage-dependent gating by altering the membrane electric field. *Biophys. J.* 74: 2953-2962.
- Matteson, D.R. and Swenson, R.P. (1986). External monovalent cations that impede the closing of K channels. *J. Gen. Physiol.* 87: 795-816.
- Miller, C. (1996). The long pore gets molecular. *J. Gen. Physiol.* 107: 445-447.
- Molina, A., (1997). Regulación Estructural y Funcional de Canales de Potasio por Mutaciones en el Poro y una Subunidad Alfa Reguladora (Tesis Doctoral). Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla.

- Molina, A., Castellano, A. and López-Barneo, J. (1997). Pore mutations in *Shaker* K channels distinguish between the sites of TEA blockade and C-type inactivation. *J. Physiol.* 499: 361-367.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-1221.
- Murakoshi, H. and Trimmer, J.S. (1999). Identification of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel as a major component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19: 1728-1735.
- Murrell-Lagnado, R.D. and Aldrich, R.W. (1993). Interaction of the amino terminal domains of *Shaker* K channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. *J. Gen. Physiol.* 102: 949-976.
- Ogielska, E.M., Zagotta, B.N., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Haab J. and Aldrich, R.W. (1995). Cooperative Subunit Interactions in C-Type Inactivation of K Channels. *Biophys. J.* 69: 2449-2457.
- Olcese, R., Latorre, R., Toro, L., Bezanilla, F., Stefani, E. (1997). Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in *Shaker* K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* 110:5 579-589.
- Pfaffinger, P.J., DeRubeis, D. (1995). *Shaker* K<sup>+</sup> channel T1 domain self-tetramerizes to a stable structure. *J. Biol. Chem.* 270:48 28595-28600
- Panyi, G., Sheng, Z. and Deutsch, C. (1995). C-type inactivation of voltage gated K<sup>+</sup> channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys. J.* 69: 896-903.
- Papazian, D.M., Schwartz, T.L., Tempel, B.L., Timpe, L.C., Jan, L.Y. and Yan, Y.N. (1987a). Cloning of genomic and complementary DNA of *Shaker*, a putative potassium channel from *Drosophila*. *Science* 237: 749-753.
- Papazian, D.M., Timpe, L.C., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1987b). Alterations of voltage dependence of *Shaker* potassium channels by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305-310.
- Papazian, D.M., Shau, X.M., Seoh, S.A., Mock, A.F., Huang, Y. and Wainstock, D.M. (1995). Electrostatics interactions of S4 voltage sensor in *Shaker* K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 14:1293-1301.

- Parcej, D.N., Scott, V.E.S. and Dolly, J.O. (1992). Oligomeric properties of  $\alpha$ -dendrotoxin-sensitive potassium ion channel purified from bovine brain. *Biochem.* 31: 11084-11088.
- Pardo, L.A., Heinemann, S.H., Terlau, H., Ludewig, U., Lorra, C., Pongs, O. and Stühmer, W. (1992). Extracellular  $K^+$  specifically modulates a rat brain  $K^+$  channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2466-2470.
- Pascual, J.M., Shieh, C.C., Kirsch, G.E., Brown, A.M. (1995). Multiple residues specify external tetraethylammonium blockade in voltage-gated potassium channels. *Biophys. J.* 69: 428-434.
- Pascual, J.M., Shieh, C.C., Kirsch, G.E., Brown, A.M. (1997). Contribution of the  $NH_2$  terminus of Kv2.1 to channel activation. *Am. J. Physiol.* 273: C1849-1858.
- Patel, A.J., Lazdunski, M. and Honoré, E. (1997). Kv1.2/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier  $K^+$  channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *EMBO J.* 16: 6615-6625
- Perozo, E., Cortes, M.D., Cuello, L.G. (1998). Three-dimensional architecture and gating mechanism of a  $K^+$  channel studied EPR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* 5:6 459-469
- Pongs, O., Kecskemethy, N., Muller, R., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H.H., Canal, I., Llamazares, S. and Ferrús, A. (1988). *Shaker* encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* 7: 1087-1096.
- Pongs, O. (1992). Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol. Rev.* 72: S69-S88.
- Pongs, O. (1995). Regulation of the activity of voltage-gated potassium channels by  $\beta$ -subunits. *J. Neurosci.* 7: 137-146.
- Post, M.A., Kirsch, G.E., Brown, A.M. (1996). Kv2.1 and electrically silent Kv6.1 potassium channel subunits combine and express a novel current. *FEBS Lett.* 399: 177-182.
- Prasher, D.S., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
- Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O. and Pongs, O. (1994). Inactivation properties of voltage-gated potassium channels altered by the presence of  $\beta$ -subunit. *Nature* 369: 289-294.

- Robertson, B. and Owen, D.G. (1993). Pharmacology of a cloned potassium channel from mouse brain (MK-1) expressed in CHO cells: effects of blockers and 'inactivation peptide'. *Brit. J. Pharmacol.* 109: 725-735.
- Roeper, J., Sewing, S., Zhang, Y., Sommer, T., Wanner, S.G., Pongs, O. (1998). NIP domain prevents N-type inactivation in voltage-gated potassium channels. *Nature* 391: 390-393.
- Rogawski, M.A. (1985). The A-current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it ?. *Trends. Neurosci.* 8: 214-219.
- Rudy, B. (1988). Diversity and ubiquity of K<sup>+</sup> channels. *Neurosci.* 25:729-749.
- Rudy, B., Kentros, C. and Vega-Sáenz de Miera, E. (1991). Families of potassium channel genes in mammals: towards an understanding of the molecular basis of potassium channel diversity. *Mol. Cel. Neurosci.* 2:89-102.
- Ruppertsberg, J.P., Schrötter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S. and Pongs, O. (1990). Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 345:535-538.
- Sakmann, B. and Neher, E. (2nd. ed., 1996). *Single Channel Recording*. New York: Plenum.
- Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J.P. and Lazdunski, M. (1997a). New modulatory  $\alpha$  subunit for mammalian *Shab* K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chemist.* 272: 24371-24379.
- Salinas, M., Weille, J., Guillemare, E., Lazdunski, M., and Hugnot J.P. (1997b). Modes of regulation of *Shab* K<sup>+</sup> channel activity by the Kv8.1 subunit. *J. of Biol. Chemist.* 272: 8774-8780.
- Salkoff, L., Baker, K., Buttler, A., Covarrubias, M., Pak, M.D. and Wei, A. (1992). An essential set of K<sup>+</sup> channels conserved in flies, mice and humans. *Trends. Neurosci.* 15: 161-166.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Schönherr R, Heinemann SH (1996). Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifying potassium channel. *J Physiol* 493: 635-642.

- Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Papazian, D.M., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1988). Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*. *Nature* 331: 137-142.
- Scott, V.E.S., Rettig, J., Parcej, D.N., Keen, J.N., Findlay, J.B.C. and Pongs, O. (1994). Primary structure of a  $\beta$ -subunit of  $\alpha$ -dendrotoxin-sensitive K<sup>+</sup> channels from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1637-1641.
- Seoh, S.A. and Papazian, D.M. (1995). Mutation at D447 in the P region of Shaker K<sup>+</sup> channels accelerate C-type inactivation. *Biophys. J.* 68: A35.
- Seoh, S.A., Sigg, D., Papazian, D.M. and Bezanilla, F. (1996). Voltage sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16: 1159-1167.
- Shahidullah, M., Hoshi, N., Yokoyama, S., Higashida, H. (1995). Microheterogeneity in heteromultimeric assemblies formed by Shaker (Kv1) and Shaw (Kv3) subfamilies of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 261:1362 309-317.
- Shen, N.V., Pfaffinger, P.J. (1995). Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated potassium channels subunit proteins. *Neuron* 14: 625-633.
- Sheng, M., Liao, Y.J., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1993) Presynaptic A current based on heteromultimeric K<sup>+</sup> channels detected *in vivo*. *Nature* 365: 72-75.
- Slessinger, P.A., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1993). The cytoplasmic loop joining S4 and S5 forms part of the Shaker pore. *Neuron* 11: 739-749.
- Spector, P.S., Curran, M.E., Zou, A., Keating, M.T., Sanguinetti, M.C. (1996). Fast inactivation causes rectification of the I<sub>Kr</sub> channel. *J. Gen. Physiol.* 107: 611-619.
- Stephens, G.J. and Robertson, B. (1995). Inactivation of the cloned potassium channel Kv1.1 by the human Kv3.4 'ball' peptide and its chemical modification. *J. Pharmacol.* 484.1: 1-13.
- Stühmer, W., Conti, F., Stocker, M., Sakmann, B., Seeburg, P., Baumann, A., Grupe, A. and Pongs, O. (1988). Potassium channels expressed from rat brain cDNA have delayed rectifier properties. *FEBS Lett.* 242: 199-206.
- Stühmer, W., Ruppersberg, J.P., Schröter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Giese, K.P., Perschke, A., Baumann, A. and Pongs, O. (1989). Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.* 8: 3235-3244.



- Scannevin, R.H., Murakoshi, H., Rhodes, K.J. and Trimmer, J.S. (1996). Identification of a cytoplasmic domain important in the polarized expression and clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel. *J. Cell. Biol.* 135: 1619-1632.
- Swenson, R.P. and Armstrong, C.M. (1981). K<sup>+</sup> channels close more slowly in the presence of external K<sup>+</sup> and Rb<sup>+</sup>. *Nature* 291: 427-429.
- Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1987). Sequence of a probable potassium channel component encoded at *Shaker* locus of *Drosophila*. *Science* 237: 770-775.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stühmer, W., Pongs, O., Ludwig, J. (1997). Amino terminal-dependent gating of the potassium channel rat *eag* is compensated by a mutation in the S4 segment. *J. Physiol.* 502: 537-543.
- Timpe, L.C., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1988). Four cDNA clones from the *Shaker* locus of *Drosophila* induce kinetically distinct A-type potassium currents in *Xenopus*. *Neuron* 1: 659-667.
- Trimmer, J.S. (1991). Immunological identification and characterization of a delayed rectifier K<sup>+</sup> channel polypeptide in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10764-10768.
- Trout, W.E. and Kaplan, W.D. (1973). Genetic manipulation of motor output in *Shaker* mutants of *Drosophyla*. *J. Neurol.* 4: 495-512.
- Tseng-Crank, J., Yao, J., Berman, M.F., Tseng, G.N. (1993). Functional role of the NH<sub>2</sub>-terminal cytoplasmic domain of a mammalian A-type K channel. *J. Gen. Physiol.* 102: 1057-1083.
- Ureña, J., Mateos, J.C. and López-Barneo, J. (1989). Low cost system for automated acquisition, display and analysis of transmembrane ion current. *Med. Biol. Eng. Biocomp.* 27: 94-98.
- VanDongen, A.M.J., Frech, G.C., Drewe, J.A., Joho, R.H., Brown, A.M. (1990). Alteration and restoration of K<sup>+</sup> channel function by deletions at the N- and C-termini. *Neuron* 5: 433-443.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N., Lazdunsky, M. (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 270: 27411-27414.

- Wang, H., Kunkel, D.D., Martin, T.M., Schwartzkroin, P.A., Tempel, B.L. (1993). Heteromultimeric K<sup>+</sup> channels in terminal and juxta-paranodal regions of neurons. *Nature* 365: 75-79.
- Weiser, M., Vega-Sáenz de Miera, E., Kentros, C., Moreno, H., Franzen, L., Hillman, D., Baker, H. and Rudy, B. (1994). Differential expression of *Shaw*-related K<sup>+</sup> channels in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 14: 949-972.
- Westbrook, G. L., Mayer, M. L. (1987). Micromolar concentration of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 328: 640-643.
- Yang, N., A.L. George and Horn, R. (1996). Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 16: 113-122.
- Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T. and MacKinnon, R. (1991). Mutation affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 251: 939-941.
- Yellen, G., Sodickson, D., Chen, T-Y. and Jurman, M.E. (1994). An engineered cysteine in the external mouth of a K<sup>+</sup> channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys. J.* 66: 1068-1075.
- Yellen, G. (1997). Single channel seeks permeant ions for brief but intimate relationship. *J. Gen. Physiol.* 110: 83-85.
- Yu, W., Xu, J., Li, M. (1996). NAB domain is essential for the subunit assembly of both a-a and a-b complexes of *Shaker*-like potassium channels. *Neuron* 16: 441-453.
- Zagotta, W.N. and Aldrich, R.W. (1990). Voltage-dependent gating of *Shaker* A type potassium channels in *Drosophyla* muscle. *J. Gen. Physiol.* 95: 29-60.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T. and Aldrich, R.W. (1990). Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 250: 568-571.
- Zhao, B., Rassendren, F., Kaang, B.K., Furukawa, Y., Kubo, T. and Kandel, E.R. (1994). A new class of noninactivating K<sup>+</sup> Channels from *Aplysia* capable of contributing to the resting potential and firing patterns of neurons. *Neuron* 13: 1205-1213.
- Zhu, X., Netzer, R., Bölke, K., Schwaeizer, M., Rettig, J., Fehr, S., Pongs, O. (1998). Kv6.2, a new potassium channel  $\alpha$ -subunit with specific regulatory properties for the Kv2.1 channel. *Eur. J. Neurosci.* S10: 113.

## ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAc	ácido desoxirribonucleico complementario
Ch	Chimera = Quimera
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (células CHO)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
G/V	conductancia/voltaje
RNAc	ácido ribonucleico complementario
RNAm	ácido ribonucleico mensajero
NRD	N-Regulatory Domain (dominio N-regulador).
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RNA	ácido ribonucleico
TEA	tetraetilamonio

OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA  
LA CONSTRUCCION DE LOS DNAc QUIMERICOS

- OLIGO T7: 5' - AATACGACTCACTATAGG - 3'
- OLIGO 101: 3' - GCTGCTGAACGTTCAAGTGC - 5'
- OLIGO 126: 5' - CTGCGGATCCTGAAGCTGGGAAGG - 3'
- OLIGO 127: 5' - CAAGTTCTGCTTTAATAAGATCT - 3'
- OLIGO 128: 5' - CCTCAAGATCTGGACCAGACGTC - 3'
- OLIGO 137: 5' - C CTAGACGAATTCGGCCAGAGCACGGATAACCC - 3'
- OLIGO 138: 5' - GCCGAATTCCTGCTGGAGATTTTGGAG - 3'
- OLIGO 139: 5' - GGCATCGATGAACTCAGCATCGACTCC - 3'
- OLIGO 140: 5' - GCCGAATTCGTTGAGCAAGCTTAGCTC - 3'
- OLIGO 141: 5' - GAGTAGACACAGTTCGGCCTTAAGAAG - 3'
- OLIGO 145: 5' - CTATGGGGCATCGATGAGATCTA - 3'
- OLIGO 146: 5' - CGACGAATTCGGCTTCTCCAGCAG- 3'
- OLIGO 147: 3' - GCCGAATTCCTCCACAGCAGCCCGG - 5'
- OLIGO 150: 5' - CTCTGAATTCTATTTACCTTGAAAC - 3'
- OLIGO 152: 5' - CTTGTAGAATTCGGAGAAG - 3'
- OLIGO 155: 3' - GGAAGAATTCGGCTTCTCCAGAATATC - 5'
- OLIGO 156: 5' - GCCGAATTCGTTCGGTGGCCGCAAG - 3'
- OLIGO 157: 3' - GCCGAATTCGTCTAGGCTCTGCAGC - 5'
- OLIGO 158: 5' - GCCGAATTCACAAGGAGCAGAAG - 3'
- OLIGO 159: 3' - GTAGAATTCAGAGAAGCGATCATT - 5'

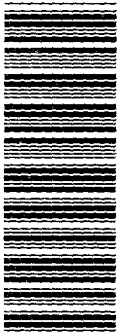
Nota: Las secuencias diana para los enzimas de restricción se indican en **negrita y subrayado**.

		<u>A</u>	
Kv2.3	MDLSPRNRPLLDSSSLDSGSLTSL..DSSVFCSEGEPLALGDCLTVNVGGSRFVLSQQALSCFPHTRLGKLAVVVASY		78
Kv2.1	.....MTKHG-RSTS--PPE..PMEIVR-KACSRVR-.....-LAHEVLWRT-DRL-R-----RDC....		59
		<u>B</u>	
Kv2.3	RRLGALAAAPSPLELCDDANPVDNEYFFDRSSQAFRYVLHYR.TGRLHVMEQLCALSFLOEIQYWGIDELSIDSCCRDR		157
Kv2.1	.....NTHD-L-QV---YSLE-----HPG--TSI-NF--.-----M--EM-----S--LD-----IYLE---QA-		132
		<u>S1</u>	
Kv2.3	YFRRKELSETLDFKKTDDQESQHESQDFSQGPCPTVRQKLWDILEKPGSSTAARIFGVISIIIFVAVSIVNMALMS.AE		236
Kv2.1	-HQK--QMNE.EL-REAETL..REREGEE-DNTC-AEK-K----L----N--V--K-LAI---M-IVL-TIALS-NTLP-		209
		<u>S2</u>	<u>S3</u>
Kv2.3	LSWLNL.....QLLEILEYVCISWFTGEFILRFLCVKDRCHFRLKVPNIIDLLAILPFYITL..		293
Kv2.1	-QS-DEFGQSTD.....NPQ-AHV-A---A---M-YL----SSPKWK-FKGPL-A-----Y-V-I..		273
		<u>S4</u>	<u>S5</u>
Kv2.3	LVESLSGSHTTQELENVGRLVQVLRLLRALRMLKLGRHSTGLRSLGMTITQCYEEVGLLLLFLSVGISIFSTIEYFAEQS		373
Kv2.1	FLT..ESNKSVLQFQ--R-V--IF-IM-I--I---A-----Q---F-LRRS-N-L---I---AM--M---SLVF---KD		351
		<u>PORO</u>	<u>S6</u>
Kv2.3	IPDTTFTSVPCAWWWATTSMTTVGYGDIRPDTTGTGKIVAFMCILSGILVLALPIAIINDRFSAFYTLKLKEAAVRQREA		453
Kv2.1	ED--K-K-I-ASF-----IT-----Y-K-LL----GGL-CIA-V--I-----P--VNN--EF-KEQ-RQ-K-IKR---		431
Kv2.3	LKKLTKNIATDSYISVNLRLDIYARSI..MEMLRLKG.....RERASTRSSGGDDFWF*		503
Kv2.1	-ERAKR-...G-IV-M-MK-AF----EM-DIVVE-N.....G-SIAKKDKVQ-NHLSPNKWKWTKRALSETSSSKSFE		501

Apéndice 3. Secuencia de aminoácidos de la subunidad Kv2.3 y alineamiento con la secuencia de la subunidad Kv2.1. Los aminoácidos se indican mediante el código de una única letra. Los guiones (-) indican la identidad respecto de la secuencia de Kv2.3 y los puntos (.) indican los espacios introducidos con objeto de mantener el alineamiento. Los números indican la posición de cada aminoácido dentro de la respectiva secuencia. Nótese que el extremo amino terminal de la subunidad Kv2.1 está incompleto. Las líneas sobre las secuencias indican la extensión de las cajas A y B del extremo amino terminal, los dominios transmembrana S1-S6 y la región del poro (PORO).



600672179



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Francisco José Monje Quiroga  
Subunidades  $\alpha$ -reguladoras de canales de  $K^+$ ;  
determinantes moleculares de la función de  $Kv2.3$ .

Sobresaliente con laude

(Unidad)

12

Julio

El Vocal

*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*

El Secretario

*[Signature]*

99

El Vocal

*[Signature]*

El Secretario

*[Signature]*