

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

# **Estudios de conducción y selectividad iónicas basados en un canal de potasio modelo: KcsA**

TESIS DOCTORAL

Estefanía Montoya Díaz

DIRECTORES DE TESIS

José Manuel González Ros  
Asia Fernández Carvajal  
José Antonio Poveda Larrosa

Elche, 2016



**D. Antonio V. Ferrer Montiel**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular y Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, **DA SU CONFORMIDAD** a la lectura de la Tesis Doctoral titulada: “**Estudios de conducción y selectividad iónicas basados en un canal de potasio modelo: KcsA**”, presentada por Dña. Estefanía Montoya Díaz.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 30 de Junio de 2016.

Fdo.: Prof. Dr. Antonio V. Ferrer Montiel





**D. José Manuel González Ros**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, **Dña. Asia Fernández Carvajal**, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y **D. José Antonio Poveda Larrosa**, Profesor Titular de Química-Física de la Universidad Miguel Hernández de Elche, **CERTIFICAN**: que la Tesis Doctoral titulada “**Estudios de conducción y selectividad iónicas basados en un canal de potasio modelo: KcsA**”, presentada por Dña. Estefanía Montoya Díaz, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche, a 30 de Junio de 2016.

Fdo.: Prof. Dr. José Manuel  
González Ros

Fdo.: Prof. Dra. Asia  
Fernández Carvajal

Fdo.: Prof. Dr. José Antonio  
Poveda Larrosa



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera dar las gracias al **Dr. José Manuel González Ros** por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en su laboratorio, por inculcar la importancia del rigor científico, por sus enseñanzas, así como por todos los años de dedicación al Instituto de Biología Molecular y Celular, dónde tantos alumnos hemos podido dar nuestros primeros pasos en la carrera investigadora.

También quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los codirectores. A la **Dra. Asia Fernández** por haber depositado su confianza en mí, por haberme guiado en mis primeros pasos con las técnicas electrofisiológicas y, especialmente, por su atención, sus consejos, tanto a nivel profesional como personal, y su apoyo en mi nueva etapa laboral. Al **Dr. José Antonio Poveda** le doy las gracias por sus numerosas y sabias aportaciones a este trabajo desde el principio, por todo el tiempo dedicado a resolver mis dudas y por su ayuda e interés en el desarrollo de los experimentos.

Durante este periodo he tenido la gran suerte de contar con el apoyo de dos grandes amigas, compañeras y profesionales, **Lourdes** y **Marcela**. Lu, gracias de todo corazón por haberme enseñado tanto, por todo el tiempo y esfuerzo que has dedicado a este trabajo, por tu paciencia, por tus ingeniosas ideas y por ayudarme en todo lo que he necesitado. Ha sido un placer trabajar y formar equipo contigo. Marce, gracias por tus consejos, por tus constantes ánimos, sobre todo en los momentos más difíciles, por enseñarme la importancia de la “relativización” y por compartir conmigo tantos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: **María Luisa, Jant, Cheo, Irene, Patri** y, especialmente, a **Eva**, por su excelente ayuda y su cariño. Gracias a todos por los buenos momentos compartidos.

Gracias a todo el equipo del IBMC: al director del Instituto, el **Dr. Antonio Ferrer**, a los **profesores** del programa de doctorado y al equipo de secretaría, **Javier, Carmen, Raquel** y a **May**, por su imprescindible ayuda con la burocracia.

Al **Dr. Andrés Morales**, gracias por su excelente evaluación de nuestros experimentos de electrofisiología, por sus consejos y por compartir su sabiduría con nosotros.

Quisiera agradecer a los **Dres. Luis Pardo y Walter Stühmer** por haberme acogido en su laboratorio en Göttingen, dónde pude profundizar en el análisis de los registros electrofisiológicos. También a mis compañeros y amigos **Diana, Álvaro, Adam, Camilo, Aura,**... por recibirme con los brazos abiertos y compartir conmigo un verano inmejorable.

Al **Dr. Joaquín Rueda**, por haberme dado la oportunidad de participar en el apasionante mundo de la Genética Clínica, por confiar en mí y por su apoyo en los últimos meses. A mis compañeros **Isabel, Antonio, Marina y Jessi**, gracias por enseñarme tanto y por vuestros ánimos.

También me siento muy afortunada por haber coincidido desde el primer día de Universidad con una gran persona y amiga. **Ali**, gracias por estar a mi lado en los buenos y en los malos momentos, por tu apoyo incondicional, incluso a pesar de la distancia, por entenderme siempre y por ser como una más de mi familia. Nada es lo mismo sin ti, ¡vuelve pronto!

Gracias a los compañeros del IBMC que ahora también son amigos. A **Reglita**, por contagiarnos a todos con su alegría y optimismo, a **Rocío**, por su apoyo y comprensión, y a **Henrique y Sakthi**, por todos los buenos momentos, las risas y las excursiones.

A todos mis **amigos**, por su apoyo a pesar de no entender muy bien a qué he dedicado tanto tiempo y esfuerzo. Especialmente a **Isa**, por su cariño, sus ánimos y por sacarme siempre una sonrisa.

A **Mari Carmen y a Pedro** por haberme cuidado y mimado tanto, sobre todo en esta última etapa.

Y, por último, pero no menos importante, he podido llegar hasta aquí gracias a un pilar fundamental en mi vida, mi familia. A los mejores **padres** del mundo, por ser el mejor ejemplo que podría tener en la vida, por inculcar en mí el valor del esfuerzo y la perseverancia, por vuestro apoyo incondicional, por todos vuestros sacrificios y por confiar siempre en mí. A mis **hermanos**, gracias por estar a mi lado y por nuestras risas-peleas-risas porque, increíblemente, hacen que me olvide de mis preocupaciones. Y a **Rayco**, por ser mi compañero de vida, por tu apoyo incondicional, sobre todo estos últimos meses que han sido tan difíciles para mí, por tus cuidados, tu sentido del humor y por hacerme tan feliz.

***A mis padres***

***A mis hermanos***

***A Rayco***





# PREFACIO

El presente trabajo doctoral se ha desarrollado en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, con el apoyo de una beca de formación de personal investigador (FPI, BES-2009-014440) asociada al proyecto BFU2008-00602 del Ministerio de Ciencia e Innovación, y a un contrato de investigación asociado al proyecto BFU2011-25920 del Ministerio de Ciencia e Innovación de España.

Esta tesis doctoral, titulada “**Estudios de conducción y selectividad iónicas basados en un canal de potasio modelo: KcsA**”, se ha elaborado de acuerdo a la normativa de la Universidad Miguel Hernández de Elche para la “Presentación de tesis doctorales con un conjunto de publicaciones” y las “Normas para la obtención de la mención de Doctor Internacional” y se ha dividido en las siguientes partes:

- Resumen en español e inglés
- Introducción
- Objetivos
- Resumen de resultados
- Discusión global
- Conclusiones en español e inglés
- Anexo con la publicación científica seleccionada para formar parte de la presente Tesis Doctoral:

Renart ML\*, **Montoya E\***, Fernández AM, Molina ML, Poveda JA, Encinar JA, Ayala JL, Ferrer-Montiel AV, Gómez J, Morales A, González Ros JM. Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel. *Biochemistry*. 2012 May 8;51(18):3891-900.

- Anexo con dos manuscritos en vías de publicación:

**Montoya E\***, Renart ML\*, Giudici AM, Poveda JA, Fernández AM, Morales A, González Ros JM. Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering potassium channel selectivity. Enviado a *The Journal of Biological Chemistry* (8 Junio 2016).

Renart ML, **Montoya E**, Giudici AM, Poveda JA, Fernández AM, Morales A, González Ros JM. Selective exclusion and selective binding: A two-component strategy to define ion selectivity in KcsA, a model potassium channel. Manuscrito en preparación.

\* Both authors contributed equally.

La presente Tesis no incluye un apartado de “Materiales y Métodos”, puesto que dicha información se recoge en los artículos (apartado de “Anexos”). Aún así, se ofrece un resumen de las principales técnicas utilizadas en dichas publicaciones en el apartado “Metodología”.





# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>ACo</b>	Acetilcolina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CFTR</b>	Canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
<b>DDM</b>	Dodecil- $\beta$ -D-maltósido
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
<b>FS</b>	Filtro de selectividad de KcsA
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroxipiperazina-N-2'-etanosulfónico
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>KcsA</b>	Canal de potasio de <i>Streptomyces lividans</i>
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de disociación
<b>K<sub>ir</sub></b>	Canal de potasio rectificador de entrada
<b>K<sub>v</sub></b>	Canal de potasio activado por voltaje
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
<b>MthK</b>	Canal de potasio de <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDB</b>	Base de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SK</b>	Canal de potasio de baja conductancia
<b>TBA</b>	Tetrabutilamonio
<b>TEA</b>	Tetraetilamonio
<b>TFE</b>	2,2,2-trifluoroetanol
<b><math>t_m</math></b>	Temperatura del punto medio de desnaturalización térmica expresada en grados Centígrados
<b><math>T_m</math></b>	Temperatura del punto medio de desnaturalización térmica expresada en grados Kelvin
<b>TM1</b>	Hélice transmembrana 1 (o externa) de KcsA
<b>TM2</b>	Hélice transmembrana 2 (o interna) de KcsA
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>2xYT</b>	Medio de cultivo de extracto de levadura y triptona ( <i>Yeast Extract Tryptone</i> )

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN / ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1. Canales iónicos .....	7
2.1.1. Transporte iónico a través de la membrana plasmática .....	7
2.1.2. Principales descubrimientos sobre los canales iónicos .....	8
2.1.3. Propiedades y clasificación .....	9
2.1.4. Canalopatías .....	12
2.2. Canales de potasio .....	13
2.2.1. Características generales .....	13
2.2.2. Estructura general y selectividad de los canales de potasio .....	14
2.2.3. Clasificación de los canales de potasio .....	17
2.2.4. Canales de potasio activados por voltaje: tipos de inactivación .....	19
2.3. El canal de potasio KcsA .....	21
2.3.1. Aspectos generales .....	21
2.3.2. Estructura .....	23
2.3.3. Estabilidad química y térmica .....	29
2.3.4. Mecanismos de conducción iónica eficaz y selectiva .....	30
2.3.5. Características funcionales de KcsA .....	36
2.3.6. Estudios de unión de iones a KcsA .....	39
2.3.7. Presentación del trabajo de Tesis Doctoral .....	42
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>49</b>
4.1. Introducción .....	51
4.2. Mutagénesis dirigida por PCR .....	52
4.3. Expresión y purificación de KcsA .....	53
4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) .....	55
4.5. Espectroscopia de ultravioleta-visible .....	56
4.6. Espectroscopia de fluorescencia .....	56

4.7. Reconstitución de KcsA en liposomas gigantes multilamelares de asolectina .....	59
4.8. Electrofisiología .....	60
<b>5. RESUMEN DE RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
5.1. Unión de iones al filtro de selectividad de Kcsa estabilizado en una determinada conformación (condiciones de no competencia).....	67
5.2. Caracterización de la interacción entre iones conductores y no conductores y KcsA....	69
5.3. Unión de iones a sitios específicos del filtro de selectividad y en situación de competencia.....	71
<b>6. DISCUSIÓN GLOBAL .....</b>	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS .....</b>	<b>87</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
9.1. Publicación: <i>Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel</i> .....	111
9.2. Manuscrito en revisión: <i>Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering potassium channel selectivity</i> .....	123
9.3. Manuscrito en preparación: <i>Selective exclusion and selective binding: A two component strategy to define ion selectivity in KcsA, a model potassium channel</i> .....	165
9.4. <i>Curriculum vitae</i> .....	193

# 1. RESUMEN / ABSTRACT





Los canales de potasio son proteínas de membrana que participan en numerosos procesos fisiológicos, por lo que el conocimiento de su funcionamiento resulta primordial. Una de las propiedades más destacadas de este tipo de canales es su capacidad de conducir  $K^+$  a elevada velocidad, mientras mantienen la selectividad frente a otras especies iónicas. Sin embargo, no existe un consenso claro sobre los factores implicados en este mecanismo, el estudio de los cuales ha sido el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral.

Para abordar esta investigación se ha empleado como modelo de estudio el canal de potasio procariota KcsA, dada su similitud en cuanto a características estructurales y funcionales con los canales de potasio eucariotas y la disponibilidad de su estructura cristalográfica de alta resolución en presencia de distintas condiciones iónicas. Estas estructuras señalan que el filtro de selectividad del canal es capaz de adoptar distintas conformaciones (conductora o no conductora) en función de la concentración y tipo de ión presente. En esta Tesis Doctoral las principales técnicas empleadas han sido: la espectroscopía de fluorescencia para estudiar la estructura, estabilidad del canal y caracterizar los eventos de unión de cada ión y técnicas electrofisiológicas para analizar su actividad.

Los resultados indican que la formación de la conformación no conductora del filtro de selectividad estaría asociada a la unión de iones conductores con una elevada afinidad, lo que favorecería su selección, mientras que la conformación conductora sería inducida por la unión de estos iones con una baja afinidad permitiendo, de esta forma, la conducción iónica a elevada velocidad. De este modo, las transiciones entre las conformaciones no conductora y conductora del filtro de selectividad, así como las características de unión de los iones en cada conformación, son fundamentales para la regulación de la conducción y la selectividad iónicas en los canales de potasio.

Potassium channels are membrane proteins that are involved in many physiological processes, thus, the study of their function is essential. One of the main properties of these ion channels is their ability to select  $K^+$  ions over other ionic species, while permeating it at high rates. Nevertheless, the mechanisms underlying this phenomenon are not clearly understood, which have been the main objective of the present Doctoral Thesis.

The model potassium channel KcsA has been used in order to address this research, due to the high structural and functional similarities with eukaryotic potassium channels and the availability of its high-resolution crystal structure in the presence of different ionic conditions. These structures show that the channel selectivity filter adopts different conformations (conductive or nonconductive) depending on the ion type and its concentration. The main techniques used in this Doctoral Thesis were fluorescence spectroscopy in order to study KcsA structure, stability and characterizing ion binding events and electrophysiological techniques to analyze ion channel activity.

Results indicate that the formation of the nonconductive conformation of the selectivity filter is associated with high-affinity binding of permeant cations, favoring ion selectivity, while the formation of the conductive conformation is related to low-affinity binding of permeant cations, allowing ion conduction at high rates. Therefore, transitions between nonconductive and conductive selectivity filter conformations and the features of ion binding in each conformation are fundamental for ion permeation and selectivity in potassium channels.



## 2. INTRODUCCIÓN





### 2.1. Canales iónicos

#### 2.1.1. Transporte iónico a través de la membrana plasmática

La membrana plasmática está constituida por una bicapa lipídica que delimita la célula proporcionándole aislamiento y protección frente al medio externo. Dada su naturaleza lipídica, la bicapa es impermeable a la gran mayoría de solutos polares o cargados cuyo flujo entre el interior y exterior celular es imprescindible para su supervivencia, por lo que a lo largo de la evolución se han desarrollado estructuras que facilitan y regulan el tráfico de estos compuestos. Estas estructuras son proteínas integrales de membrana que se unen a la bicapa mediante enlaces no covalentes (interacciones hidrofóbicas) y se clasifican en dos grupos: los canales iónicos y las bombas. Las principales diferencias entre estas proteínas radican en el tipo de transporte y la velocidad con la que lo llevan a cabo. Las primeras permiten el flujo de iones a elevada velocidad a favor del gradiente electroquímico establecido entre el interior y el exterior de la célula (transporte pasivo), mientras que las bombas son capaces de aprovechar la energía procedente de ATP u otras fuentes para impulsar el flujo de iones a través de la membrana en contra de gradiente (transporte activo). De este modo, las bombas se encargan de mantener este gradiente electroquímico y, por lo tanto, el potencial de membrana, que tienden a disipar los canales iónicos (1;2).

La regulación del flujo de iones llevada a cabo por los canales iónicos es especialmente relevante en las células excitables que juegan un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos como la conducción nerviosa, la contracción muscular, la secreción hormonal, mecanismos sensoriales, el aprendizaje y la memoria (2). Dichas células (principalmente neuronas, células musculares y endocrinas) son capaces de responder ante determinados estímulos mediante la generación y propagación de señales eléctricas discontinuas denominadas potenciales de acción. La base molecular de este mecanismo se encuentra en los canales iónicos, encargados de modular el transporte de iones a través de la membrana (1;2).

### 2.1.2. Principales descubrimientos sobre los canales iónicos

Desde principios del siglo XX se han realizado los descubrimientos más importantes sobre el papel de los canales iónicos en la excitabilidad de las membranas biológicas, así como el funcionamiento y estructura de los mismos. En 1952 Alan Hodgkin y Andrew Huxley revolucionaron el conocimiento de la función neuronal a partir de sus estudios sobre la naturaleza del impulso nervioso en el axón gigante de calamar (3-5), por lo cual recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1963. En sus experimentos, emplearon la técnica de fijación de voltaje (*voltage clamp*), que permite medir la corriente que pasa a través de la membrana mientras se mantiene un nivel de voltaje determinado, utilizando un sistema electrónico de retroalimentación negativa y dos microelectrodos. Gracias a esta técnica descubrieron que en la membrana plasmática se producían cambios en la permeabilidad por  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de forma dependiente de voltaje. A partir de estos resultados propusieron un modelo cuantitativo que predecía con precisión la propagación del potencial de acción (6). Años más tarde, durante las décadas de los 60 y 70, diversos estudios farmacológicos revelaron que las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  detectadas por Hodgkin y Huxley eran bloqueadas mediante compuestos altamente selectivos como tetrodotoxina y tetraetilamonio (TEA) respectivamente, lo que llevó a sugerir que estas corrientes fluían a través de poros en la membrana denominados “canales de  $\text{Na}^+$ ” y “canales de  $\text{K}^+$ ” (7-9). En esta última década, también se produjo un gran avance en el conocimiento del funcionamiento de los canales iónicos de la mano de Erwin Neher y Bert Sakmann y el desarrollo de la técnica de fijación de membrana (*patch clamp*), por lo cual obtuvieron el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1991. Este método fue desarrollado a partir del *voltage clamp*, pero con la particularidad de que emplearon una pipeta de pequeño diámetro (1-3  $\mu\text{m}$ ) que se presionó sobre una célula aislando un pequeño parche de la membrana, lo que permitió medir la corriente que fluía a través de los canales individuales presentes en esta superficie (10;11). Más tarde, elaboraron un método para sellar la pipeta de vidrio a la membrana con una alta resistencia eléctrica (del orden de los gigaOhmios, por lo cual fue denominado gigasello) logrando, de esta forma, reducir el ruido de los registros y mejorar considerablemente la resolución de los pulsos rectangulares de corriente

correspondientes a las aperturas y cierres estocásticos de los canales iónicos (12). Hasta la década de los 70 la mayor parte del conocimiento acerca de los canales iónicos provenía de las técnicas electrofisiológicas, si bien, la información disponible sobre su estructura era limitada. No fue hasta 1982 cuando, gracias a los grandes progresos de la biología molecular, se consiguió clonar y secuenciar el primer canal iónico, la subunidad alfa del receptor nicotínico de acetilcolina (13;14). Finalmente, la siguiente gran revelación fue la obtención de la estructura de alta resolución del canal de potasio KcsA mediante cristalografía de rayos X en 1998 por el grupo de Roderick MacKinnon, por lo cual recibió el premio Nobel de Química en el año 2003 (15). Este hallazgo supuso una revolución en el conocimiento de los canales iónicos, ya que permitió establecer las bases estructurales de su funcionamiento (15) y marcó el comienzo de un periodo en el que se han obtenido numerosas estructuras de alta resolución de diferentes canales iónicos, como el canal procariota MthK (16), el canal regulado por voltaje  $K_v1.2$  (17) o el canal rectificador de entrada  $K_{ir}3.2$  (18).

### 2.1.3. Propiedades y clasificación

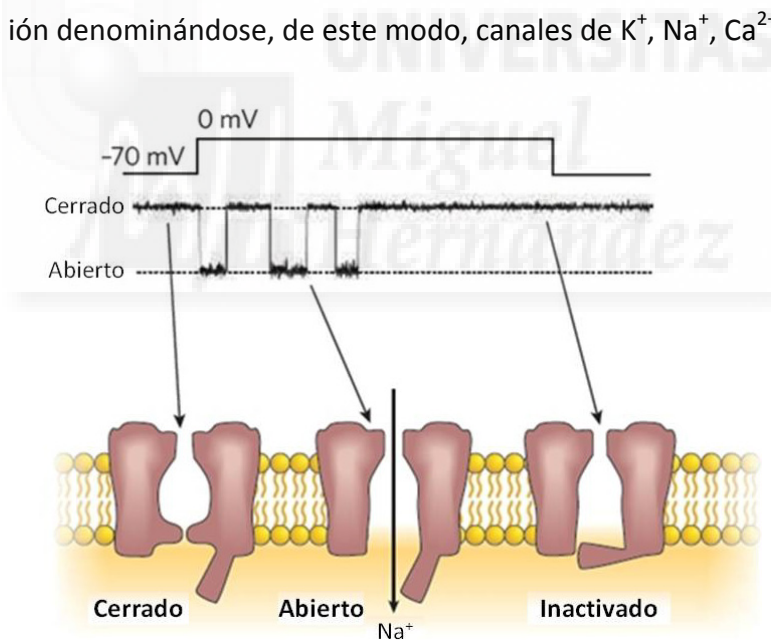
Los canales iónicos son un grupo diverso de proteínas integrales de membrana, generalmente oligoméricas, cuyas subunidades se organizan alrededor de un poro central acuoso por donde fluyen los iones a favor de gradiente electroquímico. A pesar de su heterogeneidad comparten ciertas propiedades (1;19):

1. Conducen iones a una elevada velocidad (aproximadamente  $10^7$ - $10^8$  iones/segundo) y de forma altamente selectiva.
2. Pueden estar en estado abierto o cerrado. Las transiciones entre estos estados (*gating*) implican cambios conformacionales en la proteína, de forma que en el primer estado los iones fluyen a través del canal a favor de gradiente electroquímico, mientras que en el segundo este flujo está impedido.
3. Las aperturas y los cierres son eventos estocásticos, pero la frecuencia con la que ocurren está influenciada por diferentes estímulos (voltaje, ligando o estímulos mecánicos).

De este modo, los canales iónicos se pueden clasificar en función del tipo de estímulo que regula su apertura (1;19):

### 1. Canales activados por voltaje

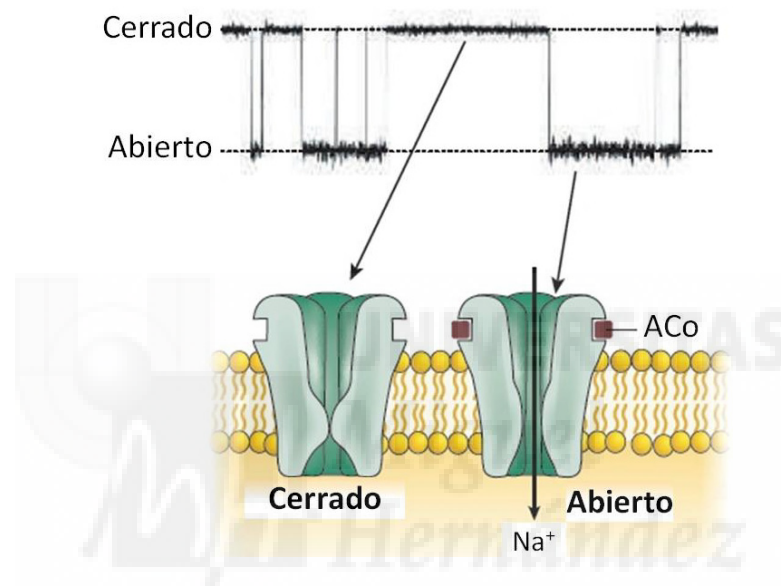
Estos canales responden a variaciones en el potencial de membrana, bien por despolarización o hiperpolarización, mediante una serie de cambios conformacionales que producen la apertura del poro (Figura 2.1). En algunos casos esta activación va seguida de otro cambio conformacional hacia un estado inactivado (inactivación), en el cual el canal no conduce iones. La recuperación desde el estado inactivado ocurre cuando la membrana vuelve a su potencial de reposo después de un periodo de tiempo variable. Este tipo de canales presenta un dominio en la región transmembrana constituido por una elevada cantidad de aminoácidos cargados altamente conservados capaces de percibir estos cambios en el potencial de membrana (dominio sensor de voltaje) (20). Generalmente, estos canales son altamente selectivos por un determinado ión denominándose, de este modo, canales de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Cl^-$ .



**Figura 2.1.** Representación esquemática de los diferentes estados en los que puede encontrarse un canal activado por voltaje. En este ejemplo, la despolarización de la membrana induce un cambio conformacional hacia el estado abierto. Más tarde se produciría un segundo cambio conformacional que produce la inactivación del canal. La repolarización de la membrana induciría la vuelta al estado cerrado. Figura adaptada de (21).

## 2. Canales activados por ligando

La unión de un determinado ligando a uno o más sitios específicos de la proteína produce un cambio conformacional que conlleva a la apertura del poro iónico (**Figura 2.2**). La exposición sostenida a elevadas concentraciones de ligando puede conducir al fenómeno de desensibilización, periodo en el cual el canal permanece en estado cerrado (19). Además, este tipo de canales suele ser menos selectivo que los activados por voltaje. A este grupo pertenecen los canales activados por neurotransmisores, como la acetilcolina, ácido glutámico o glicina (1).



**Figura 2.2.** Los canales activados por ligando conducen iones en respuesta a la unión de un determinado ligando. En este ejemplo, la unión de acetilcolina (ACo) a un sitio de unión específico del receptor de acetilcolina induce un cambio conformacional que conduce a la apertura del poro y el consiguiente flujo de iones. Figura adaptada de (21).

## 3. Canales mecanosensibles

La apertura de estos canales está regulada por estímulos mecánicos que afectan a la membrana que los rodea, tales como presión o tensión. Algunos ejemplos de este tipo de canales son el canal de potasio TRAAK, algunos miembros de la familia TRP o el canal bacteriano MscL (22).

### 2.1.4. Canalopatías

Como se ha mencionado anteriormente, los canales iónicos fueron estudiados por primera vez en neuronas, pero más tarde se identificaron en las membranas de todas las células eucariotas donde están implicados en diversos procesos como la proliferación y muerte celular, excitación nerviosa y muscular, regulación de la presión sanguínea, transducción sensorial, etc., así como en las de organismos procariota (19). En particular, en el genoma humano se han identificado alrededor de 350 genes que codifican para canales iónicos y subunidades reguladoras (23). Dada la relevancia de estas proteínas, determinadas mutaciones en los genes que las codifican pueden desencadenar trastornos fisiológicos severos y, por lo tanto, constituyen potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de los mismos. Estas enfermedades cuya etiología se encuentra en defectos en canales iónicos han sido englobadas en el término “canalopatía”, por ejemplo, diversas cardiopatías como el síndrome del QT Largo producido como consecuencia de anomalías en canales de potasio y sodio o la fibrosis quística originada por mutaciones en el gen CFTR que codifica para un canal de Cl<sup>-</sup> (21;24). La identificación de nuevas canalopatías se encuentra en constante expansión, por lo que se precisa profundizar en el conocimiento de la estructura y función de los canales iónicos para obtener, de este modo, nuevas estrategias terapéuticas frente a estas patologías.



## 2.2. Canales de potasio

### 2.2.1. Características generales

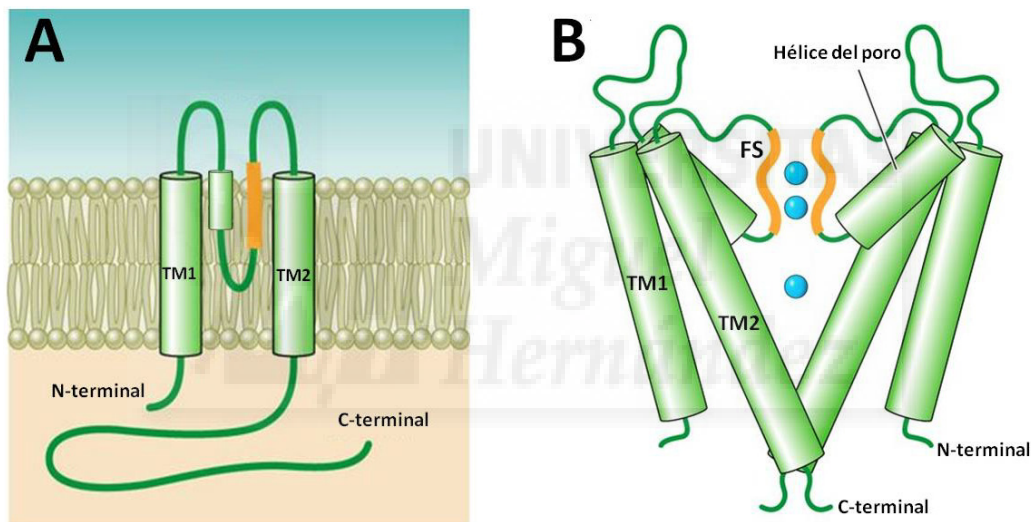
Los canales de potasio son un grupo diverso de canales iónicos que comparten una característica común: son proteínas oligoméricas que aportan un entorno energéticamente favorable para la conducción de  $K^+$  a través de la membrana a favor de gradiente electroquímico de forma rápida y altamente selectiva. Dado que, en general, las células presentan una concentración de  $K^+$  superior en el interior que en el exterior celular, la apertura de estos canales implica la salida de estos iones y, por lo tanto, un cambio del potencial de membrana hacia potenciales negativos. Esta hiperpolarización de la membrana es especialmente relevante durante la fase de terminación del potencial de acción en células excitables (25).

Los canales de potasio también se caracterizan por su ubicuidad, habiendo sido identificados en los tres grandes dominios de organismos (Eucarya, Bacteria y Archaea) (1). El hallazgo de más de 200 tipos de canales de potasio en estos dos últimos dominios ha llevado a pensar que, probablemente, estos canales comenzaron a evolucionar desde los principios de la vida en la Tierra (26). El papel que desempeñan en organismos procariota no es del todo conocido, aunque algunos estudios sugieren que puede estar relacionado con la regulación del volumen celular y el potencial de membrana (27;28). Sin embargo, se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre su papel en los organismos eucariotas, gracias a las cuales se ha demostrado que están implicados en una gran variedad de procesos como la secreción hormonal, regulación del volumen celular, contracción muscular y propagación del impulso nervioso (1).

Se han identificado más de 70 genes en mamíferos que codifican para canales de  $K^+$ , la mayoría de los cuales son sometidos a modificaciones post-transcripcionales (*splicing* alternativo), lo que supone una fuente adicional de diversidad de estas proteínas (25;26). Varias enfermedades genéticas como arritmias cardíacas, sordera, epilepsia, hiperinsulinismo congénito o alteraciones en la presión arterial han sido relacionadas con mutaciones en genes que codifican para estos canales (21;24;25).

### 2.2.2. Estructura general y selectividad de los canales de potasio

En general, los canales de potasio están constituidos por cuatro subunidades idénticas (formando un homotetrámero) o diferentes (heterotetrámero) que se disponen alrededor de un poro central acuoso. Cada subunidad está formada por: el dominio N-terminal, un número variable de hélices transmembrana (normalmente 2 o 6), la región del poro que conecta las dos últimas hélices, donde reside la hélice del poro y el filtro de selectividad, y el dominio C-terminal (15) (Figura 2.3). Asimismo, en algunos miembros de este grupo de proteínas se han identificado dominios reguladores que son sensibles a determinados estímulos y controlan la apertura del canal. Entre estos dominios se encuentran: sensores de voltaje transmembrana, dominios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  o dominios citoplasmáticos de canales  $\text{K}_{\text{ir}}$  (29).

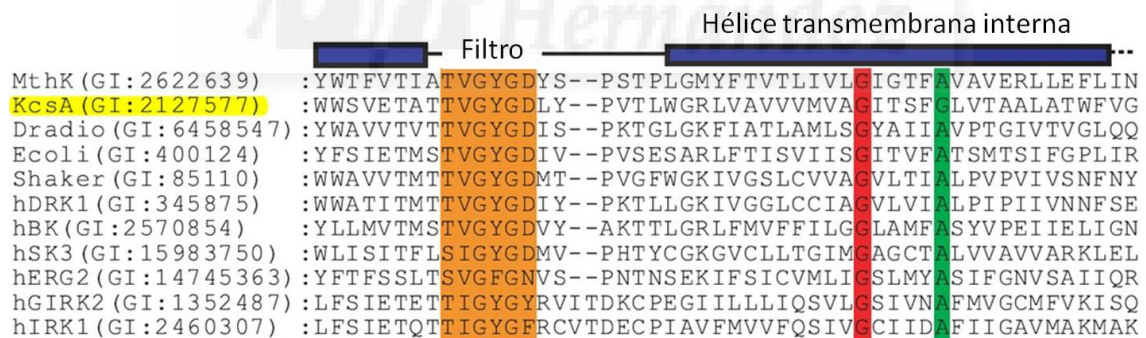


**Figura 2.3.** Estructura general de un canal de potasio. **A)** Modelo topológico de una subunidad de un canal de potasio formada por dos segmentos transmembrana (TM1 y TM2) y dominios N- y C-terminales intracelulares. Los canales rectificadores de entrada ( $\text{K}_{\text{ir}}$ ) y algunos canales procariota como KcsA están constituidos por este tipo de subunidades. **B)** Representación esquemática de dos de las cuatro subunidades que conforman un canal de potasio. Cada subunidad está formada por dos hélices transmembrana unidas por una hélice del poro y la secuencia del filtro de selectividad (FS, en naranja). Los iones de  $\text{K}^{+}$  están representados como esferas azules. Figura modificada de (30).

La estructura descrita en la Figura 2.3 representa la arquitectura básica de los canales de potasio, estando presente en todos los miembros de este grupo conocidos hasta la fecha (26;31). Algunos canales, como el canal procariota KcsA y ciertos miembros de la familia  $\text{K}_{\text{ir}}$ , están constituidos únicamente por esta estructura, mientras

que otros presentan estructuras adicionales como hélices transmembrana unidas al extremo N-terminal o dominios reguladores (26).

Asimismo, todos los canales de potasio contienen un segmento de su estructura primaria altamente conservado (32), la secuencia consenso T/SXGXGX (*signature sequence*) (Figura 2.4). La disposición tridimensional de las subunidades entorno a un poro central hace que las cuatro secuencias consenso estén enfrentadas y conformen estructuralmente el filtro de selectividad, que contiene los sitios de unión de iones  $K^+$  (Figura 2.3.B). Además, en la secuencia primaria de la hélice transmembrana interna hay dos posiciones que también están altamente conservadas: la primera es una glicina (G99 en KcsA, marcada en rojo en la Figura 2.4) que actúa como bisagra en los cambios conformacionales implicados en la apertura del canal y la segunda está conservada como glicina o alanina (G104 en KcsA, marcada en verde en la figura), ambos aminoácidos con cadena lateral corta proyectada hacia el vestíbulo intracelular para evitar obstaculizar el paso de iones (33). La conservación de estos aminoácidos en posiciones clave para el funcionamiento de los canales de potasio sugiere que estas proteínas comparten mecanismos de selectividad iónica y cambios conformacionales implicados en su apertura y cierre.



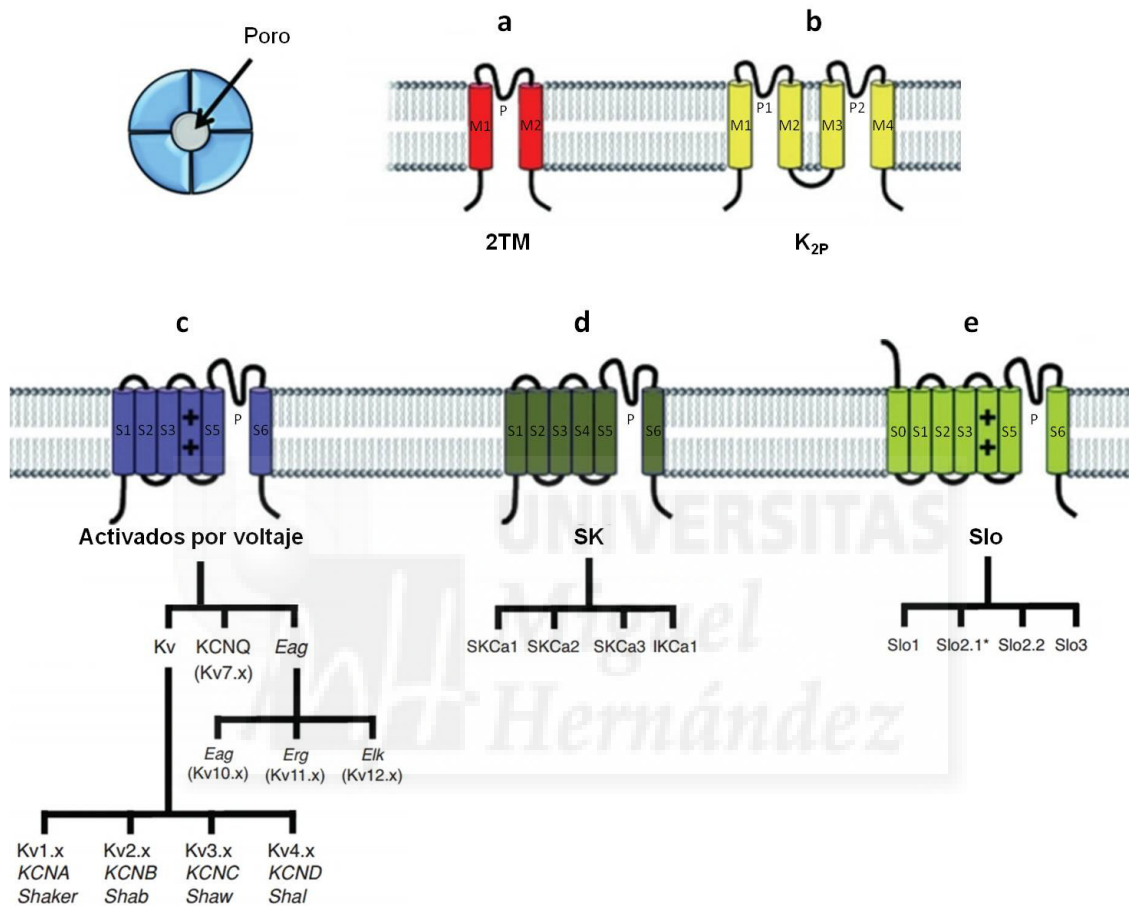
**Figura 2.4.** Secuencias de aminoácidos del filtro de selectividad y de la hélice transmembrana interna de diferentes canales de potasio, incluyendo canales de origen procariota y eucariota, canales con dos y seis segmentos transmembrana por subunidad, regulados por ligando y por voltaje. Las secuencias altamente conservadas están marcadas en naranja (filtro de selectividad), rojo (bisagra de gating) y verde (aminoácido del vestíbulo intracelular). MthK, canal de potasio de *M. thermautotrophicus*; KcsA, canal de potasio de *Streptomyces lividans* (marcado en amarillo); Dradio, canal de potasio de *Deinococcus radiodurans*; Ecoli, canal de potasio de *Escherichia coli*; Shaker, canal de potasio de *Drosophila melanogaster*; hDRK1, canal de potasio de *Homo sapiens*; hBK, canal BK de *H. sapiens*; hSK3, canal SK de *H. sapiens*; hERG2, canal de potasio de *H. sapiens*; hGIRK2, canal de potasio activado por proteína G de *H. sapiens*; hIRK1, canal de potasio de *H. sapiens*; Figura adaptada de (33).

El grupo del Dr. MacKinnon estudió el efecto de determinadas mutaciones en la secuencia consenso del canal de potasio activado por voltaje Shaker sobre la selectividad iónica (32). Estos experimentos demostraron que sustituciones específicas de algunos aminoácidos modifican la selectividad del canal, por lo tanto, concluyeron que esta región forma parte del filtro de selectividad. Sin embargo, no fue hasta la obtención de la estructura de alta resolución del canal KcsA cuando se pudieron examinar los mecanismos que controlan el proceso de selectividad iónica en los canales de potasio (*ver apartado 2.3*).

Los canales de potasio también pueden permear otros tipos de cationes monovalentes, aunque no con la misma eficacia. En general, se detectan corrientes en presencia de  $K^+$ ,  $Tl^+$ ,  $Rb^+$  y  $NH_4^+$  siguiendo la secuencia de permeabilidades relativas respecto a  $K^+$ :  $P_{K^+} \approx P_{Tl^+} > P_{Rb^+} > P_{NH_4^+}$ , con pequeñas variaciones entre las distintas familias, mientras que  $Na^+$  y  $Li^+$  no permear a través de estos canales (34-36) y hay discrepancias sobre la capacidad de conducción del ión  $Cs^+$  (35;37-40). A su vez, existen ciertas diferencias entre los canales de potasio en cuanto a su comportamiento respecto a  $Na^+$  en presencia o en ausencia de  $K^+$ . Algunos canales permiten la conducción de  $Na^+$  en ausencia de  $K^+$ , como  $K_v2.1$  (41), mutantes de KcsA (42) y mutantes de canales  $K_{ir}$  (43), mientras que conservan su elevada capacidad selectiva en presencia de  $K^+$ . Otros canales de potasio no conducen  $Na^+$  en estas condiciones, por ejemplo Shaker (34;44) y KcsA silvestre (45). Esta variabilidad de selectividades plantea cuestiones sobre la identidad molecular de los elementos que controlan estas diferencias entre canales de potasio, ya que presentan la misma secuencia consenso. Dado que está disponible la estructura de alta resolución del canal de potasio procariota KcsA, presenta la secuencia consenso TTVGYGD y propiedades de conducción en concordancia con las de canales de potasio eucariotas, esta proteína es un excelente modelo para comprender los mecanismos que intervienen en la selectividad iónica de estos canales (36).

## 2.2.3. Clasificación de los canales de potasio

Los canales de potasio pueden clasificarse en cinco familias principales en función de la composición de las subunidades que conforman el tetrámero y sus propiedades funcionales (**Figura 2.5**) (26):



**Figura 2.5.** Principales familias de canales de potasio clasificadas en función de la estructura de sus subunidades y sus propiedades funcionales. **a)** Canales 2TM, cuyas subunidades están formadas por dos hélices transmembrana (M1 y M2) unidas por una región del poro (P). **b)** Las subunidades de los canales K<sub>2P</sub> están constituidas por cuatro hélices transmembrana (M1-M4) y dos regiones del poro (P1 y P2). Las subunidades de los canales **c)** activados por voltaje y **d)** SK presentan seis hélices transmembrana (S1-S6) y una región del poro entre S5 y S6. **e)** Las subunidades que forman los canales Slo contienen siete dominios transmembrana (S0-S6), excepto los canales \*Slo2.x que presentan seis. El segmento S4 de los canales activados por voltaje y Slo está marcado con signos + para indicar su papel como sensor de voltaje. Figura adaptada de (26).

### a) Canales 2TM

Las subunidades de estos canales están formadas por dos hélices transmembrana (M1 y M2) unidas por la región del poro, siendo ésta la arquitectura básica de los canales de potasio. A esta familia pertenecen los canales rectificadores de entrada ( $K_{ir}$ ) y algunos canales procariotas como KcsA. Los canales  $K_{ir}$  se activan a potenciales negativos respecto al potencial de equilibrio de  $K^+$ , por lo que conducen  $K^+$  hacia el interior celular con mayor facilidad que hacia el exterior, ayudando de esta forma a restablecer el potencial de membrana en reposo. Se han identificado 15 genes en mamíferos que codifican para canales  $K_{ir}$  y se agrupan en 7 subfamilias ( $K_{ir1-7}$ ) (46).

### b) $K_{2P}$

Estos canales se caracterizan por ensamblarse en dímeros (en lugar de tetrámeros como el resto de canales de potasio) que se disponen alrededor de un único poro. Cada subunidad está formada por dos estructuras básicas 2TM unidas en tándem, es decir, cuatro segmentos transmembrana y dos regiones del poro en total. Son regulados por diversos factores como estímulos mecánicos,  $Ca^{2+}$ , pH, etc. Desde su descubrimiento se han identificado 15 miembros de esta familia en humanos y la mayoría de ellos funcionan como canales de fuga (es decir, canales activados de forma constitutiva). A esta familia pertenecen canales conocidos como TRAAK, TREK, TALK, TASK, TRESK, TWIK, KCNK y THIK. Los canales  $K_{2P}$  han sido identificados tanto en levaduras como en nematodos y mamíferos y son la diana de numerosos compuestos anestésicos (47).

### c) Canales activados por voltaje

Constituyen la mayor familia de canales de  $K^+$  y presentan la capacidad de detectar cambios en el potencial de membrana. Sus subunidades están constituidas por seis hélices transmembrana (S1-S6) y una región del poro entre los dos últimos segmentos. Esta familia se caracteriza por contener un dominio sensor de voltaje que corresponde a los segmentos S1-S4. En concreto, en el S4 residen los elementos sensores de voltaje constituidos por residuos cargados positivamente (arginina o lisina cada tres residuos).

Esta familia está compuesta por 12 subfamilias ( $K_v1-K_v12$ ) agrupados en función de la similitud de la secuencia de aminoácidos incluyendo:  $K_v1.x$  a  $K_v4.x$ , cuyos homólogos



en *Drosophila melanogaster* son los canales Shaker, Shab, Shaw y Shal, respectivamente, KCNQ ( $K_v7.x$ ) y las subfamilias ether-a-go-go o Eag ( $K_v10.x$ ), Erg ( $K_v11.x$ ) y Elk ( $K_v12.x$ ). Además, los canales  $K_v$  pueden organizarse como heterotetrámeros formados por diferentes tipos de subunidades, lo cual aporta mayor diversidad a este grupo. Por ejemplo, los canales  $K_v5$ ,  $K_v6$ ,  $K_v8$  y  $K_v9$  no son canales funcionales, sin embargo, modulan las propiedades biofísicas e inhiben la expresión de los canales  $K_v2$  y  $K_v3$  cuando forman estructuras heterotetraméricas con ellos (26).

### d) Canales SK

El nombre de los canales SKCa se debe a que exhiben pequeñas conductancias entre 10-14 pS (*Small conductance  $K^+$  channel*). Estos canales son activados por niveles submicromolares de  $Ca^{2+}$  intracelular (48). Sus subunidades presentan la misma topología que los canales activados por voltaje, sin embargo, aún teniendo dos residuos de arginina en el segmento S4 no son regulados por el potencial de membrana. Esta subfamilia incluye los canales SKCa1, SKCa2, SKCa3 y el canal de conductancia intermedia IKCa1 (*Intermediate conductance*) (26).

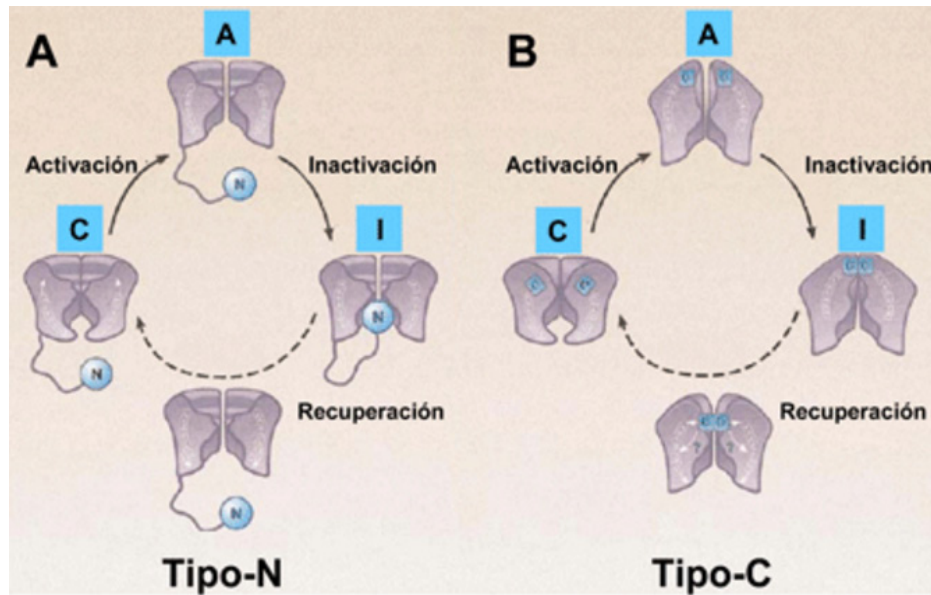
### e) Canales Slo

Esta familia consta de cuatro miembros: Slo1 y Slo3 cuyas subunidades presentan siete segmentos transmembrana y el extremo N-terminal se dispone en la parte extracelular, y los canales Slo2.1 y Slo2.2 (Slick y Slack, respectivamente) cuyas subunidades están formadas por seis hélices transmembrana. Los canales Slo se caracterizan por presentar conductancias inusualmente elevadas. En particular, el canal Slo1 también es denominado BK (*Big  $K^+$  channel*) o Maxi-K debido a que la conductancia de canal único puede llegar a ser del orden de 250 pS. Estos canales pueden estar regulados por voltaje y/o la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (49;50).

#### 2.2.4. Canales de potasio activados por voltaje: tipos de inactivación

Como se ha explicado en el apartado 2.1.3, tras la aplicación de un estímulo continuo los canales activados por voltaje experimentan un cambio conformacional hacia un estado inactivado (no conductor), diferente del estado cerrado (36). En el caso de los canales de potasio activados por voltaje, este proceso tiene lugar

principalmente a través de dos tipos de mecanismos: tipo N (inactivación rápida) o tipo C (inactivación lenta) (**Figura 2.6**) (51;52).



**Figura 2.6.** Mecanismos de inactivación en canales de  $K^+$  activados por voltaje: **A)** Inactivación tipo N, en la que está implicada parte del segmento N-terminal y **B)** Inactivación tipo C, en la que está involucrada la zona de la boca extracelular. Los diferentes estados en los que se puede encontrar el canal son: abierto (A), cerrado (C), inactivado (I). Figura modificada de (53).

La inactivación tipo N se explica mediante el modelo denominado “bola y cadena”, mediante el cual los primeros 22 aminoácidos de cada uno de los cuatro extremos N-terminales citoplásmicos ocluyen la boca intracelular del canal en su estado abierto, evitando la conducción iónica (51). Este mecanismo ocurre en la escala temporal de ms. A través de experimentos de electrofisiología empleando el canal de potasio Shaker, se ha descubierto que este proceso puede ser suprimido mediante la eliminación enzimática o genética del segmento N-terminal (54) y puede recuperarse mediante la adición de un péptido sintético soluble con la misma secuencia (55).

En cambio, en la inactivación tipo C están involucrados cambios conformacionales en la boca extracelular del canal, cerca del filtro de selectividad, que impiden la conducción de iones (36;51). Este proceso ocurre con una cinética más lenta que la inactivación tipo N, generalmente, en el orden de s. Además, es dependiente de la concentración y del tipo de cationes monovalentes presentes en la zona extracelular del canal, lo que sugiere que la ocupación de los sitios de unión de iones en esta zona modularía este tipo de inactivación (36;56).



## 2.3. El canal de potasio KcsA

### 2.3.1. Aspectos generales

El canal KcsA (canal de  $K^+$  de *Streptomyces lividans*) fue identificado y clonado a partir de esta bacteria gram-positiva en 1995 por el grupo de la Dra. Schrempf (57), lo que permitió que se purificara mediante expresión heteróloga en *Escherichia coli* y se pudieran llevar a cabo diferentes estudios biofísicos. Su purificación en cantidades suficientes y con una elevada pureza hizo posible su cristalización y la resolución de su estructura por difracción de rayos X por el grupo del Dr. MacKinnon en 1998, lo que supuso la obtención de la primera estructura de un canal iónico a nivel atómico (15). Además, KcsA ha podido ser reconstituido en distintos sistemas de membranas artificiales y, por consiguiente, se ha caracterizado funcionalmente mediante técnicas electrofisiológicas (45;57;58).

Desde su descubrimiento, se han llevado a cabo múltiples estudios sobre esta proteína procariota que han revelado que comparte las características funcionales y estructurales generales de los canales de potasio eucariota (45;59). Asimismo, se ha demostrado que cuando se reemplazan las dos últimas hélices y la región del poro de un canal de potasio eucariota activado por voltaje por la secuencia de KcsA, se obtienen proteínas quiméricas capaces de ser expresadas en sistemas eucariota (60) e incluso mantienen las propiedades funcionales correspondientes al canal original (31), corroborando de esta forma que esta estructura está conservada en esta familia de canales iónicos y apoyando la teoría de que los canales de potasio eucariota evolucionaron a partir de canales similares a KcsA. Dada su similitud con canales de potasio eucariota, la disponibilidad de la estructura cristalográfica de alta resolución, la elevada estabilidad ante condiciones experimentales adversas, su pequeño tamaño, los elevados niveles de expresión y fácil reconstitución *in vitro*, KcsA ha sido y sigue siendo un sistema modelo para el estudio de la relación estructura-función de canales de potasio.

El gen *kcsa* presenta un marco abierto de lectura que consta de 483 pares de bases con un elevado contenido de G+C (70.6 %) y codifica para una proteína de 17.6 KDa compuesta por 160 aminoácidos por monómero (**Figura 2.7**) (57). En la secuencia primaria se reconoce fácilmente la secuencia consenso característica de los canales de potasio (en este caso, T<sub>75</sub>VGYG<sub>79</sub>) y el análisis de hidrofobicidad predice la existencia de dos hélices transmembrana por subunidad (57). Además, su secuencia se asemeja a la de la familia de canales de potasio eucariota activados por voltaje, principalmente a la de la subfamilia representada por el canal Shaker de *D. melanogaster*, mientras que la topología de sus subunidades es más similar a la de los canales de potasio rectificadores de entrada (K<sub>ir</sub>) presentando una región del poro flanqueada por dos segmentos transmembrana (15;61).

```

atg cca ccc atg ctg tcc ggt ctt ctg gcc aga ttg gtc aaa ctg
M P P M L S G L L A R L V K L
ctg ctc ggg cgc cac ggc agt gcg ctg cac tgg agg gcc gcg ggt
L L G R H G S A L H W R A A G
gcc gcg acg gtc ctc ctg gtg atc gtc ctc ctc gcg gcc teg tac
A A T V L L V I V L L A G S Y
ttg gcc gtc ctg gct gag cgc gcc gca ccg gcc gcg cag ctg atc
L A V L A E R G A P G A Q L I
acg tat ccg cgg gcg ctg tgg tgg tcc gtg gag acc gcg acg acc
T Y P R A L W W S V E T A T T
gtc ggc tac ggc gac ctg tac ccc gtg act ctg tgg gcc cgg ctc
V G Y G D L Y P V T L W G R L
gtg gcc gtg gtg gtg atg gtc gcc ggg atc acc tcc ttc ggt ctg
V A V V V M V A G I T S F G L
gtg acc gcc gcg ctg gcc acc tgg ttc gtc gcc cgg gaa caa gag
V T A A L A T W F V G R E Q E
cgc cgg ggc cac ttc gtg cgc cac tcc gag aag gcc gcc gag gag
R R G H F V R H S E K A A E E
gcg tac acg cgg acc cgg gcg ctg cac gag cgt ttc gac cgt
A Y T R T T R A L H E R F D R
      ttg gag cga atg ctc gac gac aac cgc cgg tga
      L E R M L D D N R R -

```

**Figura 2.7.** Secuencia nucleotídica (gris) y aminoácídica (color) de cada una de las subunidades del canal KcsA. La secuencia comienza en el extremo N-terminal y finaliza en el C-terminal. En rojo se resaltan los aminoácidos que forman la hélice transmembrana 1 (TM1) y en verde la TM2. En naranja se muestran los residuos que constituyen la región del poro y subrayada la secuencia consenso que forma el filtro de selectividad. En azul se presentan los aminoácidos correspondientes a los dominios N y C-terminal. En negrita están resaltados los cinco triptófanos presentes en este canal, ubicados en las posiciones 26, 67, 68, 87 y 113 en la secuencia primaria. La correspondencia de cada dominio en la secuencia es aproximada. Secuencia obtenida de (57).

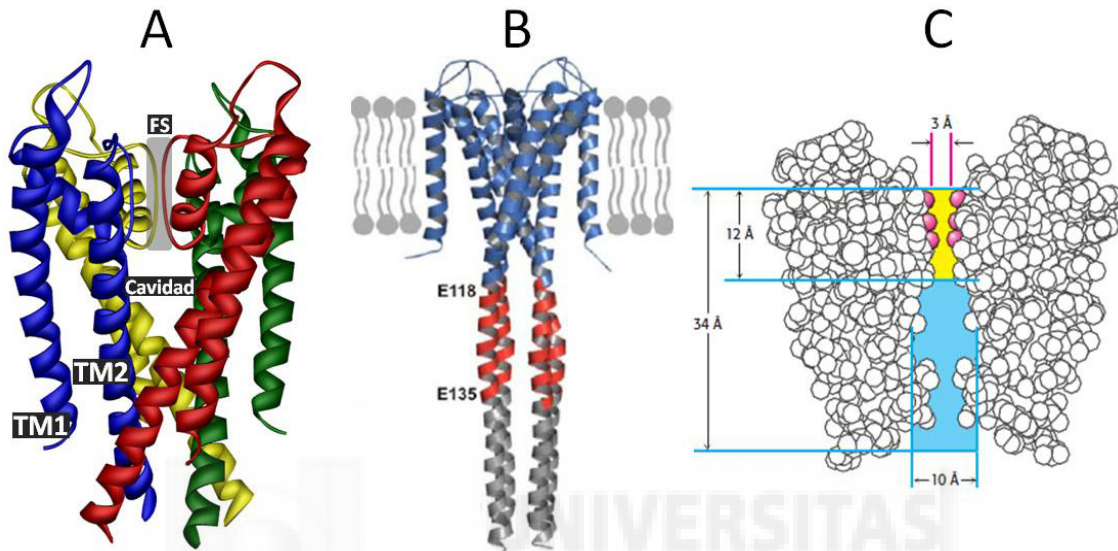
*S. lividans* es una bacteria gram-positiva que habita en el suelo y presenta un complejo ciclo de vida que implica crecimiento micelial y formación de esporas asexuales (57). Además, es capaz de sintetizar diversos agentes antibióticos, citostáticos y fungicidas, así como degradar numerosas macromoléculas. Desde el descubrimiento del gen *kcsa* codificado en el genoma de esta bacteria, las investigaciones se han centrado en elucidar las características estructurales y funcionales del canal, sin embargo, se desconoce el papel que desempeña en la fisiología de la bacteria (28).

### 2.3.2. Estructura

Como se ha mencionado previamente, la obtención de la primera estructura cristalográfica de alta resolución de KcsA, publicada por el grupo del Dr. MacKinnon en 1998, supuso una revolución en el campo de los canales iónicos, ya que permitió por primera vez conocer en detalle la organización de dichas proteínas y establecer las bases estructurales de la conducción y selectividad iónicas (15). En esta estructura se determinó únicamente la región transmembrana de KcsA (residuos 23-119) a una resolución de 3.2 Å (código PDB 1BL8), aunque no se logró discernir la orientación precisa de los oxígenos de los grupos carbonilo que conforman el filtro de selectividad. Posteriormente, este grupo mejoró la resolución hasta 2 Å empleando un fragmento de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a la zona extracelular del canal (PDB 1K4C) (62). Por otra parte, el grupo del Dr. Perozo consiguió obtener la estructura del canal completo mediante resonancia de espín electrónico (PDB 1F6G) (63) y, posteriormente, mediante difracción de rayos X excepto el dominio N-terminal (PDB 3EFF y 3EFD) (64).

Las estructuras cristalográficas de KcsA indican que se trata de un homotetrámero cuyas subunidades se disponen en forma de cono invertido alrededor de un poro central acuoso por donde fluyen los iones (Figura 2.8). La sección que está en contacto con los lípidos de la membrana celular tiene unos 34 Å de longitud y el diámetro del poro es variable siendo más estrecho en la parte extracelular (Figura 2.8.C) (15). Estas estructuras estarían representando el estado cerrado del canal debido a la presencia

de un entrecruzamiento en la parte final de las hélices transmembrana TM2 que impediría el tránsito de iones (15;62). No obstante, años más tarde, el grupo del Dr. Perozo también logró obtener la estructura cristalográfica de KcsA con una serie de mutaciones que le permiten permanecer constitutivamente en la conformación abierta (65;66).



**Figura 2.8.** Estructura cristalográfica del canal de potasio KcsA. **A)** Representación de cintas de la parte transmembrana del homotetrámero donde cada monómero se muestra de un color diferente y se señalan las hélices transmembrana (TM1 y TM2), el filtro de selectividad (FS, sombreado) y la cavidad (PDB 1K4C) (62). **B)** Estructura del canal incluyendo el dominio C-terminal (PDB 3EFF) (64). En rojo se marca la región flexible de este dominio desde el aminoácido E118 hasta E135. **C)** Representación de las dimensiones del poro iónico (67).

Los datos obtenidos a partir de los estudios estructurales de KcsA permiten dividir cada subunidad del canal en regiones con características definidas:

#### a. Dominio N-terminal

Este dominio está formado por los 22 primeros aminoácidos del canal que son, principalmente, hidrofóbicos (leucinas) o cargados positivamente. Su estructura no se ha logrado determinar mediante difracción de rayos X, aunque los datos obtenidos a partir de simulaciones indican que formaría una hélice anfipática dispuesta en la interfase lípido-citoplasma de la membrana sugiriendo, de esta forma, que ejerce una función de anclaje del canal (63). Estos estudios defienden que el dominio N-terminal se orienta de forma radial respecto al eje longitudinal del canal, sin embargo,

investigaciones posteriores sugieren que la disposición sería tangencial (68), lo cual está respaldado por las estructuras de otros canales de potasio (69;70). Estudios recientes sobre la función de este dominio indican que los residuos cargados positivamente interactúan con los lípidos negativos presentes en la hemicapa interna de la membrana estabilizando la conformación abierta del canal (71).

### **b. Hélices transmembrana**

Cada subunidad del canal presenta dos hélices  $\alpha$  transmembrana (TM1 y TM2) conectadas por la región del poro (Figura 2.8.A) (15). La hélice externa (TM1) está formada por los residuos situados entre las posiciones 27-50 aproximadamente e interactúa con los lípidos de la membrana, mientras que la hélice interna (TM2) está constituida por los aminoácidos de las posiciones 88-119 y está orientada hacia el poro central presentando una inclinación de unos  $25^\circ$  respecto a la membrana. En el estado cerrado las cuatro hélices TM2 están entrecruzadas a nivel del residuo Val115 (en la parte C-terminal de las hélices), siendo ésta la región más estrecha del paso iónico (64). Es precisamente en la zona C-terminal de la hélice TM2 (junto con parte del dominio C-terminal) donde se producen los movimientos necesarios para la apertura del canal constituyendo de esta forma la primera compuerta del paso iónico (puerta intracelular) (66).

### **c. Dominio C-terminal**

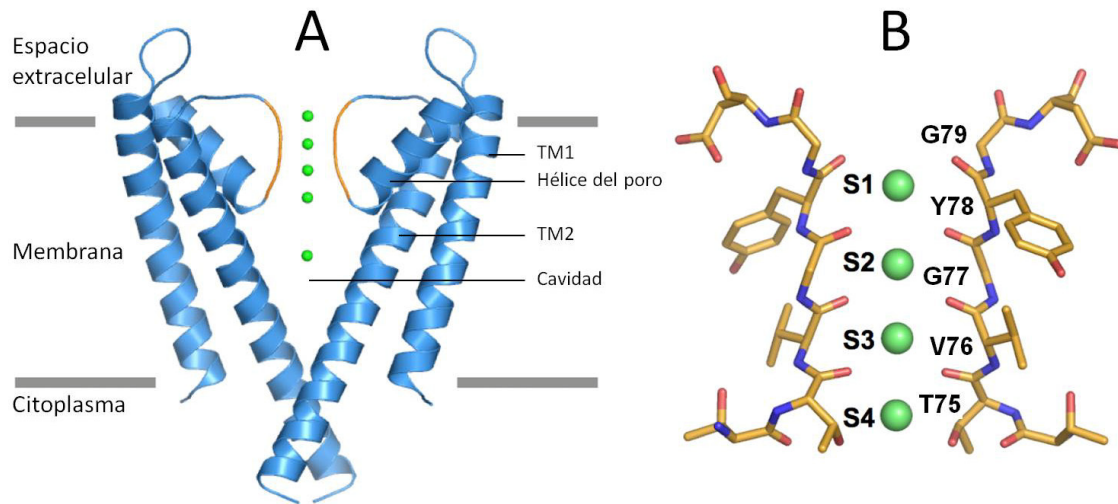
Este dominio está constituido por los últimos 40 aminoácidos del canal que se extienden hacia el citoplasma (Figura 2.8.B). En las primeras estructuras cristalográficas de KcsA este segmento tuvo que ser eliminado, puesto que su elevada flexibilidad desfavorecía la formación de los cristales. De modo que, su estructura fue inferida a partir de técnicas de menor resolución como la resonancia de espín electrónico o la resonancia magnética nuclear, que indicaron que este dominio adopta una estructura helicoidal y se entrecruzan entre sí (63;72-74). En el año 2009, el grupo del Dr. Perozo consiguió resolver la estructura cristalográfica de KcsA incluyendo este dominio gracias al empleo de fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al mismo restringiendo su movimiento (64). La resolución de esta estructura corroboró la información obtenida a partir de los experimentos anteriores y detalló que el dominio C-terminal forma una hélice  $\alpha$  que se extiende unos 70 Å hacia el citoplasma y

se entrecruza con las hélices del resto de subunidades, interaccionando mediante puentes de hidrógeno y puentes salinos entre las cadenas laterales de determinados residuos de subunidades adyacentes. Además, la estructura del canal completo en la conformación abierta indica que este dominio presenta una región flexible (entre los residuos E118 y E135) que se expande durante la apertura de la puerta intracelular (**Figura 2.8.B**) (66). Por otra parte, nuestro grupo de investigación demostró que este dominio (en concreto, los aminoácidos 120-124) mejora la eficacia de tetramerización del canal durante los procesos de plegamiento y ensamblaje (75), lo cual también ha sido observado en otros canales de potasio como los canales Eag (76) o los canales K<sub>ir</sub> (77). En el canal Shaker, sin embargo, la función de tetramerización ha sido atribuida al dominio N-terminal (denominado dominio T1) en lugar del C-terminal (78;79).

#### d. Región del poro

La región del poro consta de unos 30 aminoácidos ubicados en la mitad superior del canal que conectan las dos hélices transmembrana y se puede dividir en dos partes: la hélice del poro y, a continuación, el lazo del poro o *P-loop*. La primera parte consiste en una pequeña hélice  $\alpha$  (**hélice del poro**) cuyo extremo C-terminal está orientado hacia el centro de la cavidad (**Figura 2.9.A**). Esta disposición espacial permite establecer numerosas interacciones entre las subunidades que favorecen el mantenimiento de la estructura tetramérica, así como la regulación de la conducción iónica (15). En segundo lugar, el *P-loop* es un segmento corto de aminoácidos situado en el poro iónico que contiene la secuencia consenso de los canales de potasio T<sub>75</sub>VGYG<sub>79</sub> (**Figura 2.9.B**), lo que estructuralmente se conoce como **filtro de selectividad**. El filtro presenta una longitud de unos 12 Å, un diámetro interno de 3 Å (**Figura 2.8.C**) y está formado por los grupos carbonilo de los aminoácidos de la secuencia consenso que se dirigen hacia el poro central, mientras que sus cadenas laterales se orientan en el sentido opuesto interactuando, de esta forma, con los residuos de la hélice del poro (**Figura 2.9.B**) (15;62). La caracterización estructural del filtro de selectividad fue uno de los detalles más importantes de la resolución de la estructura cristalográfica de KcsA puesto que es en esta zona dónde se encuentran los sitios de unión de iones y, por lo tanto, los estudios posteriores sobre la selectividad iónica estuvieron centrados en esta región (*ver apartado 2.3.4*). Además, numerosas

investigaciones han demostrado que tanto el tipo de ión (45;80-82) como mutaciones en el filtro (83-85) influyen sobre la apertura de los canales de potasio, lo que llevó a proponer al filtro de selectividad como la segunda compuerta (puerta extracelular) (15;62).



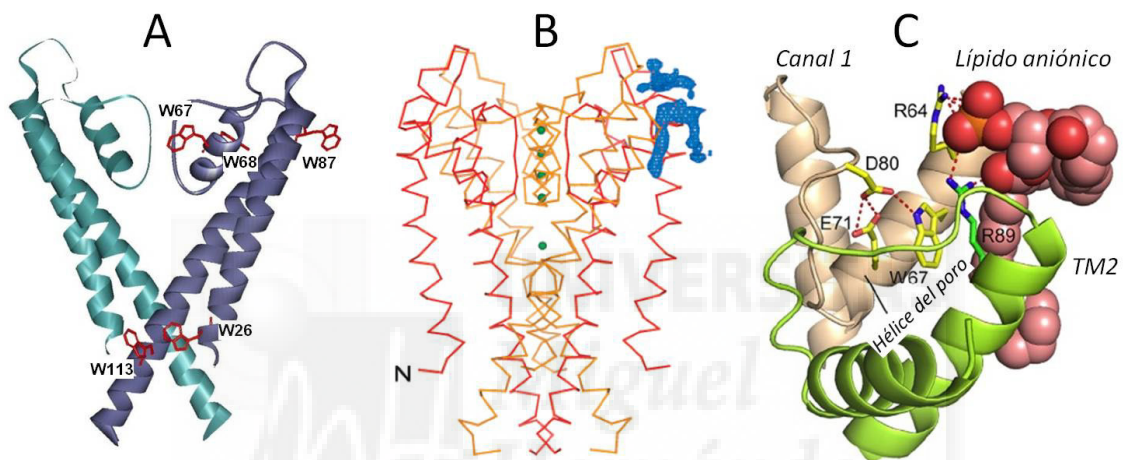
**Figura 2.9.** A) Representación de cintas de la estructura de KcsA con cuatro iones K<sup>+</sup> (esferas verdes) en el filtro de selectividad (en naranja) y uno en la cavidad. Se muestran dos subunidades del canal para mayor claridad. Las líneas grises señalan el límite superior e inferior de la membrana. B) Detalle de la estructura del filtro de selectividad con cuatro iones K<sup>+</sup> ubicados en sus posibles sitios de unión (S1-S4). Además, se señalan los aminoácidos de la secuencia de la firma TVGYG. Figura adaptada de (86).

#### e. Cavidad

La cavidad es una dilatación del poro acuoso que se prolonga hasta la mitad inferior del mismo y presenta un diámetro de unos 10 Å (Figura 2.8.C) (15). Los residuos que revisten las paredes internas de la cavidad son predominantemente hidrofóbicos. En las primeras estructuras cristalográficas de KcsA se detectó un ión K<sup>+</sup> ubicado en el centro de la cavidad con su esfera de hidratación perfectamente ordenada (62). A partir de estos datos cristalográficos se propuso que la cavidad contribuye a la estabilización de los cationes dentro del poro (15;62).



La estructura cristalográfica de KcsA también reveló que, como otras proteínas de membrana, el canal presenta dos “anillos” de residuos aromáticos ubicadas a lo largo de las interfases membrana-agua, probablemente debido a que sus cadenas laterales son capaces de interactuar con las cabezas polares de los lípidos y, de este modo, servir como anclaje a la membrana (15;87). Estos residuos aromáticos son los que aportan al canal sus propiedades fluorescentes especialmente los residuos de Trp que, en el caso de KcsA, presenta cinco por cada subunidad: tres situados en la boca extracelular (W67, W68 y W87) y dos en la parte intracelular (W26 y W113) (Figura 2.10.A).



**Figura 2.10.** **A)** Localización de los residuos de triptófano en una subunidad de KcsA, tres en la boca extracelular y dos en los extremos intracelulares de las hélices transmembrana. Sólo se representan dos unidades para mayor claridad (88). **B)** Esqueleto polipeptídico de KcsA (en naranja y rojo) donde se muestra la densidad electrónica correspondiente al lípido (azul). Sólo se muestra aquella localizada en una de las cuatro interfases. Las esferas verdes representan átomos de potasio (89). **C)** Modelado molecular de la interacción entre un lípido aniónico (esferas rojas) y un sitio no-anular de KcsA entre dos subunidades adyacentes (una de ellas representada en marrón claro y la otra en verde). Los puentes de hidrógeno se indican como líneas rojas discontinuas (90).

Otro detalle obtenido a partir de la estructura cristalográfica de KcsA fue la detección de lípidos unidos al canal que copurifican con la proteína (62) (Figura 2.10.B). Estos lípidos fueron posteriormente identificados como moléculas de fosfatidilglicerol (89;91) que se unen con una elevada afinidad, aunque de forma no covalente, a los denominados sitios no-anulares, localizados en la parte extracelular de



la proteína entre la hélice del poro y la TM2 de dos subunidades adyacentes (92;93). Aunque la disposición de la cabeza polar del fosfolípido no se ha logrado determinar en la estructura cristalográfica de KcsA, estudios de simulación y de RMN indican que interacciona con residuos cargados positivamente, como R64 y R89 de subunidades adyacentes (94-96) (Figura 2.10.C). Los sitios no-anulares son específicos para fosfolípidos cargados negativamente, en contraposición a los sitios anulares, que están ubicados en la zona transmembrana, donde los lípidos interactúan con la proteína de manera menos específica (97). Además, se ha demostrado que la interacción *in vitro* de KcsA con lípidos aniónicos a través de estos sitios no-anulares influye sobre diferentes propiedades del canal como la estabilidad térmica, tetramerización y función (90;96-98).

### 2.3.3. Estabilidad química y térmica

Los estudios de desnaturalización química y térmica han permitido obtener información sobre las interacciones intra e intersubunidad que se establecen en los procesos de plegamiento y ensamblaje de los canales iónicos.

El tetrámero de KcsA presenta una elevada estabilidad en presencia de altas concentraciones de agentes desnaturalizantes comúnmente utilizados como SDS (1 M), urea (7 M) o cloruro de guanidinio (8 M), aunque sí se disocia en presencia de 2,2,2,-trifluoroetanol (TFE), siendo la desnaturalización irreversible a partir de 35% TFE (99;100).

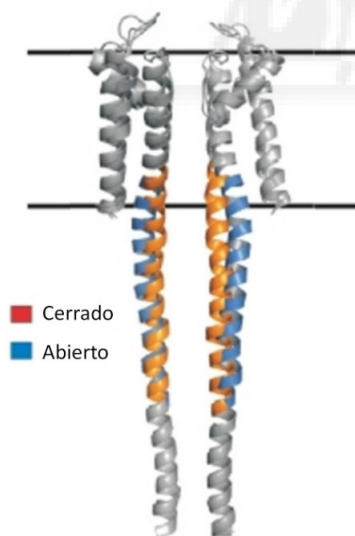
En cuanto a la estabilidad térmica, varios estudios han demostrado que el tetrámero de KcsA solubilizado es resistente a altas temperaturas, lo que se acentúa cuando la proteína se reconstituye en vesículas lipídicas (75;100-102). Nuestro grupo de investigación comprobó que la desnaturalización térmica de KcsA solubilizado es un proceso cooperativo e irreversible que incluye la disociación del tetrámero en monómeros y el desplegamiento parcial de la proteína (96) (ver apartado 2.3.6). Han sido descritos varios factores que influyen sobre esta estabilidad, como son la concentración y tipo de lípidos e iones presentes en la muestra. Los lípidos aniónicos

(como fosfatidilglicerol o ácido fosfatídico) inducen una mayor estabilización térmica de la proteína que los lípidos zwitteriónicos (como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina) mediante la interacción con los sitios no-anulares (96;103), como se ha descrito previamente (ver apartado 2.3.2). También se ha comprobado que los alquil sulfatos de cadena larga (con cadenas de 10-14 carbonos), entre los que se encuentra el SDS, utilizarían el mismo mecanismo para estabilizar el canal (96). Por otra parte, cuando los iones se sitúan en sus respectivos sitios de unión en el filtro de selectividad establecen interacciones con residuos de las cuatro subunidades del canal favoreciendo, de esta forma, que se mantengan unidas. Se ha observado que la estabilidad térmica de KcsA es mayor en presencia del ión conductor  $K^+$  que del ión no conductor  $Na^+$  debido a las distintas afinidades con las que estos iones se unen al canal (88;104;105) (ver apartado 2.3.6.).

### 2.3.4. Mecanismos de conducción iónica eficaz y selectiva

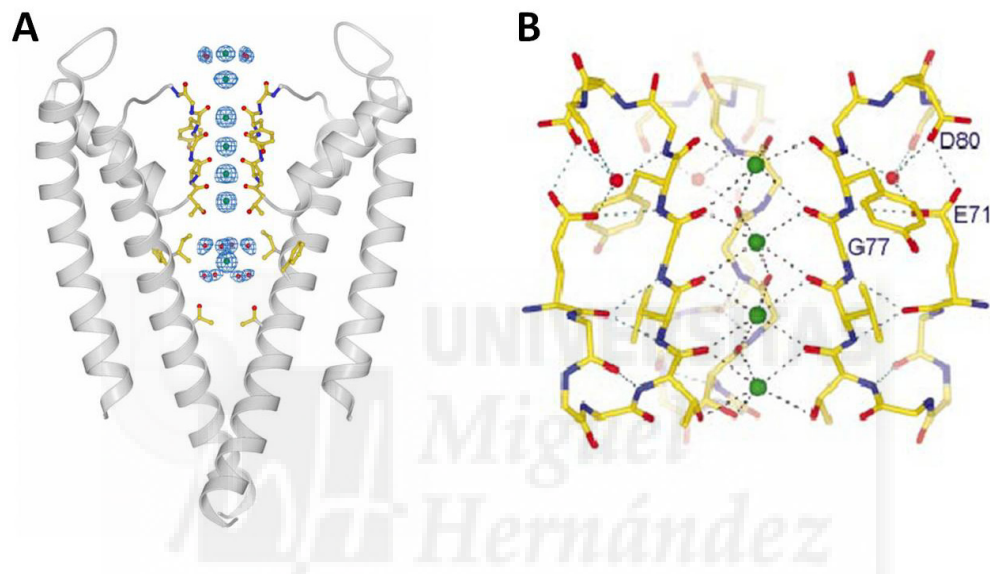
La caracterización funcional de KcsA comenzó previamente a la obtención de su estructura cristalográfica, aunque fue esta información estructural la que permitió establecer las bases moleculares de la conducción iónica en los canales de potasio (15;62). En las primeras caracterizaciones electrofisiológicas de KcsA, varios grupos coincidieron en que la apertura del canal es dependiente de pH ácido (58;106;107). El grupo del Dr. Miller descubrió que esta inesperada propiedad presenta asimetría, siendo la parte citoplasmática, y no la extracelular, sensible a protones (106). Estudios posteriores confirmaron que el sensor de pH está conformado por una red de aminoácidos ionizables (sobre todo histidinas, argininas y ácidos glutámicos) ubicados en los extremos citoplasmáticos de las hélices TM1 y TM2 (108-111). Dichos estudios sugieren que en presencia de pH ácido estos residuos cambian su estado de protonación, desestabilizando las interacciones entre los mismos y favoreciendo, de este modo, la apertura de la puerta intracelular ubicada en la zona del entrecruzamiento de las hélices TM2. Esta hipótesis fue defendida por el grupo del Dr. Perozo a partir del diseño de un canal mutante de KcsA cuya puerta intracelular está constitutivamente abierta, incluso en presencia de pH neutro, debido a la

neutralización de las cargas de los aminoácidos implicados en su apertura (65). Los movimientos de las TM2 durante la apertura del canal han sido ampliamente caracterizados mediante diferentes técnicas (72;74;112-117). Los últimos estudios apuntan a que el movimiento principal de apertura de la puerta intracelular se produciría hacia la mitad de la hélice TM2, concretamente a nivel del residuo G104 que funcionaría como una bisagra a partir de la cual la mitad inferior de la hélice se desplazaría hacia el exterior del canal generando una ampliación del vestíbulo intracelular de unos 20 Å (66). Este movimiento de las hélices internas sería transmitido al dominio C-terminal, concretamente a la región comprendida entre los residuos E118 y E135 (Figura 2.8.B), produciendo un movimiento de esta zona hacia la parte superior (hacia la membrana) y creando cuatro ventanas laterales por las que entrarían los iones  $K^+$  hidratados (66) (Figura 2.11). Parece que estos cambios conformacionales de las hélices TM2 durante el *gating* se producen de forma similar en otros canales como MthK (33), por lo que se ha propuesto que en los canales  $K_v$  se llevan a cabo movimientos semejantes en la hélice equivalente a TM2, el segmento S6 (118;119).



**Figura 2.11.** Superposición de la conformación cerrada (naranja) y abierta (azul) de la estructura completa de KcsA. Las zonas coloreadas corresponden a las que presentan movimiento durante la apertura de la puerta intracelular del canal. Se muestran dos subunidades del canal para mayor claridad. Las líneas negras representan los límites de la membrana plasmática aproximadamente. Figura adaptada de (66).

Cuando el ión  $K^+$  se introduce en la cavidad mantiene su esfera de hidratación perfectamente ordenada presentando cuatro moléculas de agua en la parte superior y cuatro en la inferior, tal y como revelan las estructuras cristalográficas del canal (15;62) (**Figura 2.12.A**). El elevado coste energético que supone mantener una partícula cargada en la mitad de una membrana lipídica es superado gracias a dos elementos fundamentales: la cavidad, que aporta un ambiente acuoso, y las cuatro hélices del poro, que constituyen dipolos cuyos extremos negativos (C-terminal) orientados hacia el centro de la cavidad estabilizan a los cationes (15;120).



**Figura 2.12.** **A)** Representación de cintas de dos subunidades de KcsA (en gris) con los residuos del filtro de selectividad y los enfrentados hacia la cavidad marcados en amarillo. También está representada la densidad electrónica de los iones  $K^+$  (esferas verdes) y moléculas de agua (esferas rojas) (121). Cabe destacar que el ión  $K^+$  de la cavidad, así como los del medio extracelular (ubicados en el sitio  $S_{ext}$  o  $S0$ ), están hidratados. **B)** Estructura del filtro de selectividad con los iones  $K^+$  ubicados en sus cuatro posibles sitios de unión. Cada átomo de  $K^+$  está coordinado con cuatro oxígenos en la parte superior y cuatro en la parte inferior. Sólo se han representado tres subunidades para mayor claridad (62).

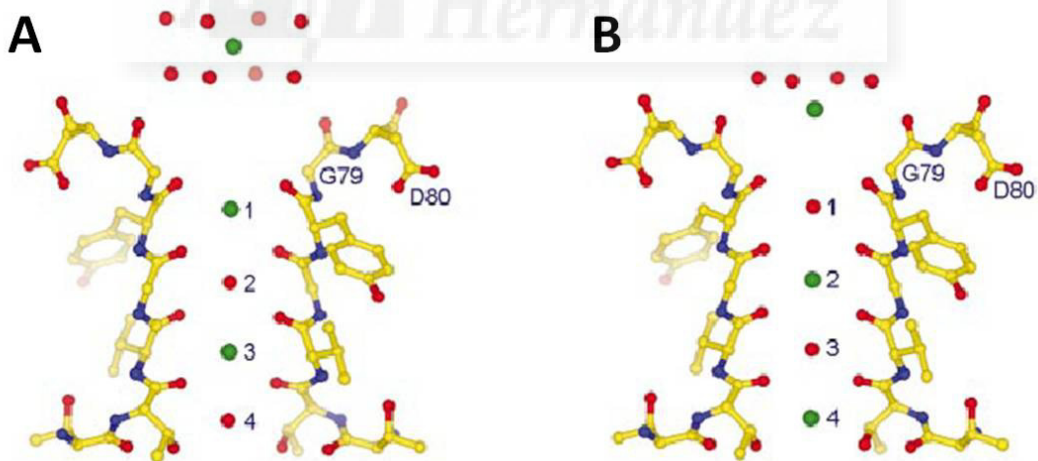
Por otra parte, la apertura de la puerta intracelular no logra explicar algunas propiedades funcionales de KcsA como su característica baja probabilidad de apertura incluso a pH ácido (45;58;106) o la inactivación del canal (122;123), lo que llevó a pensar en la existencia de una segunda puerta que controla el flujo iónico cuando la primera puerta ya está abierta. Varias evidencias experimentales indican que esta segunda puerta corresponde al filtro de selectividad (puerta extracelular), entre ellas,

la variación de la actividad del canal en función del tipo de ión presente en el medio y de determinadas mutaciones que afectan al filtro y al *P-loop* (45;117;122-124). La estructura cristalográfica de KcsA también reveló que cuando los iones  $K^+$  pasan desde la cavidad hacia el filtro de selectividad, pierden su esfera de hidratación para interactuar directamente con la proteína (15). Para compensar el coste energético de la deshidratación, el ión  $K^+$  se coordina, mediante interacciones electrostáticas, con los oxígenos de los grupos carbonilo que delimitan el filtro de selectividad, cuya disposición espacial simula la esfera de hidratación de este catión creando, de esta forma, cuatro posibles sitios de unión de  $K^+$  ubicados en fila a lo largo del filtro (15;62) (Figura 2.12.B).

Los canales de potasio se caracterizan por su capacidad de conducir iones mientras mantienen una alta selectividad por  $K^+$ . Por ejemplo, a pesar de que los radios iónicos del  $K^+$  y del  $Na^+$  son similares (1.33 y 0.95 Å, respectivamente), los canales de potasio, y en concreto KcsA, son unas 1000 veces más selectivos a  $K^+$  que a  $Na^+$  (45). Los Dres. Armstrong y Bezanilla propusieron un modelo para explicar este fenómeno denominado “*snug-fit hypothesis*” que ha persistido durante décadas (125), incluso fue apoyado por el grupo del Dr. MacKinnon tras la obtención de la estructura cristalográfica de KcsA (15). Según esta hipótesis los grupos carbonilo del filtro de selectividad están ubicados espacialmente de forma precisa para reemplazar la esfera de hidratación del  $K^+$ , en cambio, el filtro no sería capaz de ajustarse para coordinar a los iones  $Na^+$  (de menor tamaño) y asumir el coste energético de su deshidratación. No obstante, este modelo, que apuesta por la rigidez del filtro como mecanismo para seleccionar iones, es incompatible con la flexibilidad inherente a las proteínas (126;127), por lo que han surgido en los últimos años otras propuestas, especialmente a partir de estudios de simulación *in silico*. Algunos autores proponen que el filtro es suficientemente flexible para acomodar cationes de diversos radios iónicos (128) y que serían las propiedades electrostáticas de los carbonilos (como el momento dipolar) las responsables de la selectividad (127;129). Otras hipótesis destacan la importancia del número de coordinación de los complejos formados por los carbonilos y el ión en cuestión dentro del filtro (130-133). No obstante, se necesitan más datos

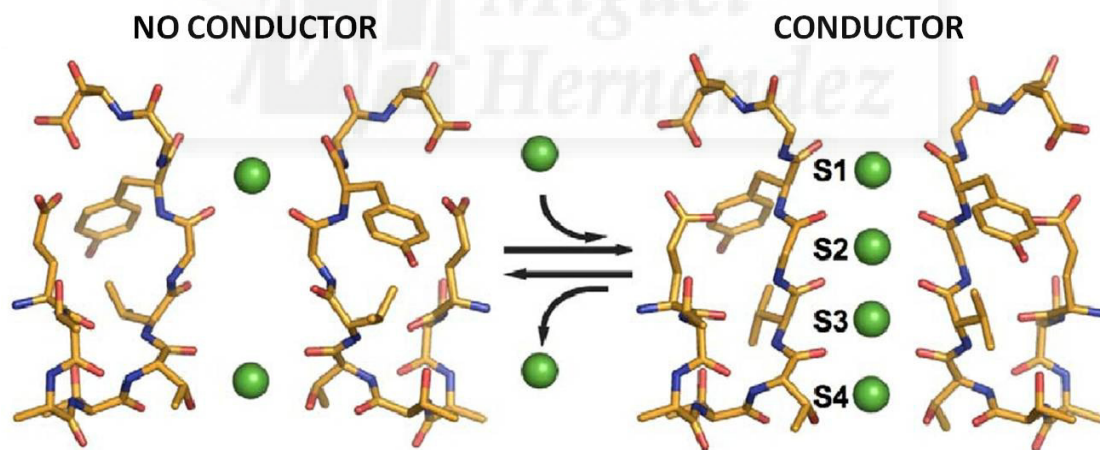
experimentales para confirmar estas hipótesis o que aporten más información sobre los mecanismos que regulan el proceso de selectividad iónica.

La estructura cristalográfica de KcsA en presencia de altas concentraciones de  $K^+$  (a partir de 20 mM) permitió al grupo del Dr. MacKinnon proponer un modelo para explicar otra de las propiedades características de los canales de potasio: la conducción de  $K^+$  a elevada velocidad (cercana al límite de difusión) (134). En estas condiciones el filtro contiene dos iones de  $K^+$  separados por una molécula de agua que se desplazan en conjunto entre los sitios de unión hasta que un tercer ión entra y produce la salida de uno de los dos iones  $K^+$  hacia el extremo opuesto (generalmente el medio extracelular, dónde vuelven a hidratarse) por repulsión electrostática. De esta forma, se alternan dos configuraciones dentro del filtro para producir la conducción iónica:  $K^+$ -agua- $K^+$ -agua (configuración 1,3) y agua- $K^+$ -agua- $K^+$  (configuración 2,4) (Figura 2.13). La diferencia energética entre estos dos estados es prácticamente nula y, por lo tanto, las barreras cinéticas entre ellos son mínimas. Los autores proponen que este balance energético junto con la repulsión electrostática entre iones de  $K^+$  adyacentes permitiría alcanzar una alta tasa de conducción iónica (134;135).



**Figura 2.13.** Posibles configuraciones en las que se puede encontrar el filtro de selectividad en presencia de altas concentraciones de  $K^+$ : **A)** Configuración 1,3, en la que sólo los sitios S1 y S3 están ocupados por iones de  $K^+$  (esferas verdes), y **B)** configuración 2,4 que presenta los sitios S2 y S4 ocupados por este ión y el resto por agua (esferas rojas). Obsérvese que el ión ubicado en la parte extracelular se encuentra completa o parcialmente hidratado. Este sitio externo se denomina  $S_{ext}$  o S0 (62).

Este grupo de investigación también observó que, sorprendentemente, en presencia de bajas concentraciones de  $K^+$  (KCl 3 mM y NaCl 150 mM) la estructura cristalográfica del filtro de selectividad sufre un cambio conformacional con respecto a la estructura en presencia de altas concentraciones de este ión (62). El cambio más destacado radica en que, en estas condiciones, los carbonilos de los residuos V76 y G77 apuntan hacia fuera del poro, lo que impide que puedan coordinarse con los iones. De este modo, esta estructura no presenta iones en los sitios de unión S2 y S3 representando una conformación no conductora o colapsada del filtro de selectividad (Figura 2.14). En este caso, el grado de ocupación iónica (es decir, el número de iones presentes en el filtro al mismo tiempo) es de un ión distribuido entre dos posibles sitios de unión (S1 y S4), mientras que la conformación conductora presenta dos iones distribuidos entre cuatro posibles sitios (S1-S4) (62;135). Esta capacidad del filtro de adoptar dos conformaciones, una conductora y otra no conductora, sugiere que las transiciones entre estos estados podrían ser las responsables del control del flujo iónico en el filtro de selectividad (62;136).

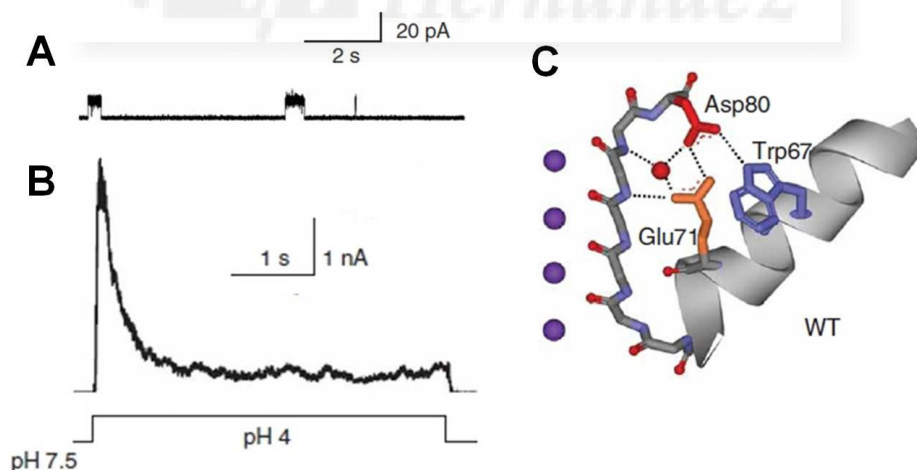


**Figura 2.14.** Equilibrio entre las dos conformaciones en las que se puede encontrar el filtro de selectividad en función de la concentración y tipo de ión. La conformación no conductora presenta un ión  $K^+$  (esferas verdes) distribuido entre dos sitios de unión (en los extremos del filtro), mientras que la conductora contiene dos iones distribuidos entre cuatro posibles sitios de unión (S1-S4). Figura obtenida de (86).



## 2.3.5. Características funcionales de KcsA

La primera descripción de la actividad de KcsA fue llevada a cabo por el grupo de la Dra. Schrempf tras el descubrimiento del canal, utilizando protoplastos de *S. lividans* fusionados con liposomas para llevar a cabo los registros electrofisiológicos (57). Los autores observaron que el canal presenta subconductancias y una elevada permeabilidad a  $\text{Na}^+$  (este ión no bloquea corrientes de  $\text{K}^+$ ), la probabilidad de apertura es de alrededor de 0.5, necesita  $\text{Mg}^{2+}$  para activarse y es capaz de conducir iones a pH neutro. Sin embargo, estudios posteriores realizados con proteína purificada y reconstituida en vesículas lipídicas indicaron que el canal presenta una secuencia de permeabilidades similar a la de los canales de potasio eucariotas incluyendo una alta selectividad de  $\text{K}^+$  frente a  $\text{Na}^+$  (45;137), *gating* moderadamente dependiente de voltaje (138), bloqueo intracelular por  $\text{Na}^+$  y activación a pH ácido intracelular (106;139), seguido de un proceso de inactivación lenta, por lo que su probabilidad de apertura es baja (alrededor de 0.1) (122;123) (Figura 2.15.A y B). Dado el gran número de evidencias experimentales, este último grupo de características es el que ha sido aceptado de forma generalizada sin llegar a conocerse las razones de estas discrepancias.



**Figura 2.15.** A) Registro continuo representativo de canal único de KcsA silvestre a +150 mV y condiciones simétricas de KCl 200 mM y pH 4 donde se observa la característica baja probabilidad de apertura que presenta el canal. B) Corrientes macroscópicas de KcsA a +150 mV y KCl 200 mM donde se detecta la activación e inactivación del canal por cambios en el pH. C) Red de interacciones entre los residuos del *P-loop* y del filtro de selectividad que forman la tríada de inactivación. Figuras obtenidas de (123).



No obstante, nuestro grupo de investigación llevó a cabo una caracterización funcional de KcsA cuyos resultados lograron aportar una explicación a esta controversia (140). Los registros electrofisiológicos del canal mostraron dos tipos principales de patrones funcionales vinculados al grado de agrupación de los canales: el patrón LOP (*Low Opening Probability*), caracterizado por presentar una baja probabilidad de apertura a pH ácido intracelular, baja conductancia y bloqueo por Na<sup>+</sup>, fue asociado a la presencia de un canal aislado o dos canales acoplados funcionalmente, en cambio, en el patrón de alta probabilidad de apertura (HOP, *High Opening Probability*), se detectan aperturas de elevada conductancia incluso a pH neutro y no se observa bloqueo por Na<sup>+</sup>, lo que fue atribuido a la agrupación y acoplamiento funcional de varios canales. Recientemente, se ha determinado que la formación de estos complejos supramoleculares de KcsA es dependiente de la concentración de lípidos aniónicos (141), además de la concentración de proteína, lo que podría explicar la variedad de características funcionales observadas por distintos grupos de investigación que emplean diferentes condiciones experimentales. Estas agrupaciones no sólo han sido detectadas a nivel funcional, sino también mediante técnicas espectroscópicas y electroforéticas (140;142). Además, se ha comprobado la existencia de zonas de alta densidad de KcsA *in vivo* (en hifas de *S. lividans*) (143) y la formación de agrupaciones en otros canales (144;145), lo que refuerza la idea de que estos complejos deben ser estructuras relevantes a nivel fisiológico.

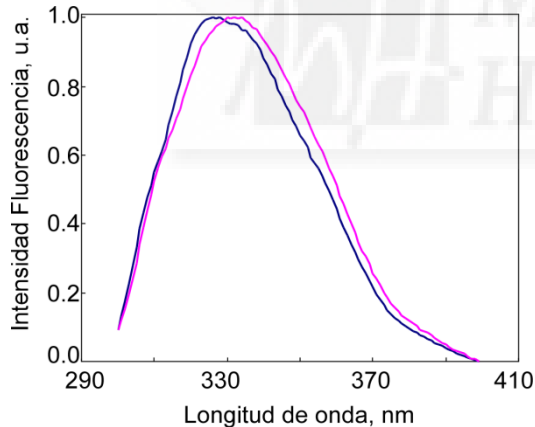
Como se ha indicado anteriormente, KcsA es activado por protones que promueven la apertura de la puerta intracelular y, seguidamente, sufre un proceso de inactivación lenta (Figura 2.15.B), lo que explicaría la baja probabilidad de apertura que presenta el canal (122;123;146;147). Varios estudios han confirmado que esta inactivación tiene lugar a nivel del filtro de selectividad, de forma similar a la inactivación tipo C de los canales de potasio eucariotas activados por voltaje (123;148-150). En el caso de KcsA, la inactivación está regulada por una red de puentes de hidrógeno entre los residuos de la hélice del poro y del *P-loop* W67-E71-D80 (tríada de inactivación) que estabilizan al estado inactivado (Figura 2.15.C), por lo que las mutaciones que desestabilizan estas interacciones, como E71A, claramente exhiben un menor grado de inactivación y una mayor probabilidad de apertura (123;151-153). Por otra parte, se ha planteado que

residuos como la F103 están implicados en el acoplamiento mecánico entre la activación y la inactivación (154;155). Actualmente, existe cierta controversia sobre la conformación que adopta el filtro de selectividad en el estado inactivado. Experimentos de cristalografía apuntan a que la conformación del filtro de selectividad en el estado inactivado sería similar a la obtenida en condiciones de baja concentración de  $K^+$  (con baja ocupación iónica, **Figura 2.14**) (156;157). Sin embargo, estudios recientes que han empleado canales mutantes cuyo filtro de selectividad tiene impedida la formación del estado no conductor indican que estos canales son capaces de inactivarse (158;159).

Se conoce una gran variedad de biomoléculas que influyen sobre la actividad de KcsA interaccionando con distintas partes del canal. Varios estudios demuestran que este canal necesita la presencia de fosfolípidos aniónicos en la membrana para poder llevar a cabo la conducción iónica (89;137;160). Además, se ha descrito que KcsA interacciona con polímeros no proteicos, como son los polifosfatos inorgánicos (poliP) y polihidroxibutirato (PHB), a través del dominio C-terminal regulando su actividad (161;162). Por otra parte, las sales de amonio cuaternario son bloqueadores clásicos de canales de potasio y han sido utilizadas ampliamente como sondas para obtener información sobre variaciones en la estructura del poro. En el caso de KcsA, el TEA bloquea las corrientes de  $K^+$  por la parte intra y extracelular de forma dependiente de voltaje y del tipo y concentración de iones en el filtro de selectividad (163;164). En cambio, el TBA (tetrabutilamonio) sólo es capaz de bloquear al canal por la parte intracelular, uniéndose a la cavidad central e impidiendo el paso de iones (165;166). Por último, nuestro grupo de investigación ha comprobado que KcsA experimenta un proceso de inactivación tipo N tras la unión de un péptido sintético que presenta la misma secuencia que el dominio N-terminal del canal de potasio eucariota Shaker B, reafirmando el empleo de KcsA como modelo de canales de potasio (167).

### 2.3.6. Estudios de unión de iones a KcsA

Desde el descubrimiento de los canales iónicos, uno de los objetivos principales ha sido estudiar la interacción entre los iones y estas proteínas con el fin de comprender cómo se lleva a cabo la selectividad y conducción iónica. En general, en estas investigaciones se han empleado técnicas de alta resolución como la cristalografía de rayos X o técnicas electrofisiológicas aunque, como se ha indicado a lo largo de la Introducción, no se conocen los mecanismos precisos que rigen estos fenómenos. En este aspecto, nuestro grupo de investigación se propuso aportar nuevos datos empleando otros métodos que, si bien, no han sido comúnmente utilizados en el campo de los canales iónicos, se ha demostrado que constituyen una herramienta de gran utilidad para el estudio de estas proteínas. Para estos ensayos se empleó la espectroscopia de fluorescencia (*ver metodología en apartado 4.6*), aprovechando las propiedades fluorescentes de los residuos de triptófano que presenta el canal (**Figura 2.10.A**) y la sensibilidad de éstas a los cambios conformacionales inducidos por la unión de iones.

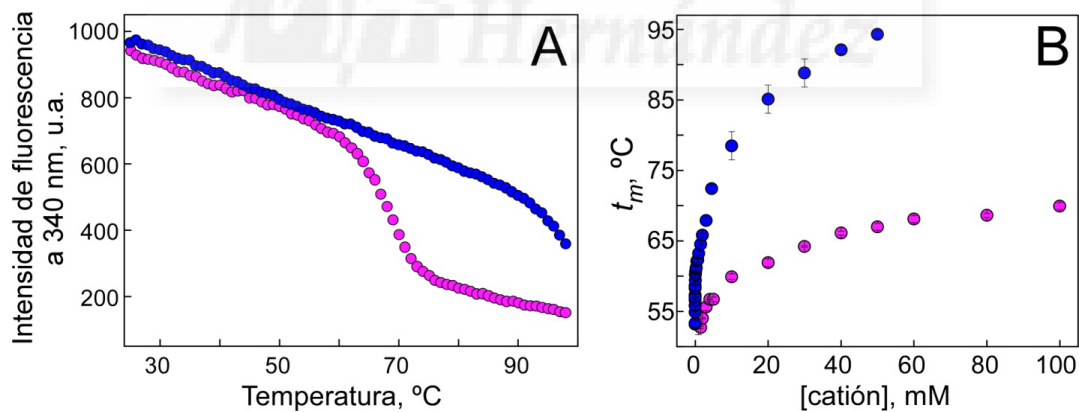


**Figura 2.16.** Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del canal KcsA silvestre solubilizado en presencia de KCl 100 mM (azul) o NaCl 100 mM (rosa) ( $\lambda_{\text{excitación}} = 280$  nm). Figura adaptada de (105).

En primer lugar, se estudió el efecto de un ión conductor ( $K^+$ ) y otro no conductor ( $Na^+$ ) sobre la estructura terciaria de KcsA a través de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del canal (105). La **Figura 2.16** muestra cómo el espectro es sensible al ión presente en el medio, estando desplazado hacia el azul (longitudes de onda menores) en presencia de  $K^+$  y hacia el rojo (longitudes de onda mayores) en presencia de  $Na^+$ . Esta variación pone de manifiesto las diferencias en cuanto a la exposición de los W: en presencia de  $K^+$  están expuestos a un ambiente más polar que

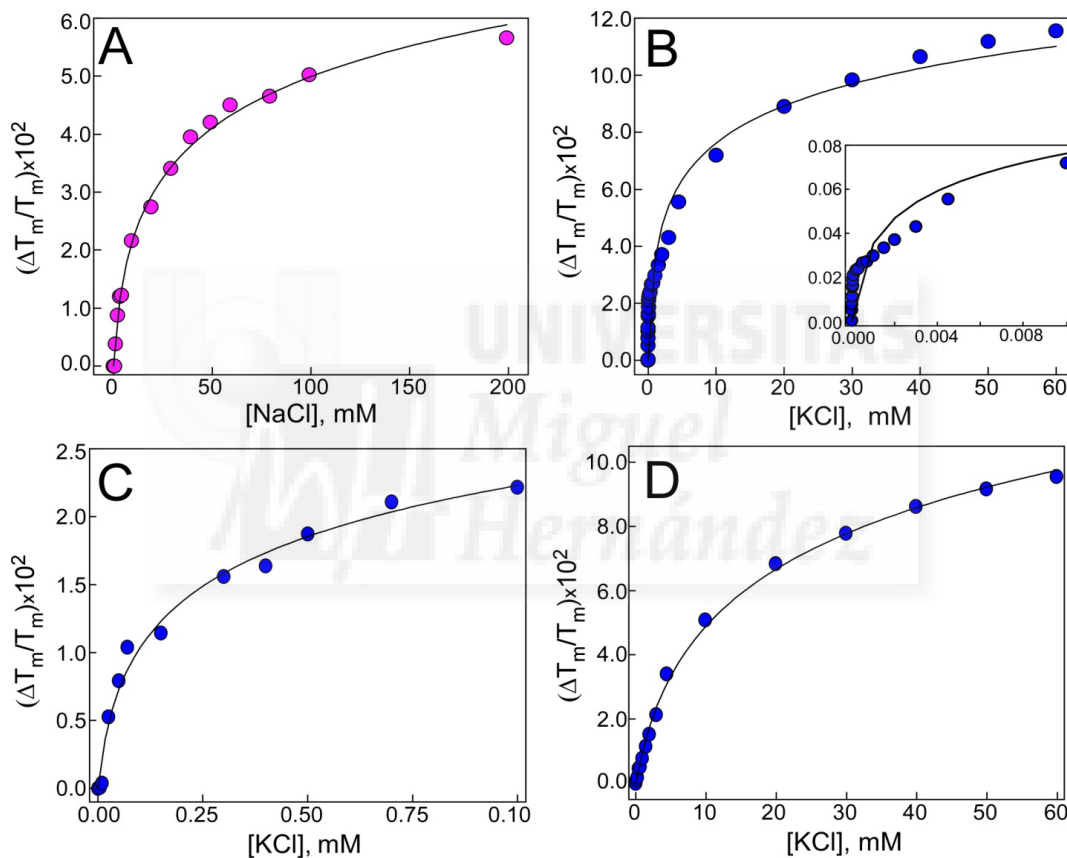
en presencia de  $\text{Na}^+$  (168). Por lo tanto, este tipo de experimentos permite detectar cambios conformacionales en función del ión presente. Estudios posteriores revelaron que la fluorescencia procedente de los residuos W67 y 68, situados en las inmediaciones del filtro de selectividad, es la más sensible a los cambios conformacionales que se producen como consecuencia de la unión de iones (88).

Posteriormente, se desarrolló un ensayo basado en la monitorización de la desnaturalización térmica de KcsA a partir de su fluorescencia intrínseca en diferentes condiciones iónicas (88;96). Estos estudios revelaron que la desnaturalización térmica del canal solubilizado es un proceso cooperativo e irreversible (Figura 2.17.A) y la temperatura del punto medio de desnaturalización térmica ( $t_m$ ) resultó ser un valioso observable experimental debido a su amplio rango de variación en función de la concentración y tipo de ión presente en el medio (más de 40 °C o alrededor de 20 °C en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{K}^+$  o  $\text{Na}^+$ , respectivamente) (Figura 2.17.B). De este modo, se observó que ambos iones estabilizan la proteína frente a la desnaturalización térmica, aunque la interacción con el ión  $\text{K}^+$  es más estabilizante que con el ión  $\text{Na}^+$  (88).



**Figura 2.17.** **A)** Monitorización de la desnaturalización térmica de KcsA solubilizado a partir de su intensidad de fluorescencia intrínseca a 340 nm ( $\lambda_{\text{excitación}} = 280$  nm). Se muestra un ejemplo representativo de KcsA 1  $\mu\text{M}$  en tampón HEPES 20 mM, pH 7.0, DDM 5 mM, NMDG 5 mM y KCl 100 mM (círculos azules) o NaCl 100 mM (círculos rosas). **B)** Dependencia de la estabilidad térmica de KcsA con la concentración de KCl (azul) o NaCl (rosa). Las muestras utilizadas en este experimento son las mismas que las del panel A, a excepción de que en este caso se añadieron concentraciones crecientes de la sal correspondiente. Figura adaptada de (88).

Las curvas de unión de estos dos iones se analizaron en detalle y se detectó que el incremento en la  $t_m$  con la concentración de  $\text{Na}^+$  ocurre en un único evento presentando una constante de disociación ( $K_D$ ) en el rango mM (Figura 2.18.A). Sin embargo, el ajuste de los datos experimentales correspondientes a la unión de  $\text{K}^+$  a un evento de unión (Figura 2.18.B) puso de manifiesto la existencia de un segundo evento siendo un proceso bifásico (88), de forma que, se determinó un primer evento con una  $K_D$  en el rango  $\mu\text{M}$  (alta afinidad) (Figura 2.18.C) y otro en el mM (baja afinidad) (Figura 2.18.D) (88).



**Figura 2.18.** Ajuste (líneas continuas) de los datos experimentales mostrados en la Figura 1.18.B empleando la ecuación descrita en (88). **A)** Ajuste de los datos de la unión de  $\text{Na}^+$  a KcsA a un único evento de unión con una  $K_D = 3.3 \pm 0.5$  mM. En el caso de  $\text{K}^+$ , este ajuste no es suficiente cuando se tiene en cuenta la titulación completa (**B)** (en este panel también se muestra una ampliación de los primeros puntos). Sin embargo, el ajuste es óptimo cuando el rango de baja concentración de  $\text{K}^+$  ( $K_D = 1.9 \pm 0.5$   $\mu\text{M}$ ) (**C)** y de alta concentración ( $K_D = 2.5 \pm 0.2$  mM) (**D)** se analizan por separado, sugiriendo que KcsA presenta, como mínimo, dos conjuntos de sitios de unión de  $\text{K}^+$ . Figura modificada de (88).

De este modo, se encontraron dos conjuntos de sitios de unión de potasio (uno de alta y otro de baja afinidad) y un conjunto de sitios de unión de sodio (de baja afinidad). En base a estos resultados y a los obtenidos a partir de las estructuras cristalográficas de KcsA en presencia de baja y alta concentración de  $K^+$  (62) (*ver apartado 2.3.4*), nuestro grupo propuso que: el evento de unión de alta afinidad por potasio está asociado a la formación de la conformación no conductora del filtro de selectividad, mientras que, a medida que aumenta la concentración de potasio, se produciría la unión del segundo ión con menor afinidad para formar la conformación conductora y, de esta forma, permitir la conducción iónica. Por otra parte, el evento de unión de sodio fue asociado a la formación de una conformación no conductora diferente a la anterior. De este modo, se determinaron los siguientes equilibrios en cada caso:



Por lo tanto, en condiciones fisiológicas la relación entre la concentración de potasio y sodio, así como sus constantes de disociación relativas, serían las que determinarían el grado de ocupación y el tipo de ión que se uniría al canal regulando, de este modo, la conducción y selectividad iónicas.

### 2.3.7. Presentación del trabajo de Tesis Doctoral

El descubrimiento de alteraciones en canales iónicos como origen de diversas enfermedades ha dirigido a numerosos proyectos de investigación en las últimas décadas hacia la búsqueda de moléculas que actúen sobre ellos y modulen estas anomalías (169). De hecho, muchos fármacos empleados en la actualidad, como anestésicos locales, tranquilizantes, fármacos frente a la epilepsia o frente a la hipertensión, presentan un canal iónico como diana terapéutica (21;169). Sin embargo, cabe destacar la relevancia del estudio de la estructura y función de estas proteínas, tanto a nivel fisiológico como patológico, puesto que es la base tanto para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas como para ampliar nuestro conocimiento

sobre las canalopatías. No obstante, en muchas ocasiones el estudio de canales eucariota no es una tarea fácil debido a su gran tamaño, elevada complejidad y su escasa resistencia frente a condiciones experimentales adversas (como las que pueden ser utilizadas en los estudios de cristalografía de rayos X). En este sentido, el empleo del canal de potasio procariota KcsA como modelo experimental ofrece numerosas ventajas, principalmente debido a su similitud con sus homólogos eucariota y la disponibilidad de su estructura cristalográfica a una elevada resolución (*ver apartado 2.3*).

Una de las propiedades características y fundamentales de los canales de potasio es su capacidad para conducir este ión a una elevada velocidad mientras mantienen la selectividad en presencia de otras especies iónicas. Como se ha indicado anteriormente (*ver apartado 2.3.4*), no existe un consenso claro sobre los factores que participan en el mecanismo de selectividad y, además, todavía queda por esclarecer cómo logran estas proteínas que estos mecanismos, aparentemente incompatibles, ocurran a la vez. Por ello, se requieren más estudios dirigidos en este sentido, lo cual ha sido el propósito principal de la presente Tesis Doctoral.





# 3. OBJETIVOS





En base a los resultados obtenidos previamente por parte de nuestro grupo de investigación (*ver apartado 2.3.6*), se planteó la siguiente **hipótesis inicial**: la afinidad de unión de iones al filtro de selectividad de los canales de potasio es un factor fundamental en el mecanismo de conducción y selectividad de los mismos, siendo los estados de alta afinidad los responsables de seleccionar un determinado ión, mientras que los de baja afinidad permitirían su conducción a elevada velocidad. Para contrastar esta hipótesis y profundizar en los mecanismos moleculares que subyacen tras estos fenómenos, en la presente Tesis doctoral se ha empleado el canal de potasio KcsA como herramienta de trabajo y se han propuesto los siguientes **objetivos**:

**1) Estudiar las características de unión de iones a una determinada conformación del filtro de selectividad.**

Se emplean canales mutantes de KcsA cuyo filtro de selectividad se encuentra, principalmente, en la conformación conductora (KcsA E71A) o no conductora (KcsA M96V) y se estudia la unión de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a cada uno en situación de no competencia.

**2) Profundizar en el estudio de la interacción ión-filtro de selectividad empleando diferentes iones conductores y no conductores.**

Se amplían los estudios previos empleando varios cationes con propiedades de conducción y grados de ocupación del filtro de selectividad distintos a los de los cationes anteriores ( $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ ).

**3) Explorar la unión de iones a sitios específicos del filtro de selectividad y en situación de competencia.**

Se caracterizará la unión de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  en presencia del bloqueador intracelular TBA y se llevarán a cabo estudios de competencia entre iones conductores y no conductores.



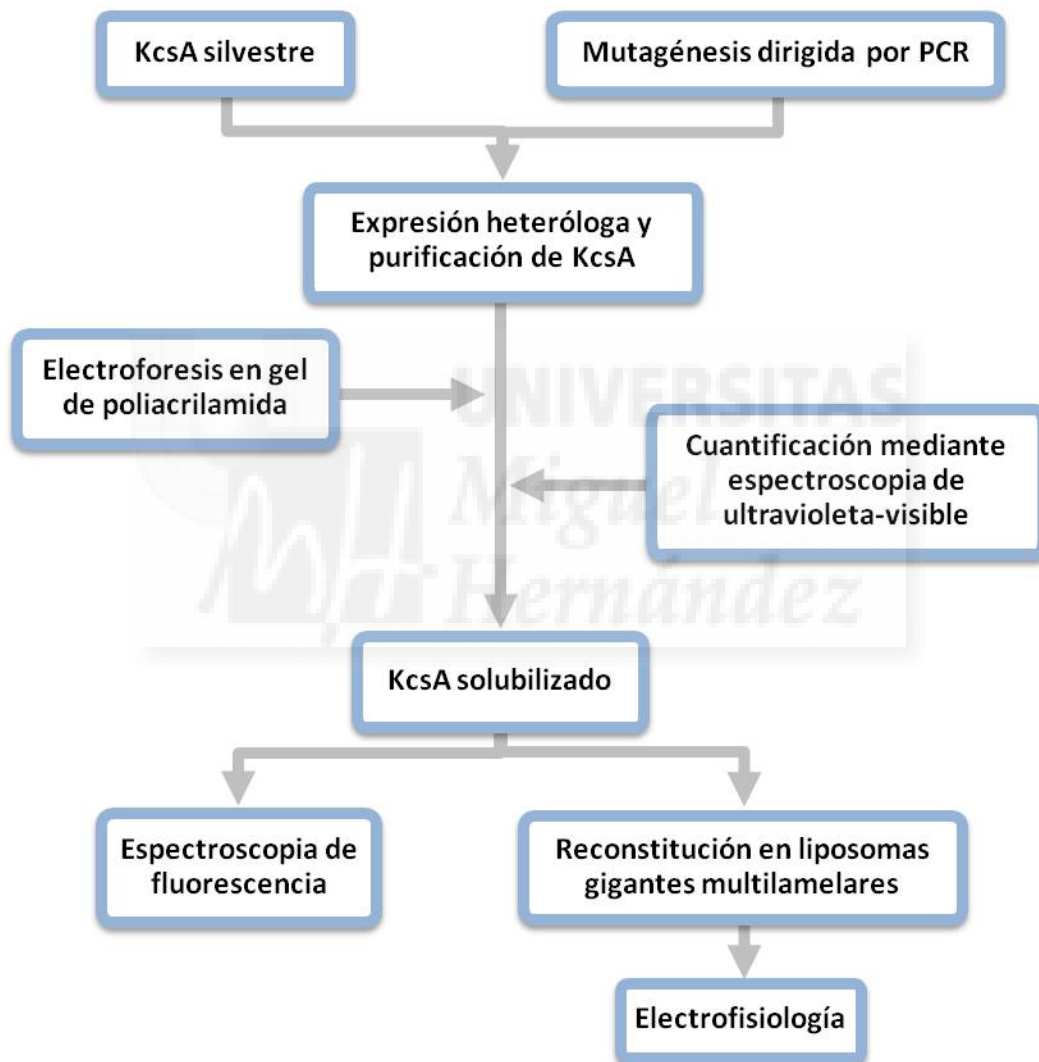
# 4. METODOLOGÍA





### 4.1. Introducción

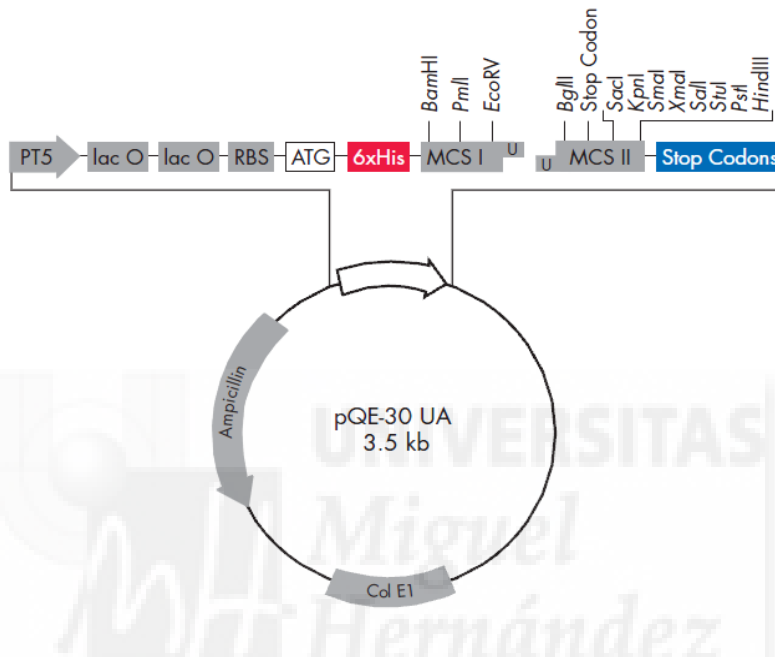
Los materiales y métodos empleados en la publicación y manuscritos que forman parte de esta Tesis Doctoral se detallan en cada uno de ellos. En este capítulo se presenta un resumen de las principales técnicas y métodos empleados durante el desarrollo de la Tesis para facilitar la comprensión del lector. A continuación, se muestra un esquema de los mismos (**Esquema 4.1**):



**Esquema 4.1.** Esquema de las principales técnicas y métodos empleados durante la Tesis Doctoral.

## 4.2. Mutagénesis dirigida por PCR

El gen *kcsa* clonado en un vector de expresión fue amablemente cedido por los Dres. Marco Caprini y Antonio V. Ferrer a nuestro grupo antes del inicio de la presente Tesis Doctoral. Este vector es el pQE-30 (Qiagen) que provee resistencia a ampicilina y un fragmento seis histidinas que queda unido al extremo N-terminal de la proteína (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Representación de la composición del vector pQE-30 (Qiagen). **PT5**: promotor del bacteriófago T5; **lac O**: operador lac; **RBS**: sitio de unión de ribosomas; **ATG**: codón de iniciación; **6xHis**: secuencia de hexahistidinas; **MCSI** y **MCSII**: sitios de clonación múltiple; **Stop Codons**: codones de terminación; **Col E1**: origen de replicación Col E1; **Ampicillin**: gen de resistencia a ampicilina.

Para determinados estudios, se precisó realizar mutaciones puntuales en determinados residuos cercanos al filtro de selectividad de KcsA, concretamente, las mutaciones E71A y M96V. Para ello, se diseñaron unos cebadores formados por el codón que codifica el aminoácido mutante (A o V, respectivamente) flanqueado por codones de la secuencia silvestre y cebadores complementarios. La secuencia de estos cebadores se especifica en la **Tabla 4.1**:





funcionamiento del operón lac que, a su vez, controla la expresión del gen kcsa (Figura 4.1).

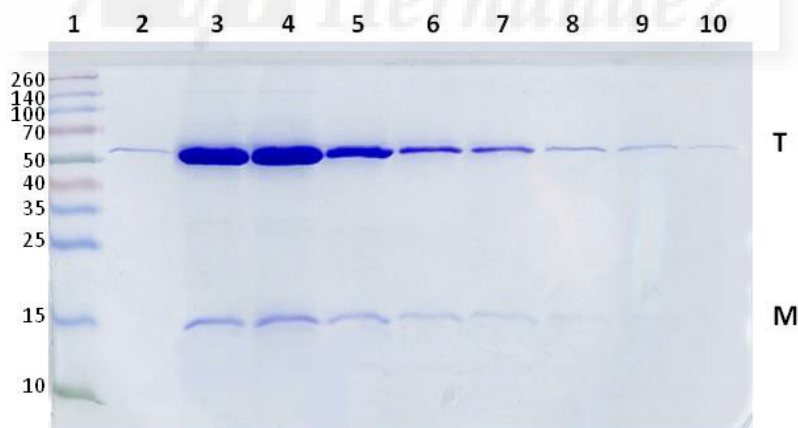
Una vez expresada nuestra proteína, el cultivo bacteriano se centrifuga y se procede a la lisis enzimática y mecánica del sedimento bacteriano. Para ello, se resuspende el sedimento con un tampón que contiene lisozima e inhibidores de proteasas (para evitar que degraden nuestra proteína) y se somete a sonicación. A continuación se centrifuga la muestra y se solubiliza el sedimento (compuesto por las membranas celulares que contienen nuestra proteína) en presencia del detergente *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltósido (DDM) durante 2 horas.

Como se ha mencionado anteriormente, el canal KcsA recombinante se expresa junto con un fragmento de seis histidinas unido en el extremo N-terminal (Figura 4.1), lo que permite la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a través de una matriz de grupos quelantes de Ni<sup>2+</sup>. Esto se consigue gracias a que el anillo de imidazol de la cadena lateral de los residuos de histidina es capaz de interaccionar de forma específica con el ión Ni<sup>2+</sup> que se encuentra quelado en la matriz. De esta forma, la muestra solubilizada se incuba con la matriz durante 2 horas para favorecer esta unión y, posteriormente, esta mezcla se carga en una columna de cromatografía. A continuación, se realizan varios lavados con suficiente tampón para descartar el resto de proteínas que no se han unido de forma específica a la matriz. La elución de KcsA se lleva a cabo mediante la adición de una elevada concentración de imidazol, que desplaza a las histidinas de la proteína unidas al Ni<sup>2+</sup>. Además de imidazol, el tampón de elución contiene HEPES 20 mM, pH 7, DDM 5 mM y 100 mM de la sal correspondiente según el estudio que se vaya a realizar, generalmente, KCl. El volumen eluido de la columna se recoge en distintas fracciones, entre las que se encuentra la proteína.

#### 4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida se utilizó de forma rutinaria después de cada purificación para comprobar tanto el resultado de ésta como la integridad estructural de KcsA. Durante su desarrollo, se usó el detergente aniónico SDS. Dada la naturaleza anfipática de esta molécula, tiene la capacidad de interactuar tanto con regiones hidrofóbicas como con regiones con carga positiva del canal, proporcionando una carga negativa neta. De este modo, la carga por unidad de masa es constante y la movilidad electroforética depende exclusivamente del tamaño molecular de la proteína (170).

Un pequeño volumen de cada fracción recogida de la cromatografía de afinidad, utilizada durante la purificación del canal (*ver apartado 4.3*), se carga en el gel SDS-PAGE (13.5 % acrilamida/bisacrilamida) siguiendo el orden de elución (**Figura 4.2**). Tras la tinción del gel con azul de Coomassie se detecta, principalmente, una banda superior de unos 55 kDa correspondiente al tetrámero (T) y otra inferior, de 15 kDa aproximadamente, representante de una pequeña población de proteína que se encuentra en forma monomérica (M).



**Figura 4.2.** SDS-PAGE (13.5 %) teñido con azul de Coomassie que muestra el resultado de la expresión y purificación de KcsA silvestre a partir de 4 L de cultivo en presencia de KCl 100 mM. Calle 1: patrón de peso molecular (valores en kDa), calles 2-10: 10  $\mu$ L de las fracciones 1-9, respectivamente, recogidas de la cromatografía de afinidad empleada para purificar el canal. Se puede observar la banda correspondiente al tetrámero (T) y al monómero (M).

#### 4.5. Espectroscopia de ultravioleta-visible

Después de comprobar el resultado de la purificación mediante SDS-PAGE, se determinó la concentración de proteína a partir de su absorbancia en el ultravioleta. Previamente, se unifican las fracciones que contienen proteína y se dializan frente al tampón HEPES 20 mM, pH 7, DDM 5 mM y KCl 100 mM (o la sal correspondiente) para eliminar de esta forma el imidazol empleado en la elución (*ver apartado 4.3*), cuyas propiedades espectroscópicas en esta región del espectro interfieren en la cuantificación de la proteína.

Una vez obtenida la absorbancia de la muestra a 280 nm mediante un espectrofotómetro, se determina la concentración de proteína utilizando la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times C \times l \quad \text{Ecuación 1}$$

donde A corresponde a la absorbancia (en este caso a 280 nm),  $\epsilon$  al coeficiente de extinción molar a esta longitud de onda, para KcsA silvestre es  $34,950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , C se refiere a la concentración molar de la muestra y l designa el paso óptico empleado en la medida.

El rendimiento de la purificación de KcsA silvestre suele ser 1-2 mg/ L de cultivo, si bien, este dato puede variar cuando se purifica un canal mutante. Tras determinar la concentración de proteína, se prepara la muestra para el experimento correspondiente.

#### 4.6. Espectroscopia de fluorescencia

En la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo varios estudios sobre los cambios en la estructura terciaria de KcsA en distintas condiciones experimentales empleando la espectroscopia de fluorescencia. Esta técnica se basa en que ciertas moléculas (fluoróforos) son capaces de absorber radiación electromagnética, pasar a

un estado excitado y volver al estado fundamental mediante la emisión de fotones, fenómeno conocido como fluorescencia (168).

Los fluoróforos suelen estar compuestos por enlaces conjugados y anillos aromáticos. En las proteínas, los principales fluoróforos son los aminoácidos aromáticos: triptófano, tirosina y fenilalanina. La emisión de fluorescencia en proteínas suele estar dominada por los triptófanos, debido a que presentan un mayor rendimiento cuántico (número de fotones emitidos por fotón absorbido) (168). Esta emisión de fluorescencia se representa mediante un espectro de emisión, en el que se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia emitida en un rango de longitudes de onda. Además, la fluorescencia emitida por los fluoróforos es muy sensible a su entorno, por lo que el estudio de su espectro de emisión en distintas condiciones experimentales puede aportar información valiosa sobre la estructura terciaria de la proteína en esa zona (Figura 2.16). En el caso del triptófano, el espectro de emisión estará desplazado hacia longitudes de onda menores (azul) y aumentará su intensidad de fluorescencia cuando se encuentre en un entorno apolar (por ejemplo, en una región hidrofóbica de la proteína), mientras que se desplazará hacia longitudes de onda mayores (rojo) y disminuirá su intensidad cuando esté expuesto a un entorno polar (por ejemplo, tras la desnaturalización de la proteína) (88;105;168). Una forma matemática para cuantificar estos cambios en la forma y posición del espectro de emisión de fluorescencia es a través del cálculo del “centro de masas” o longitud de onda promedio ponderada por la intensidad,  $\langle \lambda \rangle$ , mediante la siguiente ecuación (171):

$$\lambda = \frac{\sum_i \lambda_i \cdot I_i}{\sum_i I_i} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde  $I_i$  es la intensidad de fluorescencia a una determinada longitud de onda  $\lambda_i$ .

La espectroscopia de fluorescencia resultó ser una técnica muy útil en el estudio de KcsA, gracias a que cada una de sus subunidades contiene cinco residuos de triptófano (Figura 2.10.A), dos de ellos (W67 y 68) ubicados en las inmediaciones del filtro de selectividad, donde se producen los principales cambios estructurales como consecuencia de la unión de iones (15). Los espectros de emisión de fluorescencia de

KcsA solubilizado en distintas condiciones iónicas fueron registrados entre 300 y 400 nm, puesto que el máximo de emisión del triptófano se encuentra alrededor de 350 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm (correspondiente al máximo de absorción de este residuo).

La dependencia de la intensidad de fluorescencia de los triptófanos con las características del entorno también permitió estudiar el proceso de desnaturalización térmica de KcsA en distintas condiciones experimentales. La desnaturalización fue monitorizada mediante los cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca del canal a 340 nm ( $\lambda_{\text{excitación}} = 280$  nm). A medida que aumenta la temperatura, la proteína va perdiendo su estructura nativa y se detecta un descenso en la intensidad de fluorescencia de forma cooperativa (**Figura 2.17.A**), indicando que probablemente los triptófanos quedan expuestos al soluto, en este caso, una solución acuosa (88;96). A partir de estos datos experimentales se pudo determinar el valor del punto medio de desnaturalización térmica de KcsA ( $T_m$ ) empleando el ajuste matemático de la siguiente ecuación (96):

$$F_{340} = \frac{(m1+m2 \cdot T) + (m3+m4 \cdot T) \cdot e^{\frac{-(m5 \cdot (m6-T))}{R \cdot 298}}}{1 + e^{\frac{-(m5 \cdot (m6-T))}{R \cdot 298}}} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde  $F_{340}$  es la intensidad de fluorescencia registrada a cada temperatura,  $T$  es la temperatura,  $m6$  corresponde a la temperatura del punto medio de desnaturalización expresado en Kelvin ( $T_m$ ),  $m1$  y  $m3$  son las intensidades de fluorescencia del estado nativo y desnaturalizado, respectivamente,  $m2$  y  $m4$  corresponden a las pendientes de las líneas de base del estado nativo y desnaturalizado, respectivamente,  $m5$  es la pendiente de la recta que pasa por el punto medio de la transición ( $T_m$ ) y  $R$  es la constante de los gases ideales en cal/mol·K.

De esta forma, se obtuvo el valor de  $T_m$  en presencia de distintos iones y concentraciones. Los datos correspondientes a la variación de  $T_m$  en función de la concentración de ión añadido [L] (**Figura 2.18**) se utilizaron para estimar la constante de disociación del complejo proteína-ión ( $K_D$ ) mediante el ajuste matemático de la siguiente función (88):

$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{T_m - (T_m)_0}{T_m} = \frac{R \cdot (T_m)_0}{\Delta H_0} \cdot \ln \left[ 1 + \frac{[L]}{K_D} \right] \quad \text{Ecuación 4}$$

donde  $T_m$  y  $(T_m)_0$  corresponden a la temperatura de desnaturalización (en grados Kelvin) de la proteína en presencia y ausencia de ligando añadido, respectivamente, y  $\Delta H_0$  es el cambio de entalpía asociado a la desnaturalización de la proteína en ausencia de ligando.

#### 4.7. Reconstitución de KcsA en liposomas gigantes multilamelares de asolectina

Para poder llevar a cabo los estudios electrofisiológicos de la presente Tesis Doctoral, se emplearon como sistema experimental vesículas lipídicas que contienen en su membrana únicamente el canal KcsA. En cuanto al componente lipídico de las vesículas se utilizó asolectina, un extracto lipídico de soja compuesto principalmente por fosfatidilcolina, que se ha utilizado previamente con éxito para llevar a cabo estudios funcionales tanto de KcsA como de otros canales (57;172). Los pasos para la reconstitución de KcsA en liposomas gigantes de asolectina se detallan a continuación:

En primer lugar, se preparan vesículas unilamelares de asolectina. Para ello, se disuelve la cantidad requerida de asolectina en cloroformo:metanol (2:1) y se seca de forma homogénea en un rotavapor. La película lipídica se hidrata en tampón KCl 100 mM, HEPES 10 mM, pH 7, a 5 mg/ml y se sonica hasta que la mezcla quede homogénea y transparente, lo que indica que las vesículas son unilamelares. La preparación puede almacenarse en  $N_2$  líquido hasta su uso.

El siguiente paso consiste en reconstituir el canal en las vesículas unilamelares preparadas previamente. Estas vesículas se solubilizan en DDM a una relación molar detergente/lípido de 0.8 y se incuban con KcsA solubilizado procedente de la purificación a una relación molar lípido: proteína de 100,000:1 durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Se utiliza esta elevada relación lípido:proteína para favorecer la detección de canales aislados en los registros de electrofisiología. A continuación, se elimina el detergente de la muestra mediante incubación con polímeros adsorbentes (Bio-beads, Bio-Rad) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Tras la incubación, se dejan sedimentar los polímeros y se separan de la proteína reconstituida por decantación. Por último, se centrifugan las vesículas reconstituidas durante 1 hora a 60,000 rpm y 4 °C y se resuspende el sedimento en KCl 100 mM, HEPES 10 mM, pH 7. La muestra puede almacenarse en N<sub>2</sub> líquido hasta su uso.

Finalmente, la proteína reconstituida en vesículas unilamelares de asolectina se depositó sobre un vidrio y se sometió a un ciclo de deshidratación/rehidratación a partir del cual se obtuvieron liposomas gigantes multilamelares de 50 a 100 µm de diámetro (**Figura 4.3**) con KcsA incorporado en sus membranas (140;172).

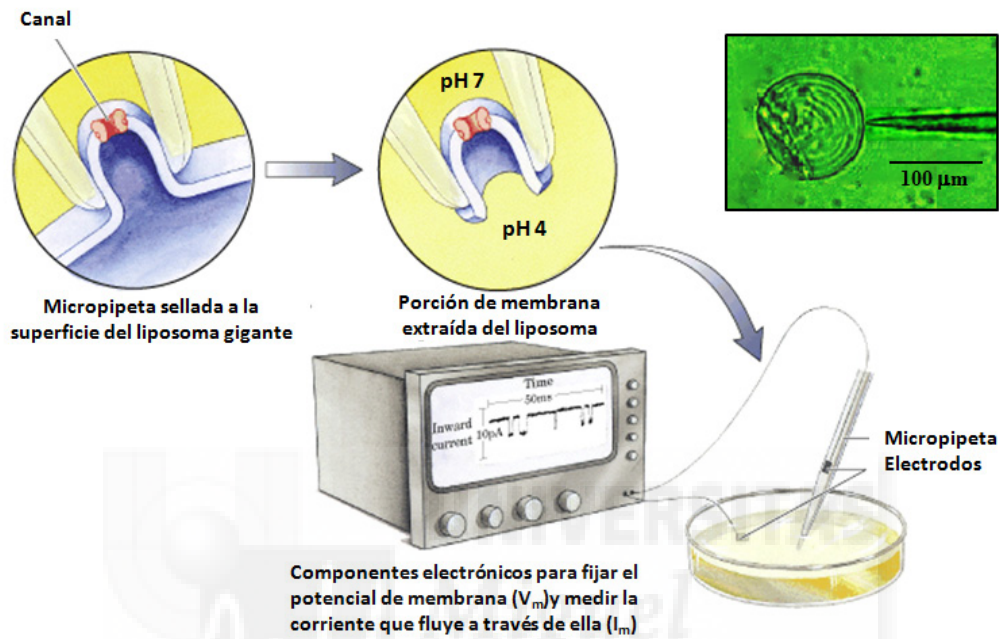
#### 4.8. Electrofisiología

Las técnicas electrofisiológicas se han empleado extensamente en el estudio de la actividad de canales iónicos (*apartado 2.1.2*). En esta Tesis Doctoral se ha utilizado la técnica de fijación de membrana (*patch clamp*) en configuración de parche escindido “interior-fuera” (*inside-out*) para el registro de la actividad de KcsA reconstituido en liposomas gigantes multilamelares. La ventaja que ofrece esta técnica es que permite medir la corriente de una pequeña región de la membrana (parche) que contiene uno o pocos canales iónicos (**Figura 4.3**).

Para llevar a cabo esta técnica se utiliza una micropipeta de vidrio de punta fina (su diámetro se encuentra alrededor de 1 µm) que se rellena con la solución correspondiente (solución extracelular) y a la cual se le introduce un filamento de AgCl, denominado electrodo de registro (**Figura 4.3**) (1;19;173). La micropipeta se introduce en la placa donde se han depositado los liposomas gigantes con la solución correspondiente (solución intracelular) con la ayuda de un micromanipulador para desplazar la micropipeta y un microscopio para visualizar la preparación. En esta placa también se introduce el electrodo de referencia (filamento de AgCl) que, a su vez, está conectado con un amplificador, del mismo modo que el de registro. El siguiente paso es acercar la punta de la micropipeta a la superficie de un liposoma hasta que entren en contacto y, mediante una ligera succión, se forme un sello de alta resistencia (superior a 1 GΩ, por lo que se denomina gigasello). En la configuración “interior - fuera” utilizada en los experimentos de esta Tesis, una vez formado el sello se separa



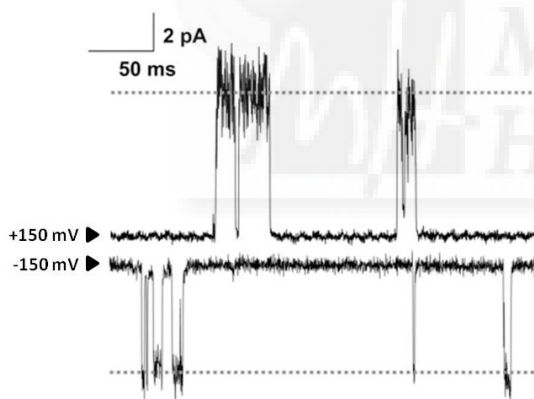
la micropipeta del liposoma, de modo que, la parte intracelular del canal queda expuesta al baño (con la solución intracelular) (Figura 4.3). La ventaja de esta configuración es que permite realizar cambios en la solución intracelular y estudiar el efecto de determinadas moléculas que interaccionan con el canal a través de esta zona.



**Figura 4.3.** Representación del sistema de fijación de membrana (*patch clamp*) en configuración "interior-fuera" (*inside-out*) empleado para el registro de la actividad de canales iónicos. En la figura se muestra el electrodo de referencia conectado directamente a la placa donde se encuentran los liposomas, el electrodo de registro en el interior de una micropipeta de vidrio y el componente electrónico principal, el amplificador, capaz de fijar el potencial de membrana ( $V_m$ ) y registrar la corriente ( $I_m$ ) que fluye a través de ella. En la parte superior derecha se muestra una fotografía de un liposoma gigante multilamelar junto con el extremo final de una micropipeta. Figura modificada de (2).

Uno de los requisitos para que esta técnica se desarrolle con éxito es la formación del gigasello, ya que su elevada resistencia permite aislar eléctricamente esta porción de membrana y, así, registrar únicamente la corriente que fluye a través de ella con una relación señal-ruido apropiada. Dada la pequeña amplitud que suele presentar la corriente que fluye por un canal iónico (del orden de pA), es sumamente importante que el nivel de ruido sea mínimo para poder detectar con precisión estas corrientes (19;173).

El electrodo de registro es capaz de medir el potencial de membrana del sello (en comparación con el electrodo de referencia) y fijarlo en un valor establecido. Cuando estos potenciales son diferentes, por ejemplo, a consecuencia de la apertura de un canal iónico, el sistema electrónico de retroalimentación negativa (ubicado en el amplificador) compensa de forma inmediata esta diferencia inyectando una corriente de la misma amplitud pero de signo opuesto a la que fluye a través de la membrana. De este modo, midiendo la corriente necesaria para que el potencial de membrana se mantenga en el valor establecido, se determina indirectamente la corriente que fluye a través de los canales iónicos situados en el sello de la micropipeta (19;173). Por convención, el flujo de salida de cationes (desde la parte intracelular hasta la extracelular) está definido como corriente positiva y se representa como un pulso dirigido hacia la parte superior de la línea base, mientras que el flujo de entrada (desde el exterior hasta el interior) es una corriente negativa y se representa como un pulso hacia la parte inferior de la línea base (1) (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Registros de KcsA silvestre tomados mediante la técnica de fijación de membrana en configuración “interior-fuera”, con KCl 200 mM en la solución extra e intracelular. El registro superior (+150 mV) muestra corrientes de salida definidas como positivas por convención (intensidad de corriente = 6.5 pA). En cambio, en el registro inferior (-150 mV) se observan corrientes de entrada, consideradas como negativas (intensidad de corriente = - 5 pA). Las flechas indican el estado cerrado (línea base) y las líneas discontinuas el abierto.

Dado que la apertura de KcsA es dependiente de la presencia de pH ácido en la zona intracelular, la composición habitual de las soluciones empleadas en los registros electrofisiológicos fueron las siguientes:

- Solución intracelular (baño): MES 10 mM, pH 4, 100 o 200 mM de la sal correspondiente (generalmente, KCl)
- Solución extracelular (micropipeta): HEPES 10 mM, pH 7, 100 o 200 mM de la sal correspondiente (generalmente, KCl)

De esta forma, se verifica que la actividad registrada procede únicamente de canales cuya parte intracelular se encuentra orientada hacia el baño.

Estas condiciones experimentales se emplearon para evaluar propiedades como la conductancia, probabilidad de apertura y tiempo de residencia del estado abierto de KcsA silvestre, E71A o M96V en presencia de un ión conductor. Se procuró que esta información procediera del registro de un único canal, de modo que, aquellos registros en los que se detectó más de un nivel de conductancia fueron descartados.

Asimismo, se llevaron a cabo estudios de selectividad empleando condiciones “biiónicas” en los que se registró la actividad de KcsA a diferentes voltajes en presencia de dos iones, siendo uno de ellos  $K^+$  (ión de referencia). Los iones objeto de estudio fueron situados en la solución extracelular, puesto que algunos de ellos, como  $Na^+$  o  $Li^+$ , bloquean al canal por la parte intracelular. A partir de cada experimento, se representó la intensidad de corriente frente al voltaje y se determinó el potencial de inversión. El potencial de inversión es el voltaje al cual se invierte el signo de la corriente y su flujo neto es 0. Este parámetro viene determinado por las permeabilidades relativas de los iones estudiados. El ratio de permeabilidades puede determinarse a partir de la ecuación de Goldman–Hodgkin–Katz (1):

$$E_{inv} = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_e + P_X \cdot [X]_e}{P_{K^+} \cdot [K^+]_i + P_X \cdot [X]_i} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde  $E_{inv}$  es el potencial de inversión,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $T$  es la temperatura en grados Kelvin,  $F$  es la constante de Faraday,  $[K^+]_e$  y  $[K^+]_i$  representan la concentración extracelular e intracelular de  $K^+$ , respectivamente, mientras que,  $[X]_e$  y  $[X]_i$  se refieren a la concentración extracelular e intracelular del ión correspondiente, respectivamente. Dado que en este tipo de experimentos las soluciones intra y extracelular presentaban concentraciones iónicas diferentes, se corrigió el potencial de unión (*junction potential*) generado, precisamente, cuando dos soluciones de diferentes concentraciones están en contacto a través de una membrana semipermeable (1;173).

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se han realizado experimentos de electrofisiología utilizando un sistema de fijación de membrana convencional

(Figura 4.3) o, bien, un equipo automático con un sistema externo de perfusión (Port-a-Patch, Nanion Technologies). El funcionamiento de este equipo consiste, principalmente, en la atracción (mediante succión) de los liposomas hacia una pequeña abertura situada en un dispositivo de vidrio, hasta que se forma un sello entre las dos superficies y se realiza un lavado para eliminar el resto del liposoma. De esta forma, la parte extracelular del canal queda en el interior del dispositivo y la intracelular queda expuesta al baño, del mismo modo que la configuración “interior-fuera” del sistema convencional. Los resultados obtenidos mediante este sistema fueron equiparables a los del sistema convencional, si bien, la ventaja que ofrece el sistema automático es que permite realizar los lavados de la solución intracelular con mayor rapidez y eficacia.



# 5. RESUMEN DE RESULTADOS





### 5.1. Unión de iones al filtro de selectividad de KcsA estabilizado en una determinada conformación (condiciones de no competencia)

El objetivo de este trabajo fue estudiar la implicación de las distintas conformaciones del filtro de selectividad en la interacción entre KcsA y los iones  $K^+$  y  $Na^+$  y, por consiguiente, en la conducción y selectividad iónicas. Para ello, se desarrollaron dos canales mutantes cuyas estructuras cristalográficas indican que el filtro de selectividad se encuentra estabilizado, preferentemente, en una determinada conformación: KcsA E71A en la conformación conductora (123) y KcsA M96V en la no conductora (86). Estos residuos están ubicados en las inmediaciones del filtro de selectividad: E71 en la hélice del poro y M96 en la TM2 (*Esquema 1 de la publicación 9.1*).

Los resultados obtenidos a partir de este estudio están recogidos en el *anexo 9.1* (publicación) (174). A continuación se presenta un resumen de los mismos:

- **Estructura cuaternaria.** El canal mutante KcsA E71A, si bien, mantiene su estructura tetramérica tras ser purificado en presencia de  $K^+$  100 mM, la misma concentración de  $Na^+$  induce la monomerización irreversible del canal. Sin embargo, KcsA M96V permanece en forma tetramérica en ambas condiciones.

- **Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca.** Los espectros de KcsA E71A en presencia de  $K^+$  o  $Na^+$  100 mM se encuentran desplazados hacia el rojo respecto a los correspondientes del canal silvestre, siendo este desplazamiento mucho mayor en el caso del  $Na^+$ , lo que se explica teniendo en cuenta la monomerización del canal en estas condiciones. Por otra parte, los espectros de KcsA M96V en estas dos condiciones iónicas son más similares entre sí que en el canal silvestre, es decir, el espectro en presencia de  $K^+$  está más desplazado hacia el rojo que el correspondiente del canal silvestre y en presencia de  $Na^+$  se encuentra más hacia el azul.

- **Estabilidad térmica.** La proteína KcsA E71A en presencia de  $K^+$  100 mM muestra una disminución de unos 30 °C en la estabilidad térmica respecto al canal silvestre ( $t_m = 70$  °C). Este análisis no pudo llevarse a cabo en presencia de  $Na^+$  puesto

que este canal mutante no presenta una estructura tetramérica en estas condiciones. Sin embargo, en el caso de KcsA M96V la estabilidad con  $K^+$  100 mM es de unos 10 °C menor que para el canal silvestre ( $t_m = 88$  °C) y en presencia de  $Na^+$  100 mM es de unos 10 °C superior ( $t_m = 81$  °C), lo que indica que la diferencia de estabilidad térmica entre ambas condiciones es menor en este canal mutante que en el silvestre.

- **Estudios de unión de iones a través de la desnaturalización térmica.** En el caso de KcsA E71A se detecta un único evento de unión de  $K^+$  de baja afinidad ( $K_D = 3.5 \pm 0.5$  mM) que induce un incremento en la estabilidad térmica de alrededor de 35 °C, es decir, este evento presenta características similares al segundo evento de unión de  $K^+$  al canal silvestre que fue asociado a la formación del estado conductor. Por otra parte, la unión de  $K^+$  o  $Na^+$  a KcsA M96V comparten muchas similitudes detectándose en ambos casos dos eventos: un primer evento de unión de unos 15 °C de estabilización que presenta una  $K_D$  de  $57 \pm 14$   $\mu$ M para  $K^+$  y  $3.8 \pm 0.5$  mM para  $Na^+$ , y un segundo evento menos estabilizador que el primero y de menor afinidad ( $K_D = 41 \pm 11$  mM para  $K^+$  y  $K_D = 54 \pm 12$  mM para  $Na^+$ ).

- **Función.** Los registros electrofisiológicos de canal único de KcsA E71A en presencia de  $K^+$  100 mM presentan una probabilidad de apertura notablemente superior (alrededor de 0.9) que en el caso del canal silvestre. Además, los experimentos realizados en condiciones biónicas ( $K^+$  y  $Na^+$ ) revelan que, si bien, este canal mutante conduce preferentemente  $K^+$  frente a  $Na^+$ , esta selectividad está disminuida respecto al canal silvestre, siendo el ratio  $P_{Na^+}/P_{K^+} = 0.1$  (un orden de magnitud superior). Sorprendentemente, se detectan aperturas de KcsA M96V tanto en presencia de  $K^+$  como de  $Na^+$ , aunque de baja probabilidad de apertura y con tasas de inactivación superiores que en el caso de la proteína silvestre.



## 5.2. Caracterización de la interacción entre iones conductores y no conductores y KcsA

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación caracterizaron la unión de  $K^+$  y  $Na^+$  a KcsA silvestre para examinar cómo influye la interacción ión-proteína sobre la conducción y selectividad iónicas (88) (ver apartado 2.3.6). En el presente trabajo, se ampliaron dichos estudios empleando varios cationes con propiedades de conducción y grados de ocupación del filtro de selectividad distintos a los de los cationes anteriores, con la finalidad de apoyar los datos previos y aportar nuevas evidencias experimentales para explicar estos fenómenos. Los criterios empleados para seleccionar los tipos de iones objeto de estudio fueron los siguientes: i) cationes monovalentes empleados comúnmente en el estudio de la conducción y selectividad de otros canales de potasio, y ii) disponibilidad de la estructura cristalográfica de KcsA en presencia del ión en cuestión. De este modo, los cationes seleccionados fueron:  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Tl^+$  y  $Li^+$ .

Los resultados de este trabajo se detallan en el *anexo 9.2* (manuscrito en revisión) (175). A continuación se presenta un resumen de los mismos:

- **Cambios en los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca.** La unión de los iones  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  y  $Tl^+$  induce un mayor desplazamiento del espectro hacia el azul (similar al del  $K^+$ ) que en el caso del  $Li^+$  (desplazamiento equivalente al del  $Na^+$ ).

- **Estabilidad térmica.** La presencia de los iones  $K^+$ ,  $Tl^+$ ,  $Rb^+$  y  $Cs^+$  induce un mayor grado de estabilidad térmica que la unión de iones  $Na^+$  o  $Li^+$ , siendo la secuencia de  $t_m$  en presencia de 50 mM del ión correspondiente:

$$K^+ (\approx 94 \text{ }^\circ\text{C}) > Tl^+ \approx Rb^+ (\approx 90 \text{ }^\circ\text{C}) > Cs^+ (85 \text{ }^\circ\text{C}) \gg Na^+ (67 \text{ }^\circ\text{C}) > Li^+ (61 \text{ }^\circ\text{C})$$

- **Estudios de unión de iones a KcsA silvestre a través de la desnaturalización térmica.** En el caso de la unión de  $Rb^+$  y  $Tl^+$  se detectan dos eventos de unión similares a los determinados en presencia de  $K^+$  tanto en afinidad (el primero con una  $K_D$  en el rango  $\mu\text{M}$  y el segundo en el rango mM) como en grado de estabilización (el segundo más estabilizante que el primero). Para la unión de  $Cs^+$ , también se detectan dos eventos de unión aunque con afinidades inferiores a las anteriores y grados de

estabilización similares entre el primer evento y el segundo. Por otra parte, el ión  $\text{Li}^+$  se une a través de un único evento de unión con características similares al detectado para  $\text{Na}^+$  ( $K_D$  en el rango mM y grado de estabilización alrededor de 20 °C).

- **Estudios de unión de iones a KcsA E71A a través de la desnaturalización térmica.** De forma similar a los resultados anteriormente presentados sobre la unión de  $\text{K}^+$  a este canal mutante, los iones  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Tl}^+$  y  $\text{Cs}^+$  se unen a KcsA E71A a través de un único evento de unión con características similares a las de los correspondientes segundos eventos de unión ( $K_D$  en el rango mM) del canal silvestre. Además, del mismo modo que en presencia de  $\text{Na}^+$ , el ión  $\text{Li}^+$  induce la monomerización del canal KcsA E71A.

- **Conducción iónica en KcsA silvestre.** Se detectan aperturas de canal único en presencia de concentraciones suficientes de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ , aunque con características diferentes. Las aperturas en presencia de  $\text{K}^+$  presentan una mayor conductancia pero menor tiempo de residencia en el estado abierto que en presencia de  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Cs}^+$ . Además, en el caso del  $\text{Cs}^+$ , se necesitó aumentar la concentración iónica (hasta 400 mM) para detectar aperturas. Por otra parte, no se detectan aperturas en presencia de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Li}^+$ .

- **Selectividad en KcsA silvestre.** El análisis de la selectividad del canal silvestre fue llevado a cabo en condiciones biiónicas siendo  $\text{K}^+$  el ión de referencia. Los resultados de este estudio indican que KcsA no presenta una preferencia muy marcada entre los iones conductores ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ ), pero es capaz de seleccionar  $\text{K}^+$  con alta eficacia frente a los iones no conductores  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ . El ratio de permeabilidades determinado respecto a  $\text{K}^+$  es:

$$\text{K}^+(1) > \text{Rb}^+(0.9) > \text{Cs}^+(0.8) \gg \text{Li}^+(0.02) > \text{Na}^+(0.01)$$

### 5.3. Unión de iones a sitios específicos del filtro de selectividad y en situación de competencia

Estudios previos sobre KcsA E71A indicaron que en este canal mutante, si bien se encuentra preferentemente en el estado conductor, se mantiene parcialmente la selectividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (ver apartado 5.1). Este hallazgo parece contradecir nuestra hipótesis inicial en la que se planteó que en la selectividad iónica participaría, principalmente, el estado no conductor (ver apartado 3. Objetivos). Teniendo en cuenta estos resultados, nos propusimos explorar algunos mecanismos que podrían estar implicados en la selectividad iónica durante el estado conductor.

En primer lugar, se estudió la unión de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  a sitios específicos del filtro de selectividad de KcsA silvestre. Para ello, se empleó el bloqueador TBA debido a que: i) se une al canal únicamente por la zona intracelular, ii) esta unión es prácticamente irreversible ( $K_D$  en el rango nM), iii) la estructura cristalográfica de KcsA en presencia del bloqueador indica que la estructura del filtro de selectividad no se ve modificada por esta unión (165;166;176). En presencia del bloqueador, los iones tienen acceso al filtro únicamente por la parte extracelular, de modo que, este ensayo permite poner de manifiesto una posible asimetría de unión de iones al filtro. En segundo lugar, se llevaron a cabo estudios de unión de iones en situación de competencia en la que la condición experimental de partida fue: i) NaCl 100 mM, por lo que el filtro de selectividad se encuentra en la conformación no conductora y, ii) diferentes concentraciones de KCl que inducen una conformación no conductora o conductora del filtro de selectividad. Para llevar a cabo estos experimentos, se estudió la estabilidad térmica del canal en las distintas condiciones experimentales a partir de la monitorización de los cambios de intensidad de fluorescencia intrínseca (ver apartado 4.6).

Los resultados obtenidos a partir de este estudio están recogidos en el *anexo 9.3* (manuscrito en preparación). A continuación se presenta un resumen de los mismos:

- **Estudios de unión de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  al filtro de selectividad de KcsA silvestre empleando el bloqueador intracelular TBA.** En estas condiciones, se observa que  $\text{K}^+$  se

une al canal mediante dos eventos de unión tanto en ausencia como en presencia del bloqueador. No obstante, mientras que el segundo evento de unión presenta unas características similares en ambas condiciones, el primer evento en presencia de TBA presenta una afinidad menor que en ausencia del mismo (aunque sigue estando en el rango  $\mu\text{M}$ ). Por otra parte, se detecta un único evento de unión de  $\text{Na}^+$ , aunque la  $K_D$  es un orden de magnitud superior y la estabilidad térmica aportada por esta unión es notablemente inferior que en ausencia de bloqueador.

- **Unión de iones al canal silvestre en situación de competencia:**

i) **Unión de iones conductores ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ ) a KcsA en presencia de NaCl 100 mM.** En este caso, se partió de un filtro de selectividad en el estado no conductor (NaCl 100 mM) y a medida que aumentó la concentración del ión conductor correspondiente, se observó un amplio incremento de la estabilidad térmica hasta que la  $t_m$  llegó a ser equivalente a la situación de no competencia, en la que sólo se estudia la unión del ión conductor (*ver apartado anterior 5.2*). Además, se detectaron tres eventos de unión para cada ión conductor, en contraposición a los dos eventos determinados en situación de no competencia.

ii) **Unión de  $\text{Na}^+$  a KcsA en presencia de distintas concentraciones de KCl.** Estos experimentos indican que la afinidad de la unión de  $\text{Na}^+$  disminuye considerablemente cuando el filtro se encuentra en un estado conductor (en presencia de altas concentraciones de  $\text{K}^+$ ) respecto a la situación de no competencia, en la que sólo se estudia la unión de  $\text{Na}^+$ .

- **Unión de  $\text{Na}^+$  a KcsA E71A.** En base a los resultados anteriores, se puede predecir que en este canal mutante que se encuentra principalmente en el estado conductor, la afinidad por  $\text{Na}^+$  también disminuirá respecto al canal silvestre ( $K_D \approx 3$  mM). Esta hipótesis fue comprobada mediante estos experimentos, obteniendo una  $K_D$  de la unión de  $\text{Na}^+$  a KcsA E71A de 256 mM.

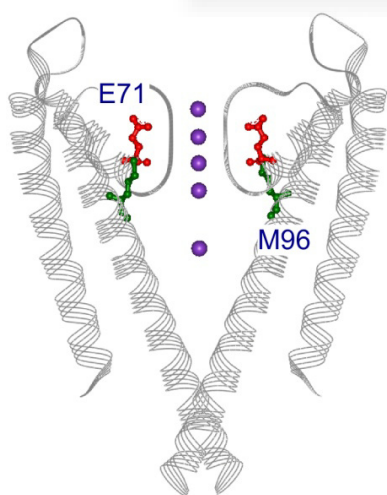
# 6. DISCUSIÓN GLOBAL





La presente Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de una de las propiedades más relevantes de los canales de potasio: su capacidad de conducir este ión a elevada velocidad, mientras mantienen la selectividad frente a otras especies iónicas. Para ello, se ha empleado como modelo de estudio el canal de potasio procariota KcsA (57). El punto de partida se estableció en los estudios de unión de  $K^+$  y  $Na^+$  a KcsA silvestre llevados a cabo previamente por nuestro grupo de investigación, que indicaron que la unión de iones al canal ocurre a través de estados de alta y baja afinidad, en función del tipo de ión (88). Estos estados fueron asociados a conformaciones específicas del filtro de selectividad, de modo que, en presencia de  $K^+$ , los de alta afinidad estarían asociados a la conformación no conductora, mientras que los estados de baja afinidad lo estarían a la conformación conductora. En base a estas conclusiones, se desarrolló la hipótesis inicial en la que se centra la presente Tesis que indica que la afinidad de unión de iones participaría en la conducción y selectividad iónicas, siendo los estados de alta afinidad los responsables de seleccionar un determinado ión, mientras que los de baja afinidad permitirían su conducción a elevada velocidad pero no garantizarían la selectividad.

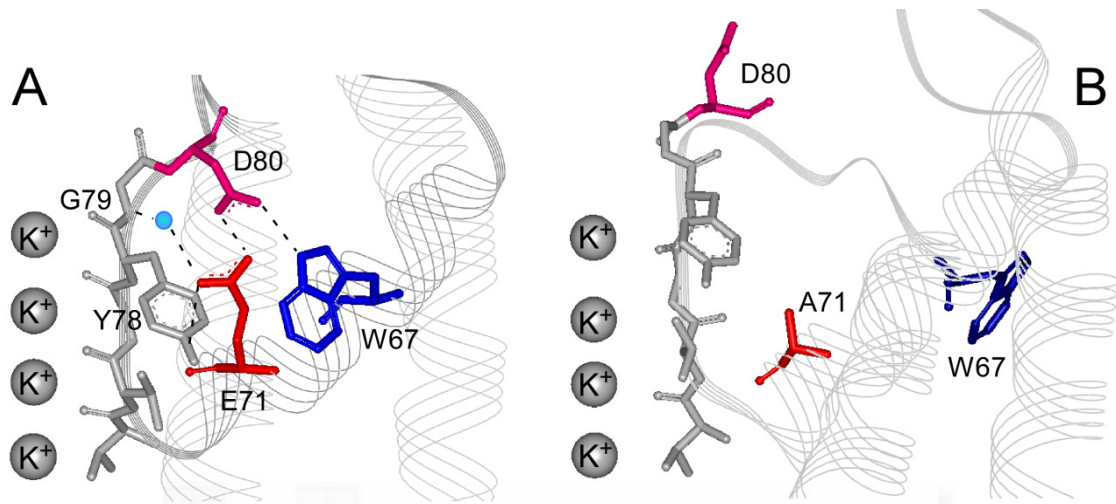
*KcsA E71A y KcsA M96V como modelos para el estudio de las conformaciones conductora y no conductora de forma independiente*



**Figura 6.1.** Representación en cintas de KcsA (PDB 1K4C), donde se muestra la ubicación de los residuos E71 (en rojo) y M96 (en verde), próximos al filtro de selectividad. Las esferas violetas representan la ubicación de los iones  $K^+$ . Para mayor claridad se han representado únicamente dos de las cuatro subunidades de KcsA. Figura obtenida de (177).

La primera aproximación experimental consistió en “aislar” la conformación no conductora y conductora del filtro de selectividad para evaluar la implicación de cada una en la conducción y selectividad iónicas (*ver anexo 9.1*). Para ello, se emplearon

canales mutantes de KcsA cuyas estructuras cristalográficas indican que el filtro se encuentra, preferentemente, en una determinada conformación: KcsA E71A en la conductora (123) y KcsA M96V en la no conductora (86); mientras que el resto de la estructura proteica está conservada respecto al canal silvestre. Los residuos E71 y M96 se encuentran en las inmediaciones del filtro de selectividad (**Figura 6.1**).



**Figura 6.2.** Efecto de la mutación E71A en la estructura del filtro de selectividad de KcsA. **A)** Estructura de la conformación conductora del filtro del canal silvestre (PDB 1K4C), en la que destacan los aminoácidos implicados en estabilizar el estado inactivado. **B)** Estructura del filtro de KcsA E71A (PDB 2ATK), que se encuentra preferentemente en la conformación conductora, en la que se observa que la mutación produce la ruptura de las interacciones que estabilizan el estado inactivado. Figura obtenida de (174).

KcsA E71A ha sido empleado como modelo de canal no inactivado por varios grupos de investigación debido a que: i) los registros electrofisiológicos muestran un aumento de la probabilidad de apertura y una disminución de la inactivación respecto al canal silvestre (123;146;151;178), ii) el filtro de selectividad se encuentra preferentemente en la conformación conductora (**Figura 6.2**), ya que, incluso en presencia de bajas concentraciones de KCl no se detecta la conformación no conductora (151;156;179). Estas características concuerdan con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, en cuanto a que se observó un comportamiento funcional semejante al descrito previamente y, además, en este canal mutante no se detectó el evento de unión de iones de alta afinidad asociado a la formación del estado no conductor del canal silvestre. En cambio, la unión de cationes conductores ( $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Tl^+$  y  $Cs^+$ ) a KcsA E71A se lleva a cabo mediante un único evento con características similares a las del



segundo evento de unión del catión correspondiente al canal silvestre. Como se ha indicado anteriormente, este evento de unión de baja afinidad (rango mM) fue asociado a la formación de la conformación conductora en el canal silvestre (88), por lo que, su hallazgo como evento único en el canal mutante corrobora dicha asociación.

El espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de KcsA E71A en presencia de  $K^+$  se encuentra desplazado hacia el rojo respecto al del canal silvestre, lo que sugiere que uno o varios de los triptófanos que presenta el canal han quedado expuestos a un entorno más polar, siendo un reflejo del cambio conformacional que ocurre como consecuencia de la mutación. El residuo E71 forma parte de una red de interacciones junto con los aminoácidos D80 y W67 (Figura 6.2). La estructura cristalográfica de este canal mutante indica que la mutación a alanina promueve una reorientación de la cadena lateral del W67, lo que podría estar relacionado con la modificación de las propiedades fluorescentes del canal (123). Además, como consecuencia de la ruptura de esta red de interacciones, este canal mutante presenta una menor estabilidad térmica respecto al canal silvestre (unos 30 °C menor en presencia de KCl 100 mM, *ver apartado 5.1*). Otros autores han comprobado que otras mutaciones en el residuo E71 también disminuyen la estabilidad térmica del canal, como es el caso de la mutación E71V (180).

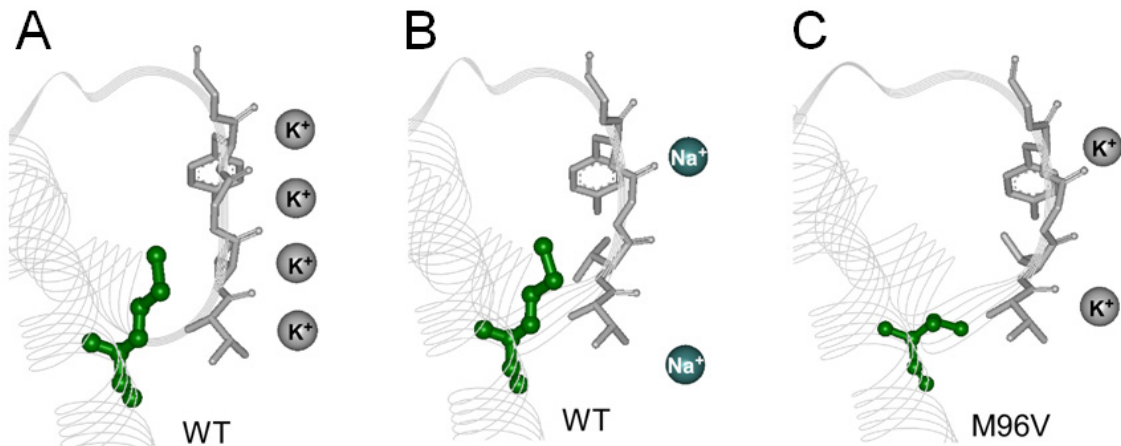
Por otra parte, la monomerización del canal mutante en presencia de  $Na^+$ , observada a través de SDS-PAGE, concuerda con el notable desplazamiento hacia el rojo del espectro de emisión de fluorescencia respecto al canal silvestre, indicando que los triptófanos quedarían expuestos, en este caso, al disolvente como consecuencia de la pérdida de estructura terciaria. El fenómeno de monomerización podría ser debido o bien, a una disminución de la afinidad de la unión de  $Na^+$  a KcsA E71A respecto al canal silvestre, o a una pérdida completa de los sitios de unión de este ión en el filtro de selectividad del canal mutante. El hecho de que KcsA E71A no presente el evento de unión de alta afinidad de iones conductores, podría indicar que en el caso de la unión de  $Na^+$  también puede haber una pérdida de afinidad. Esto supondría que las concentraciones de NaCl empleadas en estos experimentos (100 mM) no serían suficientes para mantener la estructura tetramérica y, por lo tanto, se precise una mayor concentración iónica para retener la estructura tetramérica. Además, la

publicación de la estructura cristalográfica de KcsA E71A en presencia de NaCl por Cheng *et al.* (156), en la que se observa la posición de los iones  $\text{Na}^+$  en el interior del filtro, descarta la opción de la pérdida de los sitios de unión de  $\text{Na}^+$  en este canal mutante.

Teniendo en cuenta que la hipótesis inicial en la que se centra la Tesis Doctoral indica que los estados de alta afinidad serían los responsables de la selectividad iónica, mientras que los de baja afinidad permitirían el paso de iones, aunque no garantizarían la selección de un determinado ión, el canal representante de la conformación conductora, E71A, debería presentar una baja selectividad iónica. Para comprobar esta hipótesis se determinó el ratio de permeabilidades  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en este canal mutante empleando condiciones biiónicas en nuestro sistema de electrofisiología. En estas condiciones, se obtuvo un ratio  $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$  de 0.1 (*ver apartado 5.1*), mientras que para el canal silvestre este ratio fue de 0.01 (*ver apartado 5.2*). Estos resultados indican que E71A es menos selectivo entre  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  que el canal silvestre, lo que respalda la hipótesis inicial y concuerda con los resultados descritos por otros grupos (156). No obstante, el ratio de permeabilidades es inferior a 1, de modo que, el canal mutante sigue conduciendo  $\text{K}^+$  con más facilidad que  $\text{Na}^+$ . Este resultado sugiere que en el estado conductor debe intervenir algún mecanismo que mantenga, aunque parcialmente, la selectividad iónica.

El canal KcsA M96V fue empleado como representante del estado no conductor, puesto que su estructura cristalográfica permanece en esta conformación, incluso en presencia de altas concentraciones de  $\text{K}^+$  (hasta 300 mM) (**Figura 6.3**) (86). Según nuestra hipótesis inicial, este canal debería presentar un único evento de unión de  $\text{K}^+$  de alta afinidad, reflejando una elevada selectividad por este ión. No obstante, los resultados obtenidos discreparon de esta hipótesis, puesto que se detectaron dos eventos de unión de  $\text{K}^+$  de alta y baja afinidad que, sorprendentemente, también se determinaron para la unión de  $\text{Na}^+$  (*ver apartado 5.1*). La similitud entre los eventos de unión de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  a KcsA M96V está en concordancia con la semejanza de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del canal mutante en presencia de estos iones, así como la estabilidad térmica aportada por la unión de los mismos, lo que sugiere que ambos iones inducen la formación de conformaciones similares en el canal. Estos

eventos de unión se diferencian de los detectados para la unión de  $K^+$  al canal silvestre en cuanto a que: i) presentan una menor afinidad, y ii) la formación del estado no conductor aporta una mayor estabilización térmica que la del conductor, mientras que en el canal silvestre ocurre al revés.



**Figura 6.3.** Representación del filtro de selectividad de una subunidad de KcsA silvestre en presencia de altas concentraciones de  $K^+$  (A, conformación conductora, PDB 1K4C), en  $Na^+$  (B, conformación no conductora, PDB 2ITC) y M96V en  $K^+$  (C, conformación no conductora, PDB 2NLJ). En verde se señala la ubicación del residuo M96 o V76 en la hélice TM2.

La detección de eventos de baja afinidad para ambos iones llevó a sospechar que KcsA M96V podría ser capaz de conducir no sólo  $K^+$ , sino también  $Na^+$ , lo que fue comprobado mediante experimentos de electrofisiología. En presencia de ambos iones se detectaron aperturas, aunque con muy baja probabilidad y una cinética de inactivación más rápida que en la proteína silvestre. Estos resultados contradicen los datos obtenidos a partir de la estructura cristalográfica del canal mutante (86). Estas discrepancias podrían explicarse teniendo en cuenta que: i) los registros electrofisiológicos indican que KcsA M96V tiene tendencia a estar en el estado no conductor, de modo que, esta conformación estaría favorecida en estado de equilibrio, como el que se alcanza en el proceso de cristalización; ii) en estos registros se emplea el canal reconstituido en vesículas lipídicas, por lo que, la interacción con los lípidos podría contribuir a que se produjeran ciertos cambios conformacionales para posibilitar la conducción iónica; iii) por razones experimentales, los autores introdujeron, además de la mutación M96V, la A98G y realizaron una hidrólisis

enzimática del dominio C-terminal, de forma que estos cambios podrían afectar a la conformación de la proteína.

#### *Estudios de unión de cationes conductores y no conductores a KcsA silvestre*

La hipótesis inicial también se abordó analizando la unión de cationes, distintos a  $K^+$  y  $Na^+$ , a KcsA silvestre en presencia de los cuales, el canal presenta propiedades de conducción y grados de ocupación del filtro de selectividad distintos a los de los cationes anteriores, como son:  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Tl^+$  y  $Li^+$  (*ver anexo 9.2*). Las similitudes en cuanto a los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca, estabilización térmica y número de eventos de unión de iones, permitió establecer dos grupos: por un lado,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  y  $Tl^+$  y, por otra parte,  $Na^+$  y  $Li^+$ . En presencia de los cationes del primer grupo, el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca del canal está más desplazado hacia el azul y la estabilidad térmica es mayor que en presencia de  $Na^+$  o  $Li^+$ . Además, se detectan dos eventos de unión (de alta y baja afinidad), en comparación con el segundo grupo donde sólo se detecta un evento de baja afinidad. Cabe destacar que las estabilidades térmicas aportadas por la interacción de KcsA con los iones estudiados coinciden con las descritas por otros grupos (*104;181*).

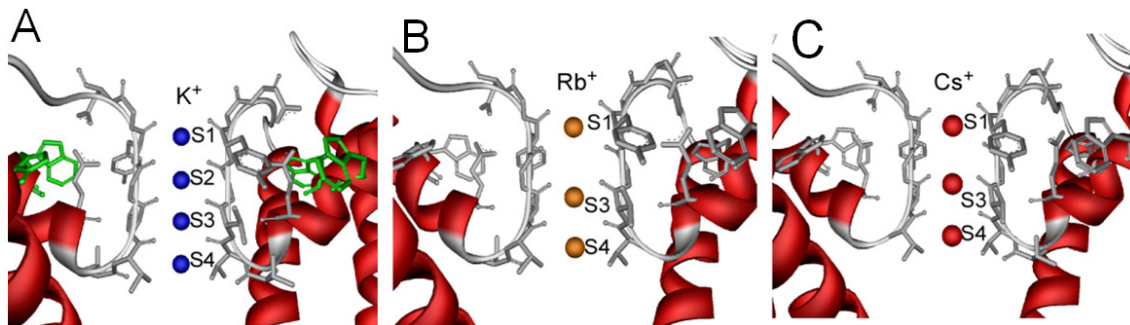
Los estudios de unión de iones empleados durante esta Tesis Doctoral no sólo han permitido detectar y caracterizar los eventos de unión de cada ión, sino que también han brindado la posibilidad de predecir el comportamiento funcional del canal en presencia de los mismos. De este modo, la detección de dos eventos de unión de  $Rb^+$  y  $Tl^+$  con afinidades y grados de estabilización similares a los de la unión del ión conductor  $K^+$ , sugiere que estos iones también podrían ser conducidos por KcsA. Respecto a la unión de  $Cs^+$ , se observó que también interacciona con el canal a través de dos eventos de unión, por lo que podría ser un ión conductor, aunque estos eventos presentan afinidades inferiores a las anteriores y grados de estabilización similares entre el primer evento y el segundo. Por último, la unión de  $Li^+$  se determinó a través de un único evento con características similares al detectado para el ión no conductor  $Na^+$ , sugiriendo que debe comportarse funcionalmente del mismo modo.

Dadas las discrepancias descritas en diversas fuentes bibliográficas en cuanto a las propiedades de conducción y selectividad de KcsA silvestre en presencia de algunos de

los iones estudiados, especialmente  $\text{Cs}^+$  (45;107;182), se decidió analizar estas propiedades empleando nuestro sistema experimental, excepto para  $\text{Tl}^+$  cuya capacidad de conducción de forma similar a  $\text{K}^+$  ha sido demostrada por otros autores (45). Los experimentos de conducción iónica demostraron que KcsA silvestre es capaz de conducir los iones  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ , mientras que no se detectaron corrientes en presencia de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Li}^+$ , tal y como se había pronosticado a partir de los estudios de unión de iones. No obstante, la conducción de cada ión presentó características particulares. Las aperturas de canal único en presencia de  $\text{Rb}^+$  o  $\text{Cs}^+$  presentaron una menor conductancia y mayor tiempo de residencia en el estado abierto que en presencia de  $\text{K}^+$ . Este efecto ha sido descrito por otros grupos tanto para KcsA (45) como para otros canales de potasio (38;80;183;184), siendo atribuido comúnmente a un aumento de la afinidad de unión de estos iones al canal. Los resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral discrepan de esta teoría, ya que las afinidades de unión de  $\text{K}^+$  y  $\text{Rb}^+$  determinadas tanto para el primer como el segundo evento son muy similares, incluso, las de  $\text{Cs}^+$  son inferiores a éstas. Estos datos apuntan a que otros factores distintos a la afinidad deben estar implicados en la regulación de las propiedades de conducción iónica.

Las estructuras cristalográficas de KcsA silvestre parecen aportar más información sobre este fenómeno (62;134;135). Estas estructuras indican que en presencia de altas concentraciones (a partir de 20 mM) de estos cationes, el filtro adopta una conformación conductora presentando dos iones en su interior al mismo tiempo, aunque el grado de ocupación de cada sitio de unión varía en función del ión:  $\text{K}^+$  es capaz de ocupar los cuatro sitios de unión S1-S4 de forma equivalente, mientras que  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$  se unen a todos los sitios excepto al S2 y con diferentes grados de ocupación (Figura 6.4) (134;135). Estos datos tienen varias implicaciones: i) la ocupación iónica del S3 parece ser la responsable de la transición a la conformación conductora, ii) estas diferencias en cuanto al grado de ocupación del filtro podrían explicar las diferencias de conducción entre los iones conductores. Es decir, la unión de  $\text{K}^+$  a todos los sitios de forma equivalente favorecería el balance energético entre las configuraciones que adopta el filtro en presencia de altas concentraciones del catión (S1-S3 y S2-S4), de modo que, disminuyendo las diferencias energéticas entre estas configuraciones se

minimizarían las barreras cinéticas para alcanzar una elevada tasa de conducción (134;185). Sin embargo, la falta de ocupación del S2 en presencia de  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$  debe suponer una elevada barrera energética para la conducción de estos iones a elevada velocidad, lo que explicaría la disminución de intensidad de corriente y aumento de la residencia en el estado conductor respecto a  $\text{K}^+$ .



**Figura 6.4.** Estructura cristalográfica del filtro de selectividad de KcsA silvestre en presencia de altas concentraciones de  $\text{K}^+$  (A, PDB 1K4C),  $\text{Rb}^+$  (B, PDB 1R3I) o  $\text{Cs}^+$  (C, PDB 1R3L). W67 y W68 se marcan en verde en el panel A.

Cabe destacar que no se detectaron aperturas en presencia de  $\text{Cs}^+$  utilizando las mismas concentraciones que para el resto de iones (200 mM). Los eventos de unión de  $\text{Cs}^+$  presentan una menor afinidad que los correspondientes de  $\text{K}^+$ , lo que parece indicar que la concentración iónica empleada para el resto de iones podría no ser suficiente para que este ión induzca la formación del estado conductor. Sin embargo, no se puede descartar que en presencia de dicha concentración iónica las aperturas sean de baja intensidad de corriente y, por lo tanto, no puedan ser detectadas experimentalmente. De hecho, fue en presencia de  $\text{CsCl}$  400 mM cuando se observaron corrientes de este ión.

También se llevó a cabo un estudio de la selectividad iónica de KcsA relativa a  $\text{K}^+$  empleando condiciones biiónicas. La determinación de los ratios de permeabilidades indicaron que el canal es altamente selectivo a  $\text{K}^+$  frente a los iones no conductores  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ , aunque esta selectividad disminuye considerablemente en presencia de iones conductores, siendo casi tan permeable para  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$  como para  $\text{K}^+$ . En general, estos resultados son comparables a los publicados por otros autores tanto para KcsA (45;107) como para algunos canales de potasio eucariota (186-188) en estas

condiciones. Una característica común y distintiva de los iones conductores en KcsA silvestre es que son capaces de interactuar con el filtro de selectividad a través de un estado de alta afinidad, el cual no es detectado en el caso de los no conductores. Retomando la hipótesis de partida, estos estados de alta afinidad serían los responsables de seleccionar un determinado ión, de modo que, los experimentos de selectividad apoyarían esta hipótesis.

#### *Asimetría y cambios en la afinidad de unión de iones como factores implicados en la selectividad iónica*

Teniendo en cuenta que E71A conserva parte de la selectividad del canal silvestre y no presenta un estado de alta afinidad, se consideró necesario explorar otros factores que pudieran participar en este fenómeno en el estado conductor (*ver anexo 9.3*). En primer lugar, en los experimentos de selectividad en condiciones biónicas descritos anteriormente, se evalúa este mecanismo por la parte extracelular (*ver anexo 9.2*). Por lo tanto, se decidió estudiar la unión de  $K^+$  y  $Na^+$  al filtro, restringiendo el acceso por la parte intracelular y simulando, de esta forma, las condiciones de los experimentos de electrofisiología. Para ello, se empleó el bloqueador intracelular TBA cuya interacción con KcsA está ampliamente demostrada tanto a nivel funcional como estructural (*165;166;176*). La estructura cristalográfica de KcsA indica que  $Na^+$  se une sólo a los sitios S1 y S4 induciendo una conformación no conductora (colapsada) (*86*). De esta forma, cuando el acceso al filtro por la parte intracelular está restringido por TBA, el ión  $Na^+$  únicamente sería capaz de unirse al sitio extracelular S1, ya que el paso del S1 al S4 está impedido debido al colapso del filtro. La  $K_D$  de la unión de  $Na^+$  a KcsA-TBA resultó ser de un orden de magnitud superior y de menor estabilización térmica que en la situación de ausencia de bloqueador, lo que indica que la unión al S1 presentaría una menor afinidad que la unión al S4. Este hecho señala que la unión de  $Na^+$  sería asimétrica, ya que no se uniría a sus dos sitios de unión con la misma afinidad. Este resultado estaría en concordancia con el hecho de que este ión es capaz de bloquear al canal por la parte intracelular, pero no por la extracelular (*106;139;189*).

Además, se decidió comprobar los resultados anteriores partiendo de la base de que  $Na^+$  se une con afinidades distintas a sus dos sitios de unión. Para ello, se realizó



un estudio de la unión de iones conductores ( $K^+$ ,  $Rb^+$  y  $Cs^+$ ) a KcsA silvestre en presencia de NaCl 100 mM, es decir, en situación de competencia. En primer lugar, se observó que todos los iones conductores son capaces de desplazar a  $Na^+$  completamente del filtro. En segundo lugar, se detectaron 3 eventos de unión para cada uno, lo que concuerda con la asimetría de la unión de  $Na^+$ : el primer evento debería corresponder al desplazamiento del  $Na^+$  del sitio de menor afinidad (S1), el segundo debería corresponder al desplazamiento del S4 y, por último, la ocupación de los sitios más internos (S2 y S3) por los cationes conductores induciría el tercer evento de unión, dando lugar a la conformación conductora.

En cuanto a la unión de  $K^+$ , también se detectaron dos eventos de unión a KcsA-TBA, igual que en ausencia de bloqueador. No obstante, el primer evento (asociado a la conformación no conductora) presenta una menor afinidad que en ausencia de bloqueador, el cual correspondería a la unión al S1, ya que, de nuevo, la interacción con el S4 estaría desfavorecida por la presencia de TBA y porque en la conformación no conductora el paso por el S2-S3 estaría impedido. A nivel fisiológico, el hecho de que el S4 presente una elevada afinidad por  $K^+$  que, además, se encuentra más concentrado en el medio intracelular que en el extracelular, podría contribuir todavía más a la selección de este catión. Por otra parte, el segundo evento presenta unas características similares en presencia o en ausencia de bloqueador, lo que indica que el  $K^+$  es capaz de ocupar sus cuatro sitios de unión desde el lado extracelular cuando el TBA está ocluyendo la entrada intracelular, induciendo la formación del estado conductor.

Adicionalmente a los estudios anteriores en donde se demuestra la existencia de una asimetría en la unión de los iones a KcsA, se decidió explorar con más profundidad el efecto de la conformación del filtro de selectividad sobre la unión de iones. En este caso, se emplearon concentraciones crecientes de  $K^+$  para inducir un desplazamiento progresivo desde el estado no conductor hasta el conductor de KcsA silvestre (62;134) y se examinó la unión de  $Na^+$  en cada caso. De este modo, se observó que a medida que el equilibrio se va desplazando hacia el estado conductor (debido al aumento de concentración de  $K^+$ ), la afinidad por  $Na^+$  disminuye considerablemente contribuyendo, de esta forma, a mantener la selectividad a través de un mecanismo de exclusión



selectiva. Estos datos corroboran las suposiciones propuestas anteriormente a partir de los resultados del canal E71A (modelo de estado conductor), en los que se sugirió que la pérdida de estructura tetramérica en presencia de  $\text{Na}^+$  podría deberse a una disminución de la afinidad por este ión en este canal mutante. De hecho, se determinó una  $K_D$  de  $\text{Na}^+$  en el canal mutante de dos órdenes de magnitud superior que en el canal silvestre.

Por lo tanto, el conjunto de estos resultados parece indicar que, tanto la asimetría observada en el filtro de selectividad, como la disminución de la afinidad por  $\text{Na}^+$  en el estado conductor (a través del mecanismo de exclusión selectiva), contribuirían a garantizar la selectividad por  $\text{K}^+$  en KcsA.





# 7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS





En KcsA silvestre los iones conductores presentan dos eventos de unión, uno de alta y otro de baja afinidad, mientras que los no conductores sólo presentan uno de baja afinidad. De modo que, la determinación del número y las características de los eventos de unión de iones permite predecir la capacidad del canal de conducir un determinado ión.

La capacidad de los iones conductores de unirse al canal silvestre con una elevada afinidad, formando estados no conductores del filtro de selectividad, es fundamental para que el canal pueda ser altamente selectivo.

A su vez, los iones conductores son capaces de unirse al canal silvestre con una baja afinidad induciendo una conformación conductora del filtro y favoreciendo, de esta forma, la conducción iónica.

La unión asimétrica de  $\text{Na}^+$ , presentando más afinidad en la unión al sitio S4 que al S1, estaría relacionada con que el bloqueo del canal por este ión sea exclusivamente desde la parte intracelular y con la elevada selectividad de  $\text{K}^+$  frente a  $\text{Na}^+$  que presenta el canal desde el medio extracelular.

El ión  $\text{K}^+$  también se une de forma asimétrica al filtro de selectividad, presentando más afinidad en la unión al sitio S4 que al S1, lo que contribuiría a su selección desde el medio intracelular.

En el estado conductor la afinidad por  $\text{Na}^+$  disminuye, siendo la constante de disociación dos órdenes de magnitud superior a la de  $\text{K}^+$ , lo que garantizaría la selección de  $\text{K}^+$  frente a  $\text{Na}^+$  en este estado a través de un mecanismo de exclusión selectiva.

Los canales mutantes KcsA E71A y M96V, en los que el equilibrio entre la conformación no conductora y conductora se encuentra marcadamente desplazado hacia una determinada conformación, ponen de manifiesto que la capacidad de adoptar ambas conformaciones es un requisito indispensable para mantener la selectividad iónica.

Wild-type KcsA presents two binding events for permeant cations of high and low affinity, whereas in the presence of non-permeant cations, only one low affinity binding event could be detected. Thus, the determination of the number of binding events and their properties offer the possibility of predicting ion channel permeation.

High-affinity binding of permeant cations to wild-type KcsA, which leads to the formation of a non-conductive state of the selectivity filter, is fundamental for the high selectivity of the channel.

Furthermore, permeant cations are able to bind to the wild-type channel with low affinity, inducing conductive conformations of the selectivity filter and favoring, this way, ion permeation.

Na<sup>+</sup> binding asymmetry, presenting a higher affinity for binding to S4 than S1 site, would be related to Na<sup>+</sup> blockade exclusively from the intracellular part of the channel and the high selectivity of K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup> that exhibits the channel from the extracellular part.

K<sup>+</sup> binding asymmetry to the selectivity filter, presenting a higher affinity for binding to S4 than S1 site, would contribute to its selection from the intracellular media.

The decrease in the affinity for Na<sup>+</sup> binding to the conductive state, being the dissociation constant of two orders of magnitude higher than K<sup>+</sup>, also guarantees ion selectivity of K<sup>+</sup> over Na<sup>+</sup>, through a selective exclusion mechanism.

KcsA E71A and M96V mutant channels, in which the equilibrium between nonconductive and conductive conformations is differently shifted, confirmed that the ability to adopt both conformations is an essential requirement for maintaining ion selectivity.

# 8. REFERENCIAS







1. Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. Mass.
2. Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry (5th ed)*.
3. HODGKIN, A. L. and HUXLEY, A. F. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol* 116, 449-472.
4. HODGKIN, A. L. and HUXLEY, A. F. (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol* 116, 473-496.
5. HODGKIN, A. L. and HUXLEY, A. F. (1952) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol* 116, 497-506.
6. HODGKIN, A. L. and HUXLEY, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol* 117, 500-544.
7. Armstrong, C. M. and Binstock, L. (1965) Anomalous rectification in the squid giant axon injected with tetraethylammonium chloride. *J. Gen. Physiol* 48, 859-872.
8. Hille, B. (1967) The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *J. Gen. Physiol* 50, 1287-1302.
9. Nakamura, Y., Nakajima, S., and Grundfest, H. (1965) The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons. *J. Gen. Physiol* 48, 975-996.
10. Neher, E. and Sakmann, B. (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
11. Neher, E., Sakmann, B., and Steinbach, J. H. (1978) The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch.* 375, 219-228.
12. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100.
13. Giraudat, J., Devillers-Thiery, A., Auffray, C., Rougeon, F., and Changeux, J. P. (1982) Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor. *EMBO J.* 1, 713-717.
14. Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S., and Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295, 202-206.

15. Doyle, D. A., Morais, C. J., 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.
16. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417, 515-522.
17. Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science* 309, 897-903.
18. Whorton, M. R. and MacKinnon, R. (2013) X-ray structure of the mammalian GIRK2-beta gamma G-protein complex. *Nature* 498, 190-197.
19. Ashcroft, F. M. (1999) *Ion Channels and Disease*. Elsevier Science.
20. Moreau, A., Gosselin-Badaroudine, P., and Chahine, M. (2014) Biophysics, pathophysiology, and pharmacology of ion channel gating pores. *Front Pharmacol.* 5, 53.
21. Ashcroft, F. M. (2006) From molecule to malady. *Nature* 440, 440-447.
22. Ranade, S. S., Syeda, R., and Patapoutian, A. (2015) Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron* 87, 1162-1179.
23. Kew, J. N. C. and Davies, C. H. (2010) *Ion Channels: From Structure to Function*. Oxford University Press.
24. Kim, J. B. (2014) Channelopathies. *Korean J. Pediatr.* 57, 1-18.
25. Miller, C. (2000) An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1, reviews0004.
26. Gonzalez, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzun, I., Rojas, P., Naranjo, D., and Latorre, R. (2012) K(+) channels: function-structural overview. *Compr. Physiol* 2, 2087-2149.
27. Kuo, M. M., Haynes, W. J., Loukin, S. H., Kung, C., and Saimi, Y. (2005) Prokaryotic K(+) channels: from crystal structures to diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 961-985.
28. Martinac, B., Saimi, Y., and Kung, C. (2008) Ion channels in microbes. *Physiol Rev.* 88, 1449-1490.
29. Lockless, S. W. (2015) Determinants of cation transport selectivity: Equilibrium binding and transport kinetics. *J. Gen. Physiol* 146, 3-13.

30. Sepulveda, F. V., Pablo, C. L., Teulon, J., and Niemeyer, M. I. (2015) Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K2P and Kir K<sup>+</sup>-transport channels. *Physiol Rev.* 95, 179-217.
31. Lu, Z., Klem, A. M., and Ramu, Y. (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413, 809-813.
32. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* 66, 1061-1067.
33. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417, 523-526.
34. Heginbotham, L. and MacKinnon, R. (1993) Conduction properties of the cloned Shaker K<sup>+</sup> channel. *Biophys. J.* 65, 2089-2096.
35. Hille, B. (1973) Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. *J. Gen. Physiol* 61, 669-686.
36. McCoy, J. G. and Nimigean, C. M. (2012) Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 272-285.
37. Cecchi, X., Wolff, D., Alvarez, O., and Latorre, R. (1987) Mechanisms of Cs<sup>+</sup> blockade in a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from smooth muscle. *Biophys. J.* 52, 707-716.
38. Cukierman, S., Yellen, G., and Miller, C. (1985) The K<sup>+</sup> channel of sarcoplasmic reticulum. A new look at Cs<sup>+</sup> block. *Biophys. J.* 48, 477-484.
39. Melishchuk, A. and Armstrong, C. M. (2001) Mechanism underlying slow kinetics of the OFF gating current in Shaker potassium channel. *Biophys. J.* 80, 2167-2175.
40. Thompson, G. A., Leyland, M. L., Ashmole, I., Sutcliffe, M. J., and Stanfield, P. R. (2000) Residues beyond the selectivity filter of the K<sup>+</sup> channel kir2.1 regulate permeation and block by external Rb<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup>. *J. Physiol* 526 Pt 2, 231-240.
41. Korn, S. J. and Ikeda, S. R. (1995) Permeation selectivity by competition in a delayed rectifier potassium channel. *Science* 269, 410-412.
42. Valiyaveetil, F. I., Leonetti, M., Muir, T. W., and MacKinnon, R. (2006) Ion selectivity in a semisynthetic K<sup>+</sup> channel locked in the conductive conformation. *Science* 314, 1004-1007.
43. Dibb, K. M., Rose, T., Makary, S. Y., Claydon, T. W., Enkvetchakul, D., Leach, R., Nichols, C. G., and Boyett, M. R. (2003) Molecular basis of ion selectivity, block, and rectification of the inward rectifier Kir3.1/Kir3.4 K<sup>(+)</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 278, 49537-49548.

44. Gomez-Lagunas, F. (1997) Shaker B K<sup>+</sup> conductance in Na<sup>+</sup> solutions lacking K<sup>+</sup> ions: a remarkably stable non-conducting state produced by membrane depolarizations. *J. Physiol* 499 ( Pt 1), 3-15.
45. LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol* 118, 303-314.
46. Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 90, 291-366.
47. Biggin, P. C., Roosild, T., and Choe, S. (2000) Potassium channel structure: domain by domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 456-461.
48. Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., and Adelman, J. P. (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273, 1709-1714.
49. Atkinson, N. S., Robertson, G. A., and Ganetzky, B. (1991) A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* 253, 551-555.
50. Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., and Wei, A. (2006) High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 921-931.
51. Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1991) Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7, 547-556.
52. Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419, 35-42.
53. Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D. L., Brahmajothi, M. V., and Strauss, H. C. (1998) Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ. Res.* 82, 739-750.
54. Hoshi, T., Zagotta, W. N., and Aldrich, R. W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250, 533-538.
55. 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.
56. Baukrowitz, T. 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.
57. Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) A prokaryotic potassium ion channel with

- two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 14, 5170-5178.
58. Cuello, L. G., Romero, J. G., Cortes, D. M., and Perozo, E. (1998) pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* 37, 3229-3236.
  59. MacKinnon, R., Cohen, S. L., Kuo, A., Lee, A., and Chait, B. T. (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* 280, 106-109.
  60. Caprini, M., Ferroni, S., Planells-Cases, R., Rueda, J., Rapisarda, C., Ferrer-Montiel, A., and Montal, M. (2001) Structural compatibility between the putative voltage sensor of voltage-gated K<sup>+</sup> channels and the prokaryotic KcsA channel. *J. Biol. Chem.* 276, 21070-21076.
  61. Heginbotham, L., Odessey, E., and Miller, C. (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* 36, 10335-10342.
  62. Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414, 43-48.
  63. Cortes, D. M., Cuello, L. G., and Perozo, E. (2001) Molecular architecture of full-length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating. *J. Gen. Physiol* 117, 165-180.
  64. Uysal, S., Vasquez, V., Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F. A., Sidhu, S. S., Koide, S., Perozo, E., and Kossiakoff, A. (2009) Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 6644-6649.
  65. Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., Sompornpisut, A., Purdy, M. D., Wiener, M. C., and Perozo, E. (2010) Design and characterization of a constitutively open KcsA. *FEBS Lett.* 584, 1133-1138.
  66. Uysal, S., Cuello, L. G., Cortes, D. M., Koide, S., Kossiakoff, A. A., and Perozo, E. (2011) Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 11896-11899.
  67. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2012) *Biochemistry* W. H. Freeman.
  68. Iwamoto, M., Shimizu, H., Inoue, F., Konno, T., Sasaki, Y. C., and Oiki, S. (2006) Surface structure and its dynamic rearrangements of the KcsA potassium channel upon gating and tetrabutylammonium blocking. *J. Biol. Chem.* 281, 28379-28386.
  69. Shi, N., Ye, S., Alam, A., Chen, L., and Jiang, Y. (2006) Atomic structure of a Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-conducting channel. *Nature* 440, 570-574.
  70. Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A. (2003) Crystal

- structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300, 1922-1926.
71. Iwamoto, M. and Oiki, S. (2013) Amphipathic antenna of an inward rectifier K<sup>+</sup> channel responds to changes in the inner membrane leaflet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110, 749-754.
  72. Baker, K. A., Tzitzilonis, C., Kwiatkowski, W., Choe, S., and Riek, R. (2007) Conformational dynamics of the KcsA potassium channel governs gating properties. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1089-1095.
  73. Chill, J. H., Louis, J. M., Miller, C., and Bax, A. (2006) NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles. *Protein Sci.* 15, 684-698.
  74. Zimmer, J., Doyle, D. A., and Grossmann, J. G. (2006) Structural characterization and pH-induced conformational transition of full-length KcsA. *Biophys. J.* 90, 1752-1766.
  75. Molina, M. L., Encinar, J. A., Barrera, F. N., Fernandez-Ballester, G., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2004) Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* 43, 14924-14931.
  76. Jenke, M., Sanchez, A., Monje, F., Stuhmer, W., Weseloh, R. M., and Pardo, L. A. (2003) C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J.* 22, 395-403.
  77. Tinker, A., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1996) Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels. *Cell* 87, 857-868.
  78. Bixby, K. A., Nanao, M. H., Shen, N. V., Kreuzsch, A., Bellamy, H., Pfaffinger, P. J., and Choe, S. (1999) Zn<sup>2+</sup>-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Nat. Struct. Biol.* 6, 38-43.
  79. Kreuzsch, A., Pfaffinger, P. J., Stevens, C. F., and Choe, S. (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 392, 945-948.
  80. Demo, S. D. and Yellen, G. (1992) Ion effects on gating of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel correlate with occupancy of the pore. *Biophys. J.* 61, 639-648.
  81. Spruce, A. E., Standen, N. B., and Stanfield, P. R. (1989) Rubidium ions and the gating of delayed rectifier potassium channels of frog skeletal muscle. *J. Physiol* 411, 597-610.
  82. Swenson, R. P., Jr. 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.

83. Lu, T., Ting, A. Y., Mainland, J., Jan, L. Y., Schultz, P. G., and Yang, J. (2001) Probing ion permeation and gating in a K<sup>+</sup> channel with backbone mutations in the selectivity filter. *Nat. Neurosci.* **4**, 239-246.
84. Proks, P., Capener, C. E., Jones, P., and Ashcroft, F. M. (2001) Mutations within the P-loop of Kir6.2 modulate the intraburst kinetics of the ATP-sensitive potassium channel. *J. Gen. Physiol* **118**, 341-353.
85. Sun, Z. P., Akabas, M. H., Goulding, E. H., Karlin, A., and Siegelbaum, S. A. (1996) Exposure of residues in the cyclic nucleotide-gated channel pore: P region structure and function in gating. *Neuron* **16**, 141-149.
86. Lockless, S. W., Zhou, M., and MacKinnon, R. (2007) Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K<sup>+</sup> channel. *PLoS. Biol.* **5**, e121.
87. Ulmschneider, M. B. and Sansom, M. S. (2001) Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1512**, 1-14.
88. Renart, M. L., Triano, I., Poveda, J. A., Encinar, J. A., Fernandez, A. M., Ferrer-Montiel, A. V., Gomez, J., and Gonzalez Ros, J. M. (2010) Ion binding to KcsA: implications in ion selectivity and channel gating. *Biochemistry* **49**, 9480-9487.
89. Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2002) Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* **41**, 10771-10777.
90. Poveda, J. A., Giudici, A. M., Renart, M. L., Molina, M. L., Montoya, E., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Encinar, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (2014) Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1560-1567.
91. Demmers, J. A., van, D. A., de, K. B., Heck, A. J., and Killian, J. A. (2003) Interaction of the K<sup>+</sup> channel KcsA with membrane phospholipids as studied by ESI mass spectrometry. *FEBS Lett.* **541**, 28-32.
92. Williamson, I. M., Alvis, S. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2003) The potassium channel KcsA and its interaction with the lipid bilayer. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1581-1590.
93. Williamson, I. M., Alvis, S. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2002) Interactions of phospholipids with the potassium channel KcsA. *Biophys. J.* **83**, 2026-2038.
94. Weingarth, M., Prokofyev, A., van der Crujisen, E. A., Nand, D., Bonvin, A. M., Pongs, O., and Baldus, M. (2013) Structural determinants of specific lipid binding to potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 3983-3988.
95. Marius, P., de Planque, M. R., and Williamson, P. T. (2012) Probing the interaction of lipids with the non-annular binding sites of the potassium



- channel KcsA by magic-angle spinning NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 90-96.
96. Triano, I., Barrera, F. N., Renart, M. L., Molina, M. L., Fernandez-Ballester, G., Poveda, J. A., Fernandez, A. M., Encinar, J. A., Ferrer-Montiel, A. V., Otzen, D., and Gonzalez-Ros, J. M. (2010) Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry* 49, 5397-5404.
  97. Marius, P., Alvis, S. J., East, J. M., and Lee, A. G. (2005) The interfacial lipid binding site on the potassium channel KcsA is specific for anionic phospholipids. *Biophys. J.* 89, 4081-4089.
  98. Deol, S. S., Domene, C., Bond, P. J., and Sansom, M. S. (2006) Anionic phospholipid interactions with the potassium channel KcsA: simulation studies. *Biophys. J.* 90, 822-830.
  99. Barrera, F. N., Renart, M. L., Molina, M. L., Poveda, J. A., Encinar, J. A., Fernandez, A. M., Neira, J. L., and Gonzalez-Ros, J. M. (2005) Unfolding and refolding in vitro of a tetrameric, alpha-helical membrane protein: the prokaryotic potassium channel KcsA. *Biochemistry* 44, 14344-14352.
  100. Cortes, D. M. and Perozo, E. (1997) Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability. *Biochemistry* 36, 10343-10352.
  101. Encinar, J. A., Molina, M. L., Poveda, J. A., Barrera, F. N., Renart, M. L., Fernandez, A. M., and Gonzalez-Ros, J. M. (2005) The influence of a membrane environment on the structure and stability of a prokaryotic potassium channel, KcsA. *FEBS Lett.* 579, 5199-5204.
  102. Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M., and Schrempf, H. (2000) Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* 472, 83-87.
  103. van, D. A., Hegger, S., Killian, J. A., and de, K. B. (2002) Influence of lipids on membrane assembly and stability of the potassium channel KcsA. *FEBS Lett.* 525, 33-38.
  104. Krishnan, M. N., Bingham, J. P., Lee, S. H., Trombley, P., and Moczydlowski, E. (2005) Functional role and affinity of inorganic cations in stabilizing the tetrameric structure of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol* 126, 271-283.
  105. Renart, M. L., Barrera, F. N., Molina, M. L., Encinar, J. A., Poveda, J. A., Fernandez, A. M., Gomez, J., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Effects of conducting and blocking ions on the structure and stability of the potassium channel KcsA. *J. Biol. Chem.* 281, 29905-29915.



106. Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol* 114, 551-560.
107. Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., and Schrempf, H. (1999) Exploring the open pore of the potassium channel from Streptomyces lividans. *FEBS Lett.* 462, 447-452.
108. Hirano, M., Onishi, Y., Yanagida, T., and Ide, T. (2011) Role of the KcsA channel cytoplasmic domain in pH-dependent gating. *Biophys. J.* 101, 2157-2162.
109. Posson, D. J., Thompson, A. N., McCoy, J. G., and Nimigean, C. M. (2013) Molecular interactions involved in proton-dependent gating in KcsA potassium channels. *J. Gen. Physiol* 142, 613-624.
110. Thompson, A. N., Posson, D. J., Parsa, P. V., and Nimigean, C. M. (2008) Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 6900-6905.
111. Cuello, L. G., Cortes, D. M., Jogini, V., Sompornpisut, A., and Perozo, E. (2010) A molecular mechanism for proton-dependent gating in KcsA. *FEBS Lett.* 584, 1126-1132.
112. Hulse, R. E., Sachleben, J. R., Wen, P. C., Moradi, M., Tajkhorshid, E., and Perozo, E. (2014) Conformational dynamics at the inner gate of KcsA during activation. *Biochemistry* 53, 2557-2559.
113. Shimizu, H., Iwamoto, M., Konno, T., Nihei, A., Sasaki, Y. C., and Oiki, S. (2008) Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating. *Cell* 132, 67-78.
114. Kelly, B. L. and Gross, A. (2003) Potassium channel gating observed with site-directed mass tagging. *Nat. Struct. Biol.* 10, 280-284.
115. Perozo, E., Cortes, D. M., and Cuello, L. G. (1999) Structural rearrangements underlying K<sup>+</sup>-channel activation gating. *Science* 285, 73-78.
116. Liu, Y. S., Sompornpisut, P., and Perozo, E. (2001) Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nat. Struct. Biol.* 8, 883-887.
117. Blunck, R., Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Perozo, E., and Bezanilla, F. (2006) Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction. *J. Gen. Physiol* 128, 569-581.
118. del Camino, D. and Yellen, G. (2001) Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K(+) channel. *Neuron* 32, 649-656.
119. 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.

120. Roux, B. and MacKinnon, R. (1999) The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 285, 100-102.
121. Zhou, Y. and MacKinnon, R. (2001) Fab-mediated Crystallization of a Potassium Channel. *NLSL Activity Report 2001*.
122. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating I: macroscopic currents. *J. Gen. Physiol* 130, 465-478.
123. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 311-318.
124. Berneche, S. and Roux, B. (2005) A gate in the selectivity filter of potassium channels. *Structure.* 13, 591-600.
125. Bezanilla, F. and Armstrong, C. M. (1972) Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen. Physiol* 60, 588-608.
126. Allen, T. W., Andersen, O. S., and Roux, B. (2004) On the importance of atomic fluctuations, protein flexibility, and solvent in ion permeation. *J. Gen. Physiol* 124, 679-690.
127. Noskov, S. Y., Berneche, S., and Roux, B. (2004) Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* 431, 830-834.
128. Gouaux, E. and MacKinnon, R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310, 1461-1465.
129. Grabe, M., Bichet, D., Qian, X., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2006) K<sup>+</sup> channel selectivity depends on kinetic as well as thermodynamic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 14361-14366.
130. Varma, S. and Rempe, S. B. (2007) Tuning ion coordination architectures to enable selective partitioning. *Biophys. J.* 93, 1093-1099.
131. Thomas, M., Jayatilaka, D., and Corry, B. (2007) The predominant role of coordination number in potassium channel selectivity. *Biophys. J.* 93, 2635-2643.
132. Bostick, D. L. and Brooks, C. L., III (2007) Selectivity in K<sup>+</sup> channels is due to topological control of the permeant ion's coordinated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 9260-9265.
133. Fowler, P. W., Tai, K., and Sansom, M. S. (2008) The selectivity of K<sup>+</sup> ion channels: testing the hypotheses. *Biophys. J.* 95, 5062-5072.

134. Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414, 37-42.
135. Zhou, Y. and MacKinnon, R. (2003) The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* 333, 965-975.
136. Yellen, G. (2001) Keeping K<sup>+</sup> completely comfortable. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1011-1013.
137. Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol* 111, 741-749.
138. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., and Perozo, E. (2006) Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 319-322.
139. Nimigean, C. M. and Miller, C. (2002) Na<sup>+</sup> block and permeation in a K<sup>+</sup> channel of known structure. *J. Gen. Physiol* 120, 323-335.
140. Molina, M. L., Barrera, F. N., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Renart, M. L., Encinar, J. A., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J. Biol. Chem.* 281, 18837-18848.
141. Molina, M. L., Giudici, A. M., Poveda, J. A., Fernandez-Ballester, G., Montoya, E., Renart, M. L., Fernandez, A. M., Encinar, J. A., Riquelme, G., Morales, A., and Gonzalez-Ros, J. M. (2015) Competing Lipid-Protein and Protein-Protein Interactions Determine Clustering and Gating Patterns in the Potassium Channel from *Streptomyces lividans* (KcsA). *J. Biol. Chem.* 290, 25745-25755.
142. Giudici, A. M., Molina, M. L., Ayala, J. L., Montoya, E., Renart, M. L., Fernandez, A. M., Encinar, J. A., Ferrer-Montiel, A. V., Poveda, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (2013) Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: relative abundance and interactions involved. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 193-200.
143. Hegermann, J., Overbeck, J., and Schrempf, H. (2006) In vivo monitoring of the potassium channel KcsA in *Streptomyces lividans* hyphae using immunoelectron microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. *Microbiology* 152, 2831-2841.
144. Draber, S., Schultze, R., and Hansen, U. P. (1993) Cooperative behavior of K<sup>+</sup> channels in the tonoplast of *Chara corallina*. *Biophys. J.* 65, 1553-1559.
145. Bhargava, A., Lin, X., Novak, P., Mehta, K., Korchev, Y., Delmar, M., and Gorelik, J. (2013) Super-resolution scanning patch clamp reveals clustering of functional ion channels in adult ventricular myocyte. *Circ. Res.* 112, 1112-1120.

146. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents. *J. Gen. Physiol* 130, 479-496.
147. Gao, L., Mi, X., Paajanen, V., Wang, K., and Fan, Z. (2005) Activation-coupled inactivation in the bacterial potassium channel KcsA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 17630-17635.
148. Schlieff, T., Schonherr, R., and Heinemann, S. H. (1996) Modification of C-type inactivating Shaker potassium channels by chloramine-T. *Pflugers Arch.* 431, 483-493.
149. 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.
150. Liu, Y., Jurman, M. E., and Yellen, G. (1996) Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K<sup>+</sup> channel during gating. *Neuron* 16, 859-867.
151. Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Lewis, A., Vasquez, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2007) Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1062-1069.
152. Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Chakrapani, S., and Perozo, E. (2011) A multipoint hydrogen-bond network underlying KcsA C-type inactivation. *Biophys. J.* 100, 2387-2393.
153. Raghuraman, H., Islam, S. M., Mukherjee, S., Roux, B., and Perozo, E. (2014) Dynamics transitions at the outer vestibule of the KcsA potassium channel during gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 111, 1831-1836.
154. Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., Pan, A. C., Gagnon, D. G., Dalmas, O., Cordero-Morales, J. F., Chakrapani, S., Roux, B., and Perozo, E. (2010) Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels. *Nature* 466, 272-275.
155. Pan, A. C., Cuello, L. G., Perozo, E., and Roux, B. (2011) Thermodynamic coupling between activation and inactivation gating in potassium channels revealed by free energy molecular dynamics simulations. *J. Gen. Physiol* 138, 571-580.
156. Cheng, W. W., McCoy, J. G., Thompson, A. N., Nichols, C. G., and Nimigean, C. M. (2011) Mechanism for selectivity-inactivation coupling in KcsA potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 5272-5277.
157. Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., and Perozo, E. (2010) Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. *Nature* 466, 203-208.

158. Devaraneni, P. K., Komarov, A. G., Costantino, C. A., Devereaux, J. J., Matulef, K., and Valiyaveetil, F. I. (2013) Semisynthetic K<sup>+</sup> channels show that the constricted conformation of the selectivity filter is not the C-type inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110, 15698-15703.
159. Liu, S., Focke, P. J., Matulef, K., Bian, X., Moenne-Loccoz, P., Valiyaveetil, F. I., and Lockless, S. W. (2015) Ion-binding properties of a K<sup>+</sup> channel selectivity filter in different conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
160. Marius, P., Zagnoni, M., Sandison, M. E., East, J. M., Morgan, H., and Lee, A. G. (2008) Binding of anionic lipids to at least three nonannular sites on the potassium channel KcsA is required for channel opening. *Biophys. J.* 94, 1689-1698.
161. Negoda, A., Negoda, E., Xian, M., and Reusch, R. N. (2009) Role of polyphosphate in regulation of the *Streptomyces lividans* KcsA channel. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 608-614.
162. Reusch, R. N. (1999) *Streptomyces lividans* potassium channel contains poly-(R)-3-hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate. *Biochemistry* 38, 15666-15672.
163. Lenaeus, M. J., Vamvouka, M., Focia, P. J., and Gross, A. (2005) Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 454-459.
164. Kutluay, E., Roux, B., and Heginbotham, L. (2005) Rapid intracellular TEA block of the KcsA potassium channel. *Biophys. J.* 88, 1018-1029.
165. Faraldo-Gomez, J. D., Kutluay, E., Jogini, V., Zhao, Y., Heginbotham, L., and Roux, B. (2007) Mechanism of intracellular block of the KcsA K<sup>+</sup> channel by tetrabutylammonium: insights from X-ray crystallography, electrophysiology and replica-exchange molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* 365, 649-662.
166. Yohannan, S., Hu, Y., and Zhou, Y. (2007) Crystallographic study of the tetrabutylammonium block to the KcsA K<sup>+</sup> channel. *J. Mol. Biol.* 366, 806-814.
167. Molina, M. L., Barrera, F. N., Encinar, J. A., Renart, M. L., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Santoro, J., Bruix, M., Gavilanes, F., Fernandez-Ballester, G., Neira, J. L., and Gonzalez-Ros, J. M. (2008) N-type inactivation of the potassium channel KcsA by the Shaker B "ball" peptide: mapping the inactivating peptide-binding epitope. *J. Biol. Chem.* 283, 18076-18085.
168. Lakowicz, J. R. (2007) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US.
169. Bagal, S. K., Brown, A. D., Cox, P. J., Omoto, K., Owen, R. M., Pryde, D. C., Sidders, B., Skerratt, S. E., Stevens, E. B., Storer, R. I., and Swain, N. A. (2013)

- Ion channels as therapeutic targets: a drug discovery perspective. *J. Med. Chem.* 56, 593-624.
170. Mairata, F. B. (2003) *Técnicas instrumentales en bioquímica y biología*. Universitat de les Illes Balears.
171. Lopes, D. H., Chapeaurouge, A., Manderson, G. A., Johansson, J. S., and Ferreira, S. T. (2004) Redesigning the folding energetics of a model three-helix bundle protein by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 10991-10996.
172. Riquelme, G., Lopez, E., Garcia-Segura, L. M., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1990) Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels. *Biochemistry* 29, 11215-11222.
173. Molleman, A. (2003) *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology* John Wiley & Sons, LTD..
174. Renart, M. L., Montoya, E., Fernandez, A. M., Molina, M. L., Poveda, J. A., Encinar, J. A., Ayala, J. L., Ferrer-Montiel, A. V., Gomez, J., Morales, A., and Gonzalez Ros, J. M. (2012) Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel. *Biochemistry* 51, 3891-3900.
175. Montoya, E., Renart, M. L., Giudici, A. M., Poveda, J. A., Fernandez, A. M., Morales, A., and Gonzalez-Ros, J. M. (2016) Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering potassium channel selectivity. *Submitted to J. Biol. Chem.*
176. Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., and MacKinnon, R. (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657-661.
177. Renart, M. L. (2010) Iones y fosfolípidos como efectores en la estructura y estabilidad del canal de potasio KcsA. *Tesis Doctoral*.
178. Piasta, K. N., Theobald, D. L., and Miller, C. (2011) Potassium-selective block of barium permeation through single KcsA channels. *J. Gen. Physiol* 138, 421-436.
179. Bhate, M. P. and McDermott, A. E. (2012) Protonation state of E71 in KcsA and its role for channel collapse and inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 15265-15270.
180. Choi, H. and Heginbotham, L. (2004) Functional influence of the pore helix glutamate in the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biophys. J.* 86, 2137-2144.
181. Krishnan, M. N., Trombley, P., and Moczydlowski, E. G. (2008) Thermal stability of the K<sup>+</sup> channel tetramer: cation interactions and the conserved threonine residue at the innermost site (S4) of the KcsA selectivity filter. *Biochemistry* 47, 5354-5367.

182. Zakharian, E. and Reusch, R. N. (2004) Streptomyces lividans potassium channel KcsA is regulated by the potassium electrochemical gradient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 429-436.
183. Ashcroft, F. M., Kakei, M., and Kelly, R. P. (1989) Rubidium and sodium permeability of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in single rat pancreatic beta-cells. *J. Physiol* 408, 413-429.
184. Eisenman, G., Latorre, R., and Miller, C. (1986) Multi-ion conduction and selectivity in the high-conductance Ca<sup>++</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from skeletal muscle. *Biophys. J.* 50, 1025-1034.
185. Zhou, M. and MacKinnon, R. (2004) A mutant KcsA K(+) channel with altered conduction properties and selectivity filter ion distribution. *J. Mol. Biol.* 338, 839-846.
186. Chao, C. C., Huang, C. C., Kuo, C. S., and Leung, Y. M. (2010) Control of ionic selectivity by a pore helix residue in the Kv1.2 channel. *J. Physiol Sci.* 60, 441-446.
187. Wischmeyer, E., Doring, F., and Karschin, A. (2000) Stable cation coordination at a single outer pore residue defines permeation properties in Kir channels. *FEBS Lett.* 466, 115-120.
188. Loffler, K. and Hunter, M. (1997) Cation permeation and blockade of ROMK1, a cloned renal potassium channel. *Pflugers Arch.* 434, 151-158.
189. Thompson, A. N., Kim, I., Panosian, T. D., Iverson, T. M., Allen, T. W., and Nimigean, C. M. (2009) Mechanism of potassium-channel selectivity revealed by Na(+) and Li(+) binding sites within the KcsA pore. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1317-1324.





# 9. ANEXOS





## 9.1. Publicación:

*Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel*





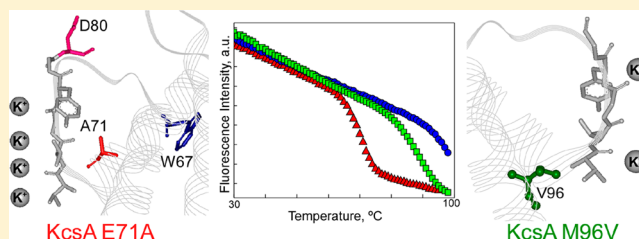
## Contribution of Ion Binding Affinity to Ion Selectivity and Permeation in KcsA, a Model Potassium Channel

M. L. Renart,<sup>†</sup> E. Montoya,<sup>†</sup> A. M. Fernández,<sup>†</sup> M. L. Molina,<sup>†</sup> J. A. Poveda,<sup>†</sup> J. A. Encinar,<sup>†</sup> J. L. Ayala,<sup>†</sup> A. V. Ferrer-Montiel,<sup>†</sup> J. Gómez,<sup>‡</sup> A. Morales,<sup>‡</sup> and J. M. González Ros<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain

<sup>‡</sup>Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, Aptdo. 99, 03080 Alicante, Spain

**ABSTRACT:** Ion permeation and selectivity, key features in ion channel function, are believed to arise from a complex ensemble of energetic and kinetic variables. Here we evaluate the contribution of pore cation binding to ion permeation and selectivity features of KcsA, a model potassium channel. For this, we used E71A and M96V KcsA mutants in which the equilibrium between conductive and nonconductive conformations of the channel is differently shifted. E71A KcsA is a noninactivating channel mutant. Binding of K<sup>+</sup> to this mutant reveals a single set of low-affinity K<sup>+</sup> binding sites, similar to that seen in the binding of K<sup>+</sup> to wild-type KcsA that produces a conductive, low-affinity complex. This seems consistent with the observed K<sup>+</sup> permeation in E71A. Nonetheless, the E71A mutant retains K<sup>+</sup> selectivity, which cannot be explained on the basis of just its low affinity for this ion. At variance, M96V KcsA is a rapidly inactivating mutant that has lost selectivity for K<sup>+</sup> and also conducts Na<sup>+</sup>. Here, low-affinity binding and high-affinity binding of both cations are detected, seemingly in agreement with both being permeating species in this mutant channel. In conclusion, binding of the ion to the channel protein seemingly explains certain gating, ion selectivity, and permeation properties. Ion binding stabilizes greatly the channel and, depending upon ion type and concentration, leads to different conformations and ion binding affinities. High-affinity states guarantee binding of specific ions and mediate ion selectivity but are nonconductive. Conversely, low-affinity states would not discriminate well among different ions but allow permeation to occur.



Potassium channels are complex membrane proteins that conduct K<sup>+</sup> at high rates with a marked selectivity over Na<sup>+</sup>, the biologically relevant competitor.<sup>1</sup> Early electrophysiological experiments show that the concentration of permeating and/or blocking ions modulates the selectivity and gating properties of many of these channels,<sup>2</sup> suggesting a role for the ions as channel “effectors” that goes beyond their passive passage through the ion-conducting pores. For instance, the absence of extracellular K<sup>+</sup> causes changes in the rates of deactivation or C-type inactivation.<sup>3–7</sup> Moreover, K<sup>+</sup>-free medium causes Na<sup>+</sup> permeation in some instances<sup>8–11</sup> or even irreversible “collapse” of potassium conductances.<sup>12,13</sup>

KcsA, a potassium channel from *Streptomyces lividans*,<sup>14</sup> was the first ion channel to be identified using X-ray crystallography.<sup>15</sup> KcsA is a homotetramer in which each subunit defines two transmembrane segments connected by a pore region that contains a tilted short helix (pore helix) and an ion selectivity filter with the sequence TVGYG unmistakably homologous to the more complex eukaryotic K<sup>+</sup> channels. The backbone carbonyl oxygens of such residues create a stack of multiple, nonequivalent binding sites at which K<sup>+</sup> may bind in a dehydrated form. Indeed, two of such bound K<sup>+</sup> ions can be seen, single file, in the KcsA crystal structure [Protein Data Bank (PDB) entries 1BL8 and 1K4C].<sup>15,16</sup> The ion conduction pathway also has a lower and wider water-filled region called

the cavity, which opens to the cytoplasm. According to the current understanding of the process, selectivity for K<sup>+</sup> over other physiologically relevant cations is exerted both at the cavity but mostly at the selectivity filter.<sup>16,17</sup>

Crystal structures of wild-type KcsA obtained under different ionic conditions indicate that the selectivity filter adopts distinct conformations associated with the presence of low or high concentrations of K<sup>+</sup> ions.<sup>18–20</sup> At 5 mM K<sup>+</sup>, the filter goes into a predictably nonconductive conformation in which ions bind at the ends of the selectivity filter (the so-called sites S1 and S4), with an average occupancy of just one K<sup>+</sup> distributed between those two sites. As the K<sup>+</sup> concentration is increased, a second ion goes into the middle of the filter (site S2 or S3) and a change in conformation to a conductive state occurs, which has an average occupation of two K<sup>+</sup> ions per channel.<sup>18,21</sup> Simulation studies predict that binding of K<sup>+</sup> to the S2 site is required for the conformational change to occur,<sup>22</sup> while both S2 and S3 sites seem to undergo substantial changes in their architecture when in the absence or presence of K<sup>+</sup>.<sup>23</sup>

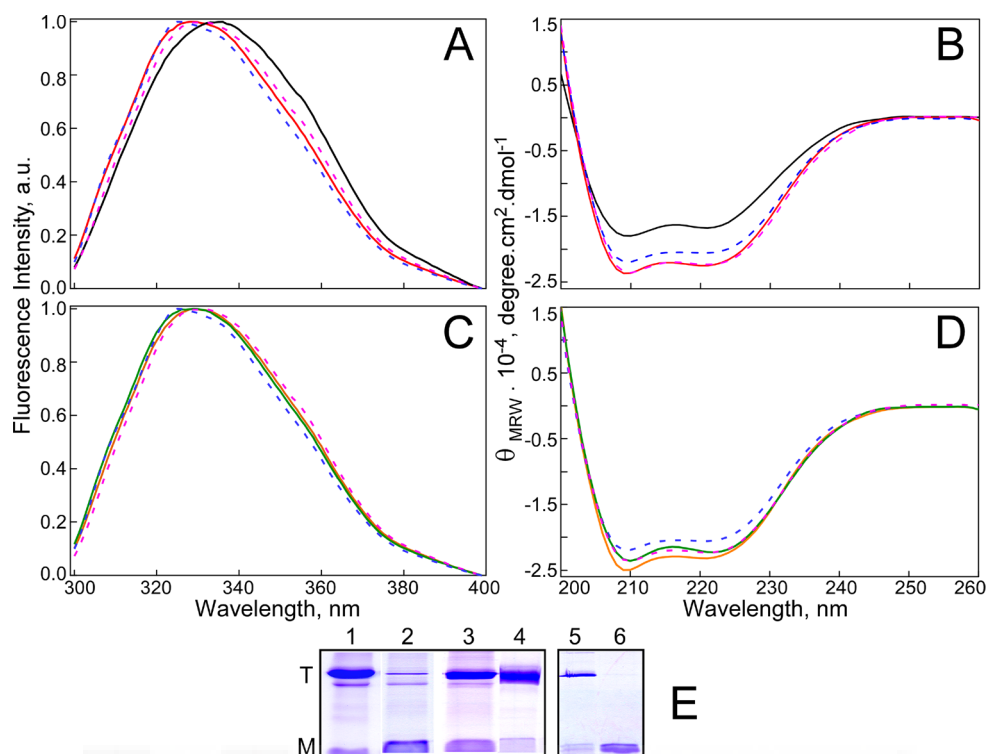
In the context of such crystallographical and “in silico” simulation data, we reported studies of binding of ions to wild-

Received: September 26, 2011

Revised: March 15, 2012

Published: April 17, 2012





**Figure 1.** Structural characterization of E71A and M96V KcsA channel proteins in detergent solution (5 mM DDM). (A and B) E71A KcsA intrinsic fluorescence emission spectra (A) (1  $\mu\text{M}$  protein) and far-UV CD spectra (B) (5  $\mu\text{M}$  protein) of the E71A KcsA mutant in the presence of 100 mM KCl (red) or 100 mM NaCl (black). The spectra of wild-type KcsA (blue for  $\text{K}^+$  and magenta for  $\text{Na}^+$ ) are also included in these and all other panels for comparison. (C and D) Intrinsic fluorescence emission spectra and CD spectra, respectively, of M96V KcsA in 100 mM KCl (green) and 100 mM NaCl (orange). (E) SDS-PAGE (13.5% acrylamide) of DDM-solubilized E71A KcsA purified in the presence of 100 mM KCl (lane 1) or 100 mM NaCl (lane 2). Notice that under the latter conditions the E71A protein appears mostly in the form of monomers. Lanes 3 and 4 show the results of purifying the M96V KcsA mutant in 100 mM KCl or 100 mM NaCl. To confirm monomerization of the E71A mutant in the presence of NaCl, an aliquot of the mutant protein purified in the presence of 100 mM KCl (lane 5) was dialyzed against 100 mM NaCl for 48 h. After this period, only the monomeric form could be detected in the sample (lane 6). T and M within the figure stand for the tetrameric and monomeric forms of the protein, respectively.

Expression of the wild-type KcsA protein and mutants, all with an added N-terminal hexahistidine tag, was performed in *Escherichia coli* M15 (pRep4) cells, and its purification by affinity chromatography on a  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose (GE Healthcare) column was conducted as reported previously.<sup>29</sup> The final protein stock was in 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich) (pH 7.0), 5 mM DDM (Calbiochem), and 100 mM NaCl or 100 mM KCl (Merck). Protein concentrations were routinely determined from the absorbance at 280 nm, using a value of  $34950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  as the molar extinction coefficient for the KcsA monomer, estimated from the extinction coefficients of model compounds.<sup>30</sup>

**SDS-PAGE.** Aliquots of wild-type or mutant KcsA channels were mixed with electrophoresis sample buffer<sup>31</sup> and loaded into a 13.5% polyacrylamide gel to check the tetramer integrity in each case. Protein bands were visualized after Coomassie Brilliant Blue staining.

**Reconstitution of KcsA into Asolectin Lipid Vesicles.** DDM-solubilized KcsA protein was mixed with asolectin [soybean lipids, type II-S (Sigma)] vesicles<sup>32</sup> previously resolubilized in 3 mM DDM at a lipid:tetrameric KcsA molar ratio of 500:1, for 2 h. Proteoliposomes were formed via removal of the detergent by gel filtration on Sephadex G-50 (medium, 15–20 mL bed volume) previously swollen overnight in buffer without detergent.<sup>29</sup>

**Measurements of Fluorescence Spectra.** The intrinsic fluorescence emission spectra were recorded on an SLM 8000 spectrofluorometer using 0.5 cm path-length quartz cuvettes, as described previously.<sup>33</sup> The samples were excited at 280 nm, and the emission was recorded between 300 and 400 nm in 1 nm increments. The intrinsic fluorescence in KcsA arises exclusively from five tryptophan residues present in each of the four channel subunits and at both ends of the transmembrane helical segments of the protein. Two such residues are positioned at the intracellular membrane interface (W26 and W113) and three at the opposite side of the channel (W67, W68, and W87).<sup>24,33</sup>

**Fluorescence Monitoring of Thermal Denaturation.** Thermal denaturation of DDM-solubilized KcsA was monitored in a Varian Cary Eclipse or a PTI QuantaMaster spectrofluorometer by recording the temperature dependence of the protein intrinsic emission at 340 nm after excitation at 280 nm. The temperature up-scan rate was set to  $0.6 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  in all the experiments, matching the conditions of previously reported studies.<sup>24</sup> Experiments were performed under non-competitive conditions, at a final KcsA concentration of 1  $\mu\text{M}$  solubilized in a buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.0), 5 mM DDM, and 5 mM NMDG. The initial  $\text{Na}^+$  concentration, coming from the protein stock, was 1.5 mM, except for the E71A channel, which was characterized in 1.5 mM  $\text{K}^+$  as the initial condition. Increasing amounts of either NaCl or KCl



were then added to the samples, and the binding of each cation was analyzed separately. In both approaches, the midpoint temperature of dissociation and unfolding of the tetramer ( $T_m$ ) was calculated from the thermal denaturation curve by fitting the data (changes in fluorescence intensity at 340 nm with an increase in temperature) to a two-state unfolding model, assuming a linear dependence of the pre- and post-transition baselines on temperature.<sup>34</sup>

The increase in the  $T_m$  observed at increasing concentrations of the ligand cations is directly related to the degree of ion occupancy of the selectivity filter<sup>24,33,35,36</sup> and can be used to estimate the dissociation constant of the protein–ligand complex using the following equation

$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{T_m - (T_m)_0}{T_m} = \frac{R(T_m)_0}{\Delta H_0} \ln \left( 1 + \frac{[L]}{K_D} \right) \quad (1)$$

where  $T_m$  and  $(T_m)_0$  refer to the denaturation temperature (in kelvin) for the protein in the presence and absence of ligand, respectively (we use the term  $t_m$  to refer to the midpoint denaturation temperature in degrees Celsius),  $R$  is the gas constant, and  $\Delta H_0$  is the enthalpy change upon protein denaturation in the absence of ligand.<sup>24</sup> Monitoring the change in the melting temperature of a protein as a result of ligand binding has been the method of choice for characterizing the binding energetics in many instances.<sup>37–41</sup>

**Circular Dichroism.** Far-UV circular dichroism (CD) spectra were recorded on a Jasco J810 spectropolarimeter at a scan rate of 100 nm/min using a 0.5 nm resolution. The mean residue ellipticity,  $\theta_{MRW}$ , was calculated as described in ref 42. Aliquots of KcsA were diluted with 20 mM Tris (pH 7.0), 5 mM DDM, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, or K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to a final concentration of 5  $\mu$ M to obtain the average of six spectra.

**Electrophysiological Recordings in Reconstituted Giant Liposomes.** Inside-out patch clamp recordings<sup>43</sup> were conducted on excised patches from giant liposomes containing wild-type KcsA, as reported previously.<sup>44</sup> Recordings were obtained using an EPC-10 (Heka Electronic, Lambrecht/Pfalz, Germany) patch clamp amplifier, at a gain of 50 mV/pA. The holding potential was applied to the interior of the patch pipet, and the bath was maintained at virtual ground. The recordings were filtered at 1 kHz, and the data were analyzed with Clampfit-9 (Axon Instruments). An Ag–AgCl wire was used as the reference electrode through an agar bridge. The measurements were taken at room temperature, and unless indicated otherwise, the pipet (extracellular side) solution contained 10 mM HEPES buffer (pH 7) and 100 mM KCl and the bath solution contained 10 mM MES buffer (pH 4) and 100 mM KCl for regular measurements. The solutions used for selectivity experiments under bi-ionic conditions are described in the legend of Figure 7. Voltage ramps or different holding potentials (see the legends of Figures 6 and 7) were routinely imposed on the membrane patches to record E71A and M96V KcsA currents. The inactivation rates for the M96V mutant and wild-type KcsA were estimated by measuring the current at 150 mV from voltage ramps taken at different times. Data were normalized to the initial current value and plotted versus time.

## RESULTS

**Ions as Effectors of the Structure and Stability of the E71A and M96V KcsA Mutant Channels.** Both in detergent solution and in a membrane bilayer, the wild-type KcsA channel undergoes characteristic changes in its conformation and

stability when in the presence of permeating (K<sup>+</sup>) or nonpermeating (Na<sup>+</sup>) ionic species. Indeed, the ion-induced shifts in the intrinsic fluorescence emission spectra of the protein have been used previously to describe ion binding.<sup>24,33,35</sup>

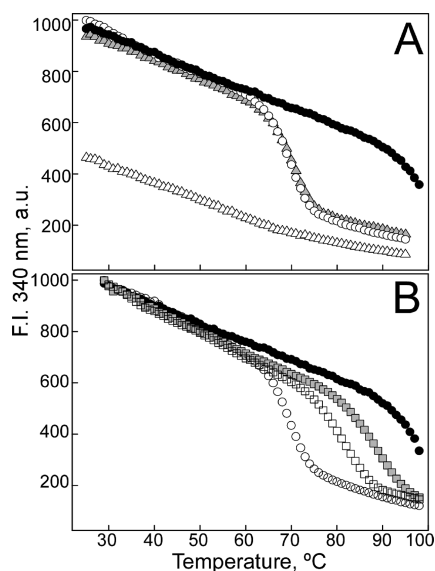
Like wild-type KcsA, the detergent-solubilized E71A and M96V mutant channels used here also respond to the presence of ions as effectors of the channel proteins (Figure 1). In the presence of K<sup>+</sup>, the intrinsic fluorescence emission spectrum of the E71A mutant is positioned halfway between those of the K<sup>+</sup>-saturated and Na<sup>+</sup>-saturated wild-type KcsA, while in the presence of Na<sup>+</sup>, the spectrum of the mutant channel is much more red-shifted (Figure 1A). This seems consistent with the observation that Na<sup>+</sup> causes partial unfolding of the E71A mutant, as revealed by circular dichroism (Figure 1B), as well as dissociation of the tetrameric channel into its constituent subunits (Figure 1E). Interestingly, a similar phenomenon of dissociation of the tetrameric E71A mutant channel is also observed at very low (submillimolar) K<sup>+</sup> concentrations (data not shown).

In the M96V mutant channel, the fluorescence spectrum of the protein is much less sensitive to the presence of either K<sup>+</sup> or Na<sup>+</sup> than that of the E71A mutant, indicating that the protein tertiary structure in M96V is less dependent on the type of monovalent cation used in the experiments (Figure 1D). Spectral shifts in M96V with respect to wild-type KcsA are also different from those observed with the E71A mutant: a red shift is observed in K<sup>+</sup> buffers, and a blue shift occurs in Na<sup>+</sup> (Figure 1C). In addition, the CD spectra of the M96V mutant channel reveal that neither K<sup>+</sup> nor Na<sup>+</sup> causes a significant departure in the secondary structure from that observed in wild-type KcsA (Figure 1D).

With regard to the quaternary structure of the channel proteins, it should be noted that as for the wild-type KcsA channel, the two mutants are generally expressed and purified as homotetramers that are stable enough to remain as such in SDS–PAGE (Figure 1E). The most noticeable exception to this is the E71A mutant in Na<sup>+</sup> medium, which appears almost exclusively as monomeric species in the electrophoretic analysis, in apparent agreement with the structural deterioration suggested from the fluorescence and circular dichroism studies.

Monitoring the ion-induced changes in the protein's intrinsic fluorescence as a function of temperature has been used to characterize binding of ions to the detergent-solubilized channels. The advantage of using this procedure versus previously explored monitoring of ion-induced fluorescence spectral shifts has been discussed previously.<sup>24</sup> KcsA undergoes an irreversible, cooperative process of thermal denaturation as the temperature is increased, which includes the dissociation of the tetrameric protein into individual monomers, which is concomitant with its partial unfolding.<sup>42</sup> Panels A and B of Figure 2 show examples of such thermal denaturation processes in the two mutant channels, in both K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> media. As expected, thermal denaturation of the E71A mutant in Na<sup>+</sup> does not exhibit sigmoidal behavior, likely because this mutant channel is already denatured (partly unfolded and dissociated into monomers) in the presence of Na<sup>+</sup>. On the other hand, the E71A mutant in K<sup>+</sup> buffer exhibits a clearly sigmoidal denaturation curve, although its thermal stability (evaluated as the midpoint temperature of the cooperative transition,  $t_m$ ) is greatly diminished with respect to that of wild-type KcsA under identical conditions (K<sup>+</sup> buffer) and in fact resembles closely that of wild-type KcsA in Na<sup>+</sup> medium (Figure 2A).



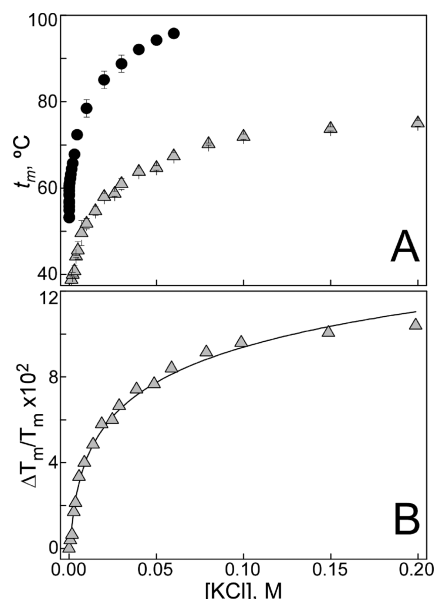


**Figure 2.** Fluorescence intensity monitoring of thermal denaturation of KcsA mutant channels. All experiments were conducted at a channel protein concentration of  $1 \mu\text{M}$  in 20 mM HEPES (pH 7.0) and 5 mM DDM containing either KCl or NaCl at the indicated concentrations. The denaturation curves of the wild-type KcsA channel in 100 mM KCl ( $\bullet$ ) or 100 mM NaCl ( $\circ$ ) are included in the plots for comparison. (A) E71A KcsA in 100 mM KCl ( $\blacktriangle$ ) shows a sigmoidal transition with a  $t_m$  of approximately  $70^\circ\text{C}$ , whereas in the presence of 100 mM  $\text{Na}^+$  ( $\triangle$ ), no sigmoidal behavior could be detected. (B) M96V KcsA shows similar sigmoidal transitions in the presence of either 100 mM KCl ( $\blacksquare$ ;  $t_m \sim 88^\circ\text{C}$ ) or 100 mM NaCl ( $\square$ ;  $t_m \sim 81^\circ\text{C}$ ).

As for the M96V mutant channel in the presence of either cation (Figure 2B), we observed that the thermal denaturation curves fall between those seen for wild-type KcsA in  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  media, showing a decrease in the thermal stability when in  $\text{K}^+$  but an increase when in the presence of  $\text{Na}^+$  in the buffer.

**Characterization of Binding of Ions to the Mutant Ion Channels.** The thermal denaturation assay described above has been used to study binding of  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  to the E71A and M96V KcsA channel mutants under noncompetitive conditions. We chose such a procedure because the differential effects of increasing the concentration of the cations on the  $t_m$  of the protein denaturation processes are remarkably strong and strongly dependent on the type and concentration of ions present in the buffer, thus facilitating the quantitation of the ion binding phenomena. For such purposes, batches of the purified KcsA mutants were prepared in the presence of low concentrations of monovalent cations ( $\text{Na}^+$  in the case of the M96V mutant and  $\text{K}^+$  for the E71A mutant, at  $\sim 1.5 \text{ mM}$  in either case); then either  $\leq 200 \text{ mM}$   $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$  was added separately to the KcsA mutant samples, and they were subjected to thermal denaturation. The low concentrations of monovalent cations used in each case were chosen as the starting point in these titrations to guarantee a low occupancy of the ion binding sites, so that most of the channel population to be titrated is initially present as the cation-free form.<sup>33</sup> It should be mentioned here that in the case of the E71A mutant,  $\text{K}^+$  at  $< 1 \text{ mM}$  or  $\text{Na}^+$  over the whole concentration range abolishes the characteristic sigmoidal behavior seen in the thermal denaturation curves.

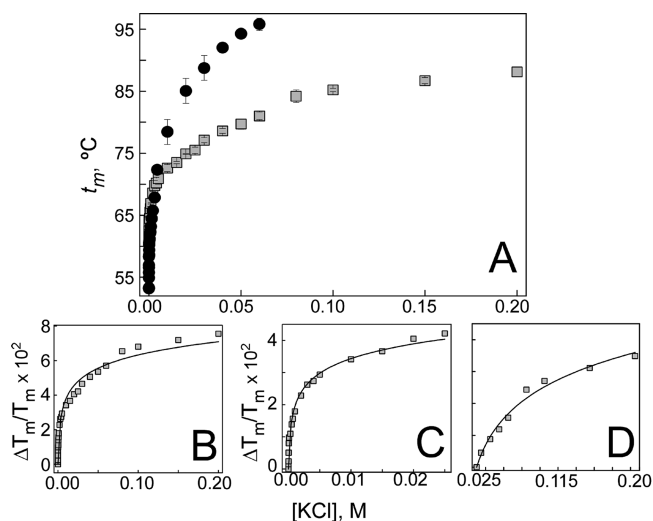
Figure 3A shows the results of titrating the E71A mutant with  $\text{K}^+$ . A first observation is that  $\text{K}^+$  increases greatly the



**Figure 3.** Dependence of the thermal stability of E71A KcsA on  $\text{K}^+$  concentration. (A) Thermal stabilization of the mutant protein ( $\blacktriangle$ ;  $1 \mu\text{M}$  protein in 20 mM HEPES (pH 7.0), 5 mM DDM, 5 mM NMDG, and 1.5 mM KCl) upon addition of increasing amounts of KCl. Filled circles represent the  $\text{K}^+$ -dependent stabilization of  $1 \mu\text{M}$  wild-type KcsA [20 mM HEPES (pH 7.0), 5 mM DDM, 5 mM NMDG, and 1.5 mM NaCl], which have been included for comparison. Results are shown as  $t_m \pm \text{SD}$  ( $n = 3$ ). (B) Fitting of experimental data for binding of  $\text{K}^+$  to E71A KcsA to eq 1. Solid lines represent the best fits of the experimental data points to the cation binding model described in Materials and Methods. The estimated dissociation constant for the single set of binding sites detected in these experiments is  $3.5 \pm 0.5 \text{ mM}$ .

thermal stability of the mutant channel, as the  $t_m$  is increased by more than  $30^\circ\text{C}$  in response to an increase in the  $\text{K}^+$  concentration from 1.5 to 200 mM. Second, the stabilization of the E71A mutant protein induced by  $\text{K}^+$  can be described in terms of the occupation of a single set of fairly low affinity ion binding sites ( $K_D \sim 3.5 \text{ mM}$ ) (Figure 3B). Both the  $K_D$  and the increase in  $t_m$  are quite similar to those reported for the second, low-affinity  $\text{K}^+$  binding event in the wild-type channel, ascribed to the formation of the conductive state of the selectivity filter.<sup>24</sup> Obviously,  $\text{Na}^+$  binding experiments could not be conducted with the detergent-solubilized E71A mutant, as  $\text{Na}^+$  by itself over the whole range of concentrations used in these studies causes denaturation of the protein.

For the M96V mutant channel, both  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  titrations were conducted. Figure 4A shows that again,  $\text{K}^+$  significantly increases the thermal stability of the M96V mutant channel, although the observed stabilization is weaker than in wild-type KcsA. Interestingly, the increase in  $t_m$  observed in this mutant with potassium concentration occurs in two phases, suggesting the existence of not one but two thermodynamically different sets of ion binding sites that are occupied successively as the protein becomes saturated with the ion (Figure 4B–D). The occupancy of the first set of high-affinity  $\text{K}^+$  binding sites over the lower  $\text{K}^+$  concentration range ( $< 25 \text{ mM}$ ) results in an increase in the  $t_m$  of approximately  $15^\circ\text{C}$ , which is followed by an additional  $12^\circ\text{C}$  increase in the  $t_m$  when the second set of  $\text{K}^+$  binding sites becomes occupied at higher concentrations ( $\leq 200 \text{ mM}$ ). The apparent dissociation constants were estimated to be approximately  $57 \mu\text{M}$  for the higher-affinity

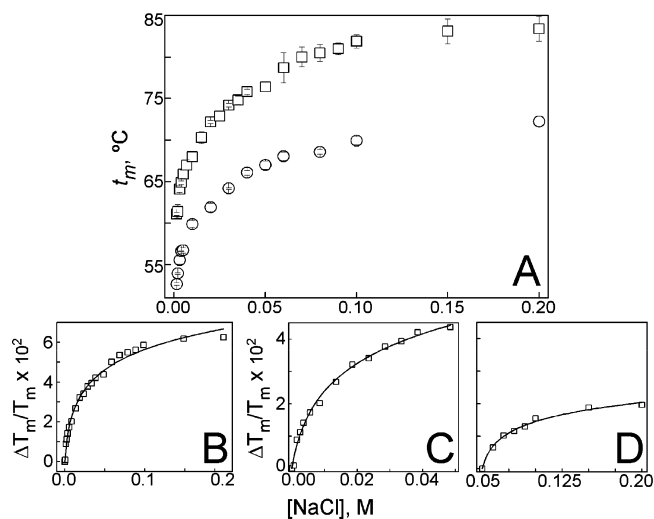


**Figure 4.** Dependence of the thermal stability of M96V KcsA (■) on  $K^+$  concentration. Experimental conditions are described in the legend of Figure 3. The behavior of wild-type KcsA (●) is also included in panel A to facilitate comparison. Panel B shows that fitting to eq 1 for binding of  $K^+$  to a single set of binding sites on the channel fails when taking into account the whole titration curve but suffices when the low  $K^+$  (C) and high  $K^+$  (D) concentration ranges in the titration curves are analyzed separately, suggesting that at least two different sets of  $K^+$  binding sites are present in the KcsA protein. The estimated dissociation constants for such high- and low-affinity  $K^+$  binding sites in M96V KcsA are  $57 \pm 14 \mu\text{M}$  and  $41 \pm 11 \text{ mM}$ , respectively.

sites and 41 mM for the lower-affinity sites. These indicate an approximately 20-fold decrease in the affinities for  $K^+$  in this mutant channel with respect to those exhibited by the corresponding high- and low-affinity sites in wild-type KcsA ( $1.9 \mu\text{M}$  and  $2.5 \text{ mM}$ , respectively).<sup>24</sup>

Figure 5 shows the results obtained from titration of the M96V mutant channel with increasing concentrations of  $Na^+$ . First, we observed that  $Na^+$  stabilizes the M96V mutant channel against thermal denaturation (i.e., it increases the  $t_m$ ) more markedly than in the wild-type KcsA protein (Figure 5A). Second, unexpectedly, we found that the increase in  $t_m$  observed in this mutant with  $Na^+$  concentration takes place in two phases, instead of being monophasic as in the wild-type protein. This suggests that, like that seen in the binding of  $K^+$ , there are two thermodynamically different sets of  $Na^+$  binding sites in this mutant protein that are occupied successively as the protein becomes saturated with the ion (Figure 5B–D). The occupancy of the first set of higher-affinity  $Na^+$  binding sites increases the  $t_m$  by nearly  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  (when the  $Na^+$  concentration reaches 50 mM) and has a  $K_D$  value of approximately 3.8 mM, very similar to the single event reported in the wild-type channel (3.3 mM). A further increase in the  $Na^+$  concentration to 200 mM leads to an additional increase in the  $t_m$  of  $6 \text{ }^\circ\text{C}$  when the second set of  $Na^+$  sites are occupied, with an apparent  $K_D$  for the ion binding process of approximately 54 mM.

**Ion Permeation through the E71A and M96V KcsA Mutant Channels.** Wild-type KcsA reconstituted into giant liposomes exhibits different patterns of channel activity, which have been correlated with different supramolecular assemblies and interactions among individual channels.<sup>44</sup> The more frequent pattern has a characteristic low opening probability (LOP pattern) and most other features reported for KcsA reconstituted into planar lipid bilayers.<sup>45–47</sup> The predominant events in this LOP pattern correspond to the gating of

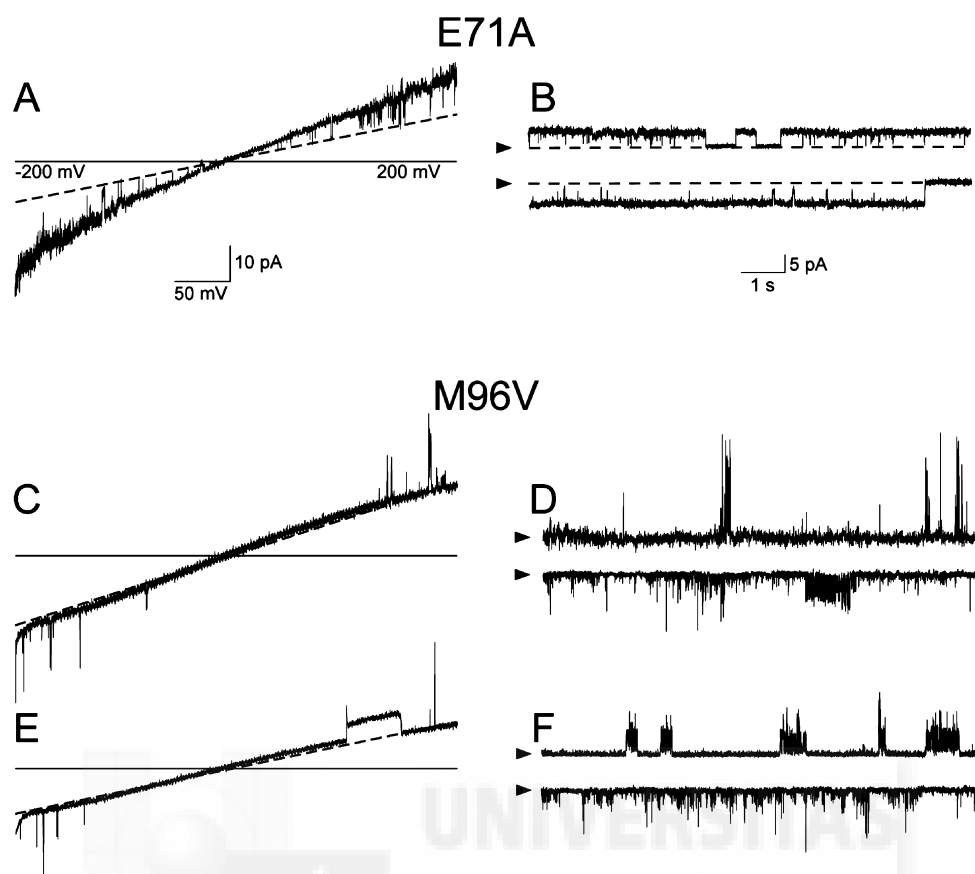


**Figure 5.** Dependence of the thermal stability of M96V KcsA (□) on  $Na^+$  concentration. Experimental conditions are as described in the legend of Figure 3. The behavior of wild-type KcsA (○), in which  $Na^+$  is less stabilizing than in the M96V mutant, is also included in panel A to facilitate comparison. Panel B shows that as in the  $K^+$  titration, fitting to eq 1 fails when taking into account the whole  $Na^+$  titration curve but suffices when the low  $Na^+$  (C) and high  $Na^+$  (D) concentration ranges are analyzed separately, suggesting that, again, at least two different sets of  $Na^+$  binding sites are present in the M96V KcsA mutant channel. The estimated dissociation constants for such high- and low-affinity  $Na^+$  binding sites in M96V KcsA are  $3.8 \pm 0.5$  and  $54 \pm 12 \text{ mM}$ , respectively.

individual single channels or the positive coupling of two KcsA channels. However, other activity patterns are also detected almost as frequently, which are characterized by a high channel opening probability (HOP patterns) and by the positive coupling of several (most often five or multiples of five) concerted channels.<sup>44</sup>

Figure 6 shows recordings from excised giant liposome patches containing the reconstituted E71A (Figure 6A,B) or M96V (Figure 6C–F) KcsA mutant. The E71A mutant exhibits three major relevant features: (i) a greatly diminished ability to undergo coupled gating (i.e., uncoupled single-channel currents are detected as the predominant gating event in most of the cases), (ii) a very high channel opening probability, and (iii) a low rate of inactivation on the experimental time scale. These features essentially coincide with reports by others<sup>26,27,48,49</sup> and cause the predominant events seen in the E71A recordings that correspond to a single channel “frozen” in a conductive conformation for  $K^+$ . Interestingly, the E71A mutant channel maintains such  $K^+$  permeation features even at low concentrations of the cation (down to 5 mM on both sides of the liposome patch), suggesting that the frozen conductive conformation mentioned previously is indeed constitutive in the E71A mutant and does not collapse in response to low  $K^+$  concentrations. This seems also fully consistent with recently published crystallographic evidence of the lack of collapse of the E71A mutant in the absence of  $K^+$ .<sup>48</sup>

As stated above, substituting  $K^+$  with  $Na^+$  causes the E71A channel in detergent solution to partly unfold and dissociate into its constituent subunits, thus preventing  $Na^+$  binding experiments from being conducted. Interestingly, when reconstituted into asolectin liposomes, the E71A mutant channel remains as a tetramer as determined by SDS–PAGE upon extensive exposure to  $Na^+$  buffers (data not shown). This

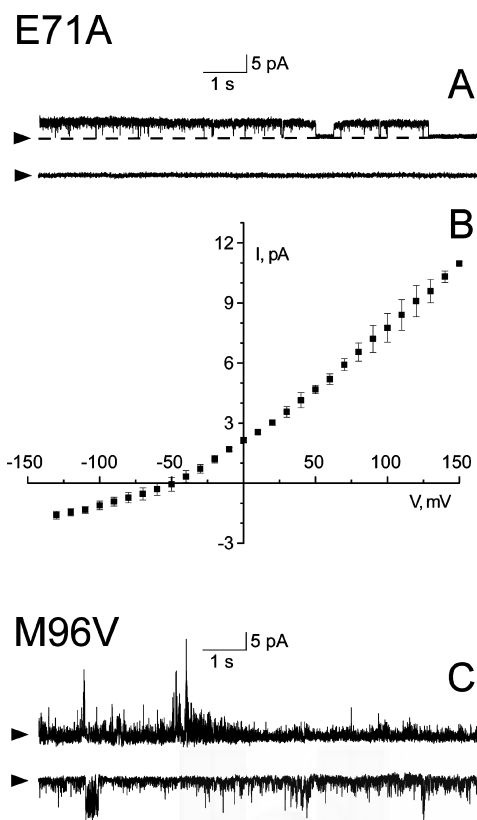


**Figure 6.** (A, C, and E) Typical voltage ramps ( $-200$  to  $200$  mV,  $133$  mV/s) obtained by patch clamping excised inside-out patches from reconstituted giant liposomes containing the E71A (A) or M96V (C and E) KcsA mutant. Symmetrical solutions of  $K^+$  ( $100$  mM KCl on both extra- and intracellular sides for panels A and C) or symmetrical  $Na^+$  solutions ( $100$  mM NaCl on both sides for panel E) were routinely used in the experiments. (B, D, and F) Recordings from the mutant channels taken at  $150$  and  $-150$  mV (top and bottom traces, respectively, in each of the panels) under otherwise identical experimental conditions. Notice the occurrence of single-channel as well as coupled gating events in the M96V channel in either a  $K^+$  (D) or a  $Na^+$  (F) solution. In this figure and Figure 7, the dashed line and the arrowheads indicate the closed channel state. Channel openings appear as upward (at positive voltages) or downward (at negative voltages) deflections over the closed state line.

is evidence that the insertion of the protein into the lipid bilayer provides protection to the mutant channel against ion-induced dissociation and unfolding and, more relevant to this work, allows channel recordings to be taken for this mutant channel in the presence of  $Na^+$ . We found that the mutant E71A channel exhibits blockade by  $Na^+$  when added intracellularly, while no  $Na^+$  currents were detected under bi-ionic conditions, with the  $Na^+$  solution bathing the extracellular side of the channel (Figure 7A). These latter observations, along with reports by other authors on the selectivity of the E71A mutant<sup>26,48,50</sup> and a similar E71V mutant,<sup>51</sup> suggested that the mutation retains qualitatively the selectivity properties of KcsA,<sup>47</sup> which clearly prefers  $K^+$  over  $Na^+$  (for instance,  $Na^+/K^+$  permeability ratios ranging  $0.03$  to  $0.14$  are reported in ref 48). This is further confirmed by the observation of a shift to negative values in the reversal potential under bi-ionic conditions (Figure 7B), which indicates a marked preference of the E71A mutant for  $K^+$  versus  $Na^+$ . Nonetheless, ion selectivity of the E71A mutant in strict terms seems to be a controversial issue, and while some authors report selectivity properties comparable to that of the wild-type channel,<sup>26,50</sup> others have found a decreased selectivity for  $K^+$  versus other monovalent metal ions.<sup>48</sup>

The M96V mutant channel was assayed in both  $K^+$  and  $Na^+$  media. Because of the similarity between the crystal structure of

this mutant channel and that of wild-type KcsA in presence of  $Na^+$  (see Scheme 1), M96V was identified as a collapsed channel, although no electrophysiological evidence was provided to demonstrate that fact.<sup>21</sup> We found that although the M96V mutant is inactivated  $\sim 4$ -fold faster than wild-type KcsA, this mutant channel cannot be identified as a collapsed channel. Indeed, the M96V channel when bathed in symmetrical  $K^+$  solutions shows an electrophysiological behavior reminiscent of that seen in wild-type KcsA.<sup>44</sup> This includes the single-channel conductance, the flickering behavior, or the presence of LOP and HOP patterns of electrical activity comprising gating events ranging from single channels to the coupling of large assemblies of channels (Figure 6D). Additionally, opposite to the case for the wild-type channel,  $Na^+$  does not block the mutant M96V channel, which indeed conducts  $Na^+$  almost as efficiently as  $K^+$  when using either symmetrical solutions [mean slope single-channel conductances of  $31 \pm 1$  and  $29 \pm 1$  pS have been determined in  $100$  mM KCl and  $100$  mM NaCl, respectively (Figure 6E,F)] or bi-ionic conditions (Figure 7C). Therefore, the most salient features of the M96V mutant channel are its rapid inactivation and its ability to accept both  $Na^+$  and  $K^+$  as conducting ionic species.



**Figure 7.** (A and C) Representative recordings taken at 150 and  $-150$  mV (top and bottom traces, respectively) obtained under bi-ionic conditions [10 mM HEPES buffer (pH 7) and 100 mM NaCl in the pipet solution and 10 mM MES buffer (pH 4) and 100 mM KCl in the bath] by patch clamping excised, inside-out patches bearing E71A (A) and M96V (C) KcsA mutant channels. Notice that  $\text{Na}^+$  currents (appearing as inward currents at negative voltages) were observed only in the M96V mutant. (B)  $I$ - $V$  plot for E71A mutant-mediated currents measured also under bi-ionic conditions but at higher salt concentrations to allow more precise current measurements (400 mM KCl on the intracellular side; 390 mM NaCl and 10 mM KCl on the extracellular side, respectively, instead of 100 mM KCl and 100 mM NaCl, which were used for the measurements in panels A and C). Symbols represent the average value of the current ( $\pm$ SD) at the different holding potentials taken from five separate experiments.

## DISCUSSION

Here we report on experiments that examined binding of ions to mutant KcsA channels presumed to be frozen in defined conformations of their selectivity filters. The rationale behind these experiments is that such defined conformations could perhaps be correlated with specific ion binding properties. For this purpose, we chose the E71A and M96V mutants of KcsA (see Scheme 1 for details about their structure), which were reported to be fixed in a mostly open, conductive conformation<sup>26,27</sup> and in a collapsed, nonconductive state,<sup>21</sup> respectively. As for the E71A mutant, our patch-clamp measurements on reconstituted giant liposomes essentially coincide with the observations by others<sup>26,48</sup> and led to the conclusion that the E71A mutant has a very low rate of inactivation and a very high opening probability. Therefore, the E71A mutant can indeed be considered in practical terms as a channel locked in a conductive conformation, which remains without collapsing even at low potassium concentrations. Interestingly,  $\text{K}^+$  binding experiments with this mutant channel

reveal the existence of just a single set of low-affinity  $\text{K}^+$  binding sites, which by analogy with the low-affinity, wild-type KcsA- $2\text{K}^+$  conductive complex mentioned in the introductory section seems consistent with the behavior expected for a conductive conformation. A low-affinity, conductive complex would certainly favor the occurrence of ion permeation, but it does not guarantee selectivity in the E71A mutant channel. In fact, exclusively on the basis of the binding affinity features, it should be predicted that this mutant channel would not be selective for  $\text{K}^+$  and, thus, should be expected to conduct other ionic species as well. Such a prediction, however, is in contrast with reports by other authors,<sup>26,48,50,51</sup> as well as with our own experimental findings on the selectivity for  $\text{K}^+$  of the E71A channel, which seems comparable to that of wild-type KcsA. A possible explanation of this apparent discrepancy is that the set of high-affinity  $\text{K}^+$  binding sites required to conform to our hypothesis is not thermodynamically stable in detergent solution and, therefore, cannot be detected in our ion binding experiments. The observed dissociation of the tetrameric E71A mutant into subunits in detergent solution either at a very low potassium concentration or in the presence of sodium (i.e., with a low occupancy of binding sites in either case) seemingly supports this interpretation. Also, given the increased stability observed for this protein when it is reconstituted into a lipid bilayer, in which the tetrameric structure is preserved regardless of ion type and concentration, it should be expected that the putative set of high-affinity  $\text{K}^+$  binding sites would also be protected by the membrane lipids to provide the observed selectivity.

The M96V mutant was originally predicted to be a collapsed form of the KcsA channel on the basis of its crystallographic structure, although no electrophysiological measurements were provided to confirm such a claim.<sup>21</sup> Here we found that the M96V mutant is inactivated quite rapidly, but prior to losing its activity, it behaves somewhat like the wild-type channel in that it displays LOP and HOP patterns of electrical activity. Nonetheless, the M96V mutant differs greatly from wild-type KcsA in two main aspects: (1) the much higher rate of inactivation and (2) the conduction of  $\text{Na}^+$ , which take place here as with  $\text{K}^+$ . This latter functional peculiarity of the M96V mutant channel is somewhat expected from the alteration seen in the S2 site, which is thought to be mostly responsible for ion selectivity in KcsA<sup>52</sup> and is of particular relevance to the ion binding measurements, because two sets of high- and low-affinity binding sites have been detected in this study for  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . This is reminiscent of that seen in the binding of the conducting species,  $\text{K}^+$ , to wild-type KcsA,<sup>24</sup> and therefore, it seemingly predicts that both  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  should be conducted by the M96V mutant, which is indeed observed experimentally. This is consistent with the marked similarity of the fluorescence spectra of the M96V mutant in sodium and potassium, which suggests that both ions induce a similar conformation of the selectivity filter. Also, the comparison with the behavior of wild-type KcsA in  $\text{K}^+$  predicts that the occurrence of low- and high-affinity binding sites for both cations in the M96V mutant should result in somewhat similar ion concentration-dependent affinity state transitions, and thus, gating features qualitatively similar to that of wild-type KcsA should be expected. This seems to correlate with the findings of LOP and HOP patterns of activity for the M96V mutant channel in the presence of either  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$ . Moreover, even the rapid disappearance of activity in the M96V patches is plausibly explained by the ion binding results: For the observed affinities and at the cation



concentration of 100 mM (either K<sup>+</sup> or Na<sup>+</sup>) used in the recordings, the conductive channel states in the M96V mutant could not be fully populated, at equilibrium nor kinetically. This should favor the nonconductive, higher-affinity states, which in turn increases the possibility of channel collapse, a phenomenon favored by the low occupancy of the selectivity filter by the permeating ion. It should be noted here that a previous isothermal scanning calorimetry study<sup>21</sup> did not show binding of K<sup>+</sup> to the M96V mutant. Such an apparent discrepancy could be explained on the basis of the experimental conditions used by those authors to study K<sup>+</sup> binding (in the continuous presence of 100 mM Na<sup>+</sup>), along with the dissociation constants for the two cations determined here, which clearly preclude the observation of K<sup>+</sup> binding in those experiments.

Our attempts to explain ion permeation features of model ion channels on the basis of ion binding parameters encounter a major conceptual difficulty in that the two major types of experimental results used here, i.e., patch-clamp recordings and ion binding measurements (or reported X-ray crystallography data), are obtained under markedly different experimental conditions. Briefly, the patch-clamp measurements (i) are probably conducted under far-from-equilibrium conditions (and, thus, are kinetically limited by potential energy barriers to ions and other factors), (ii) use the ion channel proteins reconstituted into giant liposomes, and (iii) record ionic currents that imply that the outer and inner gates in the KcsA channel (at the selectivity filter and at the intracellular ends of transmembrane helical segments, respectively) must both be opened for ions to flow. In contrast, ion binding experiments (i) use a much longer experimental time scale (equilibrium or near-equilibrium conditions) and (ii) are conducted with detergent-solubilized channel proteins and at neutral pH in an attempt to avoid gating by the inner gate and, thus, to underline inasmuch as possible the role of the selectivity filter in the process. In spite of these experimental differences, it seems remarkable that certain channel gating, ion selectivity, and permeation features can be grossly predicted on the basis of fairly simple and straightforward ion binding experiments. We propose the term “ion affinity hypothesis” to refer to these attempts to partly explain ion channel function on the basis of ion binding by the channel protein. In essence, we found that ion binding is a major source of stability for the channel protein. This is caused by ion-mediated intersubunit interactions at the channel’s selectivity filter, bridging adjacent subunits and holding together the characteristic tetrameric assembly.<sup>33,35</sup> Indeed, weakening such interactions by modifying the selectivity filter and by using an inappropriate ion, such as the E71A mutant in detergent solution and in a Na<sup>+</sup> medium, results in partial unfolding and complete dissociation of the channel into its constituent subunits. Second, depending upon ion type and concentration, binding of ions leads to different conformations of the channel protein that exhibit different ion binding affinities. High-affinity states guarantee binding of specific ions and thus, via ion selectivity, have a lower occupation of the available binding sites and are nonconductive. On the other hand, low-affinity states would not be expected to discriminate well among different ions present at moderate or high concentrations, have a higher ion occupancy of the available binding sites, and most importantly allow ion permeation to occur. Finally, as similarly proposed previously by others,<sup>33,53</sup> it seems likely that the conformational transitions between high-affinity (nonconducting) and low-affinity (conducting) states constitute the basis of channel gating.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +34 96 6658757. Fax: +34 96 6658758. E-mail: gonzalez.ros@umh.es.

### Author Contributions

M.L.R. and E.M. contributed equally to this work.

### Funding

Supported by grants from the Spanish DGI (BFU2008-0062/BMC, BFU2009-08346, and BFU2011-25920) and Consolider-Ingenio (2010 CSD2-2008-00005) and from the Generalitat Valenciana Prometeo (2010/046).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ABBREVIATIONS

CD, circular dichroism; DDM, dodecyl  $\beta$ -D-maltoside;  $\Delta H_u$ , enthalpy change upon protein unfolding in the absence of ligand; KcsA, potassium channel from *Streptomyces lividans*;  $K_D$ , dissociation constant; LOP, low-opening probability pattern; HOP, high-opening probability pattern; NMDG, N-methyl-D-glucamine; SD, standard deviation; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis;  $t_m$ , mid-point denaturation temperature (in degrees Celsius).

## REFERENCES

- (1) Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, Sinauer, Sunderland, MA.
- (2) Yellen, G. (1997) Single channel seeks permeant ion for brief but intimate relationship. *J. Gen. Physiol.* 110, 83–85.
- (3) Baukrowitz, T., 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.
- (4) Kiss, L., and Korn, S. J. (1998) Modulation of C-type inactivation by K<sup>+</sup> at the potassium channel selectivity filter. *Biophys. J.* 74, 1840–1849.
- (5) Levy, D. I., and Deutsch, C. (1996) A voltage-dependent role for K<sup>+</sup> in recovery from C-type inactivation. *Biophys. J.* 71, 3157–3166.
- (6) Levy, D. I., and Deutsch, C. (1996) Recovery from C-type inactivation is modulated by extracellular potassium. *Biophys. J.* 70, 798–805.
- (7) Lopez-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S. H., and Aldrich, R. W. (1993) Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Recept. Channels* 1, 61–71.
- (8) Kiss, L., LoTurco, J., and Korn, S. J. (1999) Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys. J.* 76, 253–263.
- (9) Starkus, J. G., Kuschel, L., Rayner, M. D., and Heinemann, S. H. (1997) Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J. Gen. Physiol.* 110, 539–550.
- (10) Starkus, J. G., Kuschel, L., Rayner, M. D., and Heinemann, S. H. (1998) Macroscopic Na<sup>+</sup> currents in the “nonconducting” Shaker potassium channel mutant W434F. *J. Gen. Physiol.* 112, 85–93.
- (11) Wang, Z., Hesketh, J. C., and Fedida, D. (2000) A high-Na<sup>+</sup> conduction state during recovery from inactivation in the K<sup>+</sup> channel Kv1.5. *Biophys. J.* 79, 2416–2433.
- (12) Gomez-Lagunas, F. (1997) Shaker B K<sup>+</sup> conductance in Na<sup>+</sup> solutions lacking K<sup>+</sup> ions: A remarkably stable non-conducting state produced by membrane depolarizations. *J. Physiol.* 499 (Part 1), 3–15.
- (13) Gomez-Lagunas, F. (2001) Na<sup>+</sup> interaction with the pore of Shaker B K<sup>+</sup> channels: Zero and low K<sup>+</sup> conditions. *J. Gen. Physiol.* 118, 639–648.
- (14) Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) A prokaryotic

potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* 14, 5170–5178.

(15) Doyle, D. A., Morais, C. J., 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.

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

(17) Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2003) The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: Charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* 333, 965–975.

(18) Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* 414, 37–42.

(19) Zhou, M., and MacKinnon, R. (2004) A mutant KcsA K<sup>+</sup> channel with altered conduction properties and selectivity filter ion distribution. *J. Mol. Biol.* 338, 839–846.

(20) Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2004) Ion binding affinity in the cavity of the KcsA potassium channel. *Biochemistry* 43, 4978–4982.

(21) Lockless, S. W., Zhou, M., and MacKinnon, R. (2007) Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K<sup>+</sup> channel. *PLoS Biol.* 5, e121.

(22) Berneche, S., and Roux, B. (2005) A gate in the selectivity filter of potassium channels. *Structure* 13, 591–600.

(23) Domene, C., and Furini, S. (2009) Dynamics, energetics, and selectivity of the low-K<sup>+</sup> KcsA channel structure. *J. Mol. Biol.* 389, 637–645.

(24) Renart, M. L., Triano, I., Poveda, J. A., Encinar, J. A., Fernandez, A. M., Ferrer-Montiel, A. V., Gomez, J., and Gonzalez Ros, J. M. (2010) Ion binding to KcsA: Implications in ion selectivity and channel gating. *Biochemistry* 49, 9480–9487.

(25) Thompson, A. N., Kim, I., Panosian, T. D., Iverson, T. M., Allen, T. W., and Nimigeon, C. M. (2009) Mechanism of potassium-channel selectivity revealed by Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> binding sites within the KcsA pore. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1317–1324.

(26) Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 311–318.

(27) Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Lewis, A., Vasquez, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2007) Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1062–1069.

(28) Cuello, L. G., Jogini, V., Cortes, D. M., and Perozo, E. (2010) Structural mechanism of C-type inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Nature* 466, 203–208.

(29) Molina, M. L., Encinar, J. A., Barrera, F. N., Fernandez-Ballester, G., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2004) Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* 43, 14924–14931.

(30) Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1997) in *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., Ed.) IRL Press at Oxford University Press, Oxford, U.K.

(31) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

(32) Riquelme, G., Lopez, E., Garcia-Segura, L. M., Ferragut, J. A., and Gonzalez-Ros, J. M. (1990) Giant liposomes: A model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels. *Biochemistry* 29, 11215–11222.

(33) Renart, M. L., Barrera, F. N., Molina, M. L., Encinar, J. A., Poveda, J. A., Fernandez, A. M., Gomez, J., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Effects of conducting and blocking ions on the structure and stability of the potassium channel KcsA. *J. Biol. Chem.* 281, 29905–29915.

(34) Sehgal, P., and Otzen, D. E. (2006) Thermodynamics of unfolding of an integral membrane protein in mixed micelles. *Protein Sci.* 15, 890–899.

(35) Krishnan, M. N., Bingham, J. P., Lee, S. H., Trombley, P., and Moczyldowski, E. (2005) Functional role and affinity of inorganic cations in stabilizing the tetrameric structure of the KcsA K<sup>+</sup> channel. *J. Gen. Physiol.* 126, 271–283.

(36) Krishnan, M. N., Trombley, P., and Moczyldowski, E. G. (2008) Thermal stability of the K<sup>+</sup> channel tetramer: Cation interactions and the conserved threonine residue at the innermost site (S4) of the KcsA selectivity filter. *Biochemistry* 47, 5354–5367.

(37) Chaires, J. B. (2008) Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 135–151.

(38) Cooper, A., Nutley, M. A., and Wadood, A. (2000) in *Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and calorimetry* (Harding, S. E., and Chowdhry, B. Z., Eds.) pp 287–318, Oxford University Press, Oxford, U.K.

(39) Sanchez-Ruiz, J. M. (2007) Ligand effects on protein thermodynamic stability. *Biophys. Chem.* 126, 43–49.

(40) Sturtevant, J. M. (1987) Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38, 463–488.

(41) Thorolfsson, M., Ibarra-Molero, B., Fojan, P., Petersen, S. B., Sanchez-Ruiz, J. M., and Martinez, A. (2002) L-Phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: A differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* 41, 7573–7585.

(42) Triano, I., Barrera, F. N., Renart, M. L., Molina, M. L., Fernandez-Ballester, G., Poveda, J. A., Fernandez, A. M., Encinar, J. A., Ferrer-Montiel, A. V., Otzen, D., and Gonzalez-Ros, J. M. (2010) Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry* 49, 5397–5404.

(43) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch.* 391, 85–100.

(44) Molina, M. L., Barrera, F. N., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Renart, M. L., Encinar, J. A., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J. Biol. Chem.* 281, 18837–18848.

(45) Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating II: Single-channel currents. *J. Gen. Physiol.* 130, 479–496.

(46) Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) Single *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channels: Functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol.* 114, 551–560.

(47) LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) KcsA: It's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* 118, 303–314.

(48) Cheng, W. W., McCoy, J. G., Thompson, A. N., Nichols, C. G., and Nimigeon, C. M. (2011) Mechanism for selectivity-inactivation coupling in KcsA potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5272–5277.

(49) Rotem, D., Mason, A., and Bayley, H. (2010) Inactivation of the KcsA potassium channel explored with heterotetramers. *J. Gen. Physiol.* 135, 29–42.

(50) Piasta, K. N., Theobald, D. L., and Miller, C. (2011) Potassium-selective block of barium permeation through single KcsA channels. *J. Gen. Physiol.*, DOI: 10.1085/jgp.201110684.

(51) Choi, H., and Heginbotham, L. (2004) Functional influence of the pore helix glutamate in the KcsA K<sup>+</sup> channel. *Biophys. J.* 86, 2137–2144.

(52) Egwolf, B., and Roux, B. (2010) Ion selectivity of the KcsA channel: A perspective from multi-ion free energy landscapes. *J. Mol. Biol.* 401, 831–842.

(53) VanDongen, A. M. (2004) K channel gating by an affinity-switching selectivity filter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3248–3252.

## 9.2. Manuscrito en revisión:

*Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering potassium channel selectivity*







June 8, 2016

Dear Dr. Gonzalez-Ros:

We have received your manuscript entitled:

"Differential Binding of Monovalent Cations to KcsA: Deciphering Potassium Channel Selectivity".

It has been given the number JBC/2016/742098 and has been assigned to:

Dr. Stephenson  
Associate Editor  
Journal of Biological Chemistry  
E-mail: [echaulk@asbmb.org](mailto:echaulk@asbmb.org)

Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all authors concur in the submission and that the final version of the manuscript has been seen and approved by all authors. Papers are published with the implicit understanding that you will pay all publication charges, as detailed here: [www.jbc.org/site/misc/ifora.xhtml#PubCharges](http://www.jbc.org/site/misc/ifora.xhtml#PubCharges).

All authors may view the manuscript by logging into the Author Area of Bench>Press <http://submit.jbc.org>, the JBC's manuscript handling system. In order to log in, authors need an account in the system and the email address given for an author during the submission process must be associated with that account. Any author without a current Bench>Press account may create one by clicking "Create an account" at <http://submit.jbc.org>. Please note that the system might require up to 30 minutes to create a new account and provide access to the manuscript.

For corresponding authors who are members of ASBMB, member discounts apply to publication charges, including free color figures. To learn more about ASBMB membership, visit [www.asbmb.org/membership.aspx](http://www.asbmb.org/membership.aspx).

\*\*\*\*\*

The Journal of Biological Chemistry publishes papers based on original research that are judged to make a novel and important contribution to understanding the molecular and cellular basis of biological processes. A detailed description of JBC Editorial policies can be found on the Journal's website at <http://www.jbc.org/misc/edpolicy.xhtml>. Manuscripts that are judged to be inconsistent with JBC editorial policies may be declined without a full review, even if the experimental work is technically sound.

The Editor-in-Chief, or the Co-editor, initiates a confidential editorial evaluation process by sending submitted manuscripts to an Associate Editor. The Associate Editor sends it to reviewing editors with the appropriate scientific expertise from the Editorial Board, or to expert reviewers outside the Board. Reviewing editors may ask additional referees for advice on technical issues when needed. Reviewers provide assessments of originality, scientific importance and technical quality to the Associate Editor to use in deciding whether the manuscript should be accepted, reconsidered after revision, or declined. The Associate Editor forwards the critiques to the corresponding author with a letter that explains the decision.



## Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering potassium channel selectivity

E. Montoya<sup>1</sup>, M.L. Renart<sup>1</sup>, A.M. Giudici, J.A. Poveda, A.M. Fernández, A. Morales<sup>2</sup> and J.M. González-Ros\*

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain.

<sup>(1)</sup> These two authors contributed equally to this work.

<sup>(2)</sup> Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, 03080 Alicante, Spain.

(\*) To whom correspondence should be addressed. Phone: + 34 96 6658757; Fax: + 34 96 6658758; E-mail: [gonzalez.ros@umh.es](mailto:gonzalez.ros@umh.es)

**RUNNING TITLE:** Potassium channel selectivity

**KEY WORDS:** ion binding; potassium channel effectors; protein thermal stability; selectivity filter conformation, selectivity, permeability.

### ABBREVIATIONS USED ARE:

KcsA, potassium channel from *Streptomyces lividans*; DDM, dodecyl  $\beta$ -D-maltoside; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis;  $t_m$ , midpoint denaturation temperature (in degrees Celsius);  $\Delta H_o$ , enthalpy change upon protein unfolding in the absence of ligand;  $K_D$ , dissociation constant; TBA, tetrabutylammonium; NMDG<sup>+</sup>, N-methyl-D-glucamine; SD, standard deviation.

**ABSTRACT**

This work explores whether the ion selectivity and permeation properties of a model potassium channel, KcsA, could be explained on the basis of its ion binding features. Non-permeant  $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$  bind with low affinity (millimolar  $K_D$ 's) to a single set of sites contributed by the S1 and S4 sites in the KcsA crystal structure. Likewise, permeant  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Tl}^+$  and even  $\text{Cs}^+$  bind to two thermodynamically different sets of sites as their concentration increases, consistent with crystallographic evidence on the ability of permeant species to induce a concentration-dependent transition between conformational states (non-conductive and conductive) of the channel's selectivity filter. The first set of such sites, assigned also to the crystallographic S1 and S4 sites, shows similarly high affinities for all permeant species (micromolar  $K_D$ 's), thus, securing displacement of potentially competing non-permeant cations. The second set of sites, available only to permeant cations upon the transition to the conductive filter conformation, shows low affinity (millimolar  $K_D$ 's), thus, favoring cation dissociation and permeation and results from the combined presence of all S1 through S4 crystallographic sites.

The differences in affinities between permeant and non-permeant cations and the similarities in binding behavior within each of these two groups, correlate fully with their permeabilities relative to  $\text{K}^+$ , suggesting that binding is an important determinant of the channel's ion selectivity. Conversely, the complexity observed in permeation features cannot be explained just in terms of binding and likely relates to reported differences in the occupancy of the S2 and S3 sites by the permeant cations.

## INTRODUCTION

Potassium channels, a ubiquitous class of complex membrane proteins, are involved in a large variety of important physiological and pathophysiological processes and are currently considered a relevant pharmacological target (1). Potassium channels conduct  $K^+$  at high rates, with a marked preference over the non-permeant  $Na^+$  (2). Nonetheless, specific recognition of a given cation by the channel protein, while simultaneously allowing high conduction rates, seem hard to reconcile phenomena and many efforts have been directed towards the understanding of these fundamental ion channel properties. Most of such studies have been made possible since the pioneering work by MacKinnon's group on solving the high resolution X-ray structure of KcsA, a potassium channel from *Streptomyces lividans* (3). Functionally, KcsA is activated by intracellular acidic pH (4) and becomes inactivated through a still not fully unraveled mechanism (5), similar to C-type inactivation in eukaryotic  $K^+$  channels (6). Structurally, KcsA is a homotetramer in which each subunit defines two transmembrane segments connected by a pore region that contains a tilted short helix (pore helix) and an ion selectivity filter with the sequence TVGYG, unmistakably homologous to the more complex eukaryotic  $K^+$  channels. The backbone carbonyl oxygens of such residues create a stack of four binding sites at which  $K^+$  may bind in a dehydrated form. Crystal structures of wild-type KcsA obtained under different ionic conditions indicate that the selectivity filter adopts distinct conformations depending on  $K^+$  concentration (7,8). At 5 mM  $K^+$ , the filter is in a nonconductive conformation in which  $K^+$  ions bind only at the ends of the selectivity filter (the so-called sites S1 and S4), with an average occupancy of just one  $K^+$  distributed between those two sites. As the  $K^+$  concentration increases up to 20 mM, a second ion goes into the middle of the filter (sites S2 or S3) and a change in conformation to a conductive state occurs, which has an average occupation of two  $K^+$  ions per channel (7,8). Use of  $Tl^+$ , instead of  $K^+$ , revealed an identical occupation of filter sites by the former, while cations such as  $Rb^+$  or  $Cs^+$  could not occupy the S2 site, although their average occupation was also two ions per channel at any given time, similar to that found under high  $K^+$  conditions (9). On the other hand, save the differences in coordination geometries,  $Na^+$  was initially found at S1 and S4 sites in a non-conductive channel conformation (10) or more

recently, at a “B” site near S4 (11), but never associated to the S2 and S3 sites, showing an average occupancy of just one ion per channel at any given time.

The crystallographic evidence from above, complemented with “in silico” simulation and other studies (12-14) have been used to elaborate the current theories to explain cation selectivity and permeation (15). In this context, we previously reported ion binding assays based on monitoring the intrinsic fluorescence from the five tryptophan residues per subunit present in KcsA (16), hoping to contribute data on the cation binding affinity exhibited by the different sites within the channel’s selectivity filter. First, it was found that  $K^+$  caused a blue-shift and an increase in the fluorescence intensity of the KcsA fluorescence emission spectrum greater than those observed in  $Na^+$ , consistent with the occurrence of a  $K^+$ -induced change in the protein conformation (16). Second, studies using tryptophan mutants of KcsA, assigned the cation-induced fluorescence changes to the W67 and W68 residues (17), both of which are located at the short helix, with their indole side chains practically in contact with the polypeptide backbone of the channel’s selectivity filter (3,18,19). These findings support the notion derived from X-ray studies that the selectivity filter itself and/or its immediate surroundings are indeed the site(s) involved both in cation binding and in the cation-induced protein conformational changes followed by fluorescence. Third, we found that fluorescence monitoring of thermal denaturation of KcsA which includes both, the dissociation of the tetrameric protein into its subunits and their partial unfolding (17,20-22), provides an experimental observable, the  $t_m$  of the native to denatured thermal transition, ideally suited to study cation binding to the protein. Our results strongly argued for the existence of two thermodynamically different sets (high- and low-affinity) of  $K^+$  binding sites, which are associated to the non-conductive and conductive conformations of the channel selectivity filter (17,23), respectively, while only a single set of binding sites was detected for  $Na^+$ .

Apart from  $Na^+$  and  $K^+$ , there are previous structural and permeation data for other monovalent cations such as  $Li^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Rb^+$  and  $Tl^+$ , which in some regards include potassium channels other than KcsA. Interestingly, some of these cations show specific features, such as the long mean open time seen in  $Rb^+$  permeation, the two roles of  $Cs^+$

both, as a permeating and as a blocking ion, or the lack of occupancy of the S2 site in the selectivity filter by either  $\text{Rb}^+$  or  $\text{Cs}^+$ . Here we present an extensive study on the binding and permeation properties of KcsA for all the monovalent cations for which there is crystallographical information on the resulting occupation of the channel's selectivity filter. The overall objective is to correlate such structural, binding and permeation data, in an attempt to explore the extent at which ion selectivity and permeation in this model potassium channel could be explained on the basis of its ion binding features.



## RESULTS

### Cation binding to the KcsA channel

Fluorescence monitoring of thermal denaturation of KcsA (17,20-22) provides an experimental observable, the  $t_m$  of the native to denatured thermal transition, exquisitely sensitive to the presence of different concentrations of monovalent cations, which makes it ideal to study cation binding to the protein. Figure 1 illustrates the thermal denaturation profiles of KcsA in the presence of cations reported as either permeating or non-permeating species to potassium channels. These experiments, except when indicated otherwise, start with purified, detergent-solubilized KcsA in buffer containing only 1.5 mM  $\text{Na}^+$ , which is the lowest possible  $\text{Na}^+$  concentration at which wild-type KcsA still remains tetrameric and give rise to a sigmoidal denaturation transition. Also, such a low  $\text{Na}^+$  concentration guarantees the lowest possible initial occupancy of the ion binding sites, so that competition with the different cations added in the titrations to occupy such sites is minimized. Figure 1A shows that  $\text{Na}^+$  and  $\text{Li}^+$ , both of which are non-permeant species, display a similar “ $\text{Na}^+$ -like” behaviour. On the other hand,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Tl}^+$  and  $\text{Rb}^+$ , well-known permeant species, show a similar “ $\text{K}^+$ -like” pattern, characterized by a large increase in the  $t_m$  which reaches values near 100 °C (the practical limit of our thermostating system) at the concentrations used in the figure, while  $\text{Cs}^+$ , whose ability to permeate potassium channels is controversial, falls a bit short of the “ $\text{K}^+$ -like” behaviour. As an example of the cation concentration dependence of the protein thermal denaturation, Figure 1B illustrates the effects of increasing concentrations of just one of the cations used in the study,  $\text{Rb}^+$ .

Depending on the cation, titrations were conducted at a wide range of different concentrations to give rise to binding curves such as those shown in Figures 2 and 3, which demonstrates that although to a different extent, all cations tested stabilize the KcsA protein against thermal denaturation in a concentration-dependent manner. Figure 2 refers to non-permeant species such as  $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$ , which exhibit a similar behaviour in which the increase in  $t_m$  with cation concentration seemingly responds to



a simple binding event where the occupation of a single set of ion binding sites with apparent  $K_D$ 's in the millimolar range (Table I) suffices to fit the experimental data.

Titration of wild-type KcsA with typical permeant species such as  $K^+$ ,  $Rb^+$  or  $Tl^+$ , as well as those from  $Cs^+$  titration, are shown in Figure 3. It should be noticed that chloride salts have been used here for all cations, except for  $Tl^+$ , which is used as the nitrate salt because its chloride salt is poorly soluble in water.  $Tl^+$  is also a strong fluorescence collisional quencher, but at the concentrations used in these experiments, its quenching effects do not compromise too seriously the fluorescence monitoring. All the above cation species have in common that they stabilize the native state of wild-type KcsA much more effectively than the non-permeant species tested. Thus, an increase in the  $t_m$  of up to 45 °C with respect to the sample in 1.5 mM NaCl can be seen at concentrations around 30-50 mM of any of these cations (Figure 3A). Moreover, their effects on increasing the  $t_m$  of the KcsA denaturation process occur in two phases. Indeed, as shown in Figures 3B, C and D, the data fitting of the stabilization of the protein against its thermal denaturation as a function of ligand concentration, including  $Cs^+$ , suggest the existence of two thermodynamically different sets of ion binding sites, that are occupied successively as the protein becomes saturated by the cations. The first set of higher-affinity sites in the low cation concentration interval (below 1 mM for either  $K^+$ ,  $Rb^+$  or  $Tl^+$  and below 10 mM for  $Cs^+$ ) (Figure 3C) exhibits apparent  $K_D$  values in the micromolar range (Table I) and results in a  $t_m$  increase that ranges approximately 10 to 20 °C. This is followed by the occupancy of the second set of lower affinity sites at higher cation concentrations (Figure 3D), characterized by apparent  $K_D$  values in the millimolar range (Table I).

### **Cation binding to the E71A-KcsA channel mutant**

The E71A-KcsA mutant does not undergo C-type inactivation because the lack of the E71 residue disrupts the W67-E71-D80 inactivation triad that confers such property to the channel (18,23-25). Therefore, this mutant is an ideal candidate to model a channel “frozen” in a conductive conformation. Thus, cation binding experiments were

performed using the E71A-KcsA mutant as a target, to reinforce the notion that the low affinity components described above for  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Tl^+$  or  $Cs^+$ , correspond to their binding to the conductive form of KcsA. Figure 4 shows that binding data from all the cations previously showing two binding components in the wild-type channel, can now be fitted reasonably well to a single binding event, in which the high affinity component has essentially disappeared. The apparent  $K_D$  values of the remaining single binding event found in these experiments are all in the millimolar range (Table I), fairly comparable to those determined for the lower affinity binding component in the wild-type channel. Moreover, the extents of thermal stabilization observed now are also similar to those previously attributed to the occupancy by these same ions of the low affinity binding sites in wild-type KcsA.

#### **Cation permeation through the KcsA channel**

There is still a certain controversy on the permeation properties of the different cations in KcsA, particularly regarding  $Cs^+$ , which depending upon the different authors and experimental conditions, has been considered either as a permeant or a non-permeant species in KcsA (26,27) and in other potassium channels (28-32). Thus, permeation studies were carried out with all the above cations under similar experimental conditions to compare properly their permeation properties and to correlate them, if possible, with their binding features from above.  $Tl^+$  was excluded from this study because of its poor solubility in the presence of  $Cl^-$  ions, which are present in all our recording buffers, as well as in the Ag-AgCl reference electrode used for single channel current recording.

Figure 5 shows representative single-channel recordings under mono-ionic symmetrical conditions from patches of giant liposomes containing reconstituted wild-type KcsA in an inside-out configuration (see Methods for experimental details). No currents whatsoever were detected in presence of either  $Na^+$  or  $Li^+$  and therefore, the figure does not include results from these two cations. Figure 5A and B show that  $K^+$  single channel currents were much larger than  $Rb^+$  currents throughout the membrane

potential range (Table II). Regarding  $\text{Cs}^+$  single channel currents (panel C), which are also much smaller than  $\text{K}^+$  currents, we noticed that their detection required the use of higher concentrations than either  $\text{K}^+$  or  $\text{Rb}^+$ . A possible reason for this is that  $\text{Cs}^+$  currents could be too small at the lower concentration to be accurately measured, but other authors have attributed the phenomenon to a role of  $\text{Cs}^+$  as a  $\text{K}^+$  channel blocker (26,27). In our hands,  $\text{Cs}^+$  behaves as a permeant cation at the higher concentrations used here, although such condition results frequently in more unstable, difficult to seal patches. Figure 5G shows that  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$  have in common outward rectification in their I/V curves, while  $\text{Rb}^+$  presents a superlinear behavior, as reported by others (26). Most noticeable, Figure 5A to C also evidence marked differences between  $\text{K}^+$  and the other permeant cations regarding KcsA open dwelling time. Therefore, we studied the distribution of channel open times and determined the mean open time ( $\tau_{\text{open}}$ ) from bursts analysis in sufficiently long recordings, following the criteria established by Chakrapani *et al.* (33). Figure 5E to G show the results from such analysis, which yields  $\tau_{\text{open}}$  for  $\text{K}^+$  near 5 ms and an approximately 20-fold increase (91 and 100 ms) in the  $\tau_{\text{open}}$  for  $\text{Rb}^+$  and  $\text{Cs}^+$ , respectively. Longer mean open times should be indicative of lower rates of channel inactivation and indeed, the inactivation rate for  $\text{Rb}^+$  in KcsA has been reported to be 10-fold slower than that for  $\text{K}^+$  (34).

Finally, we studied the selectivity of the wild-type KcsA channel for the different cations relative to  $\text{K}^+$ . Since the non-permeant cations,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Li}^+$ , are known to block  $\text{K}^+$  currents exclusively from the cytoplasmic side (4,11,35), we decided to place the cations to be tested in the extracellular solution and 200 mM  $\text{K}^+$  in the intracellular side. Moreover, 20 mM  $\text{K}^+$  were added to the extracellular solution in order to i) ensure that the channel is in the conductive state (8,9) and ii) detect large enough currents to determine precisely the reversal potential, regardless of the contribution of the additional cations being tested. The current (reversal) potential was then introduced in the Goldman-Hodgkin-Katz equation (equation 2) to calculate the corresponding permeability ratios relative to  $\text{K}^+$  (Figure 6 and Table III). NMDG<sup>+</sup> was used as the tested cation in control experiments, yielding a reversal potential ( $-59 \pm 1$  mV) identical to that expected from just the imposed  $\text{K}^+$  concentration gradient ( $-59.2$  mV). Because of its large size, NMDG<sup>+</sup> is a non-permeant cation (31,36,37) and

therefore, the finding that it does not contribute any current, validates our reversal potential measurements. Likewise, as expected from their non-permeant behavior shown above, when 180 mM Na<sup>+</sup> or Li<sup>+</sup> were the cations to be tested, only a slight shift in the reversal potential towards more positive values were observed (-56.3 and -55.8 mV, respectively), yielding Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> permeability ratios of 0.013 and 0.016, respectively (Figure 6B and C). When 180 mM Cs<sup>+</sup> was tested under these bi-ionic conditions, we only observed outward K<sup>+</sup> currents at positive potentials, but no inward currents were detected. Again, this latter feature of Cs<sup>+</sup> has been noticed by others (26,27) and has been attributed to the blockade of K<sup>+</sup> currents by external Cs<sup>+</sup>. Nonetheless, as in Figure 5, doubling the concentrations of all ions involved, i.e., 400 mM KCl in the intracellular solution versus 360 mM CsCl and 40 mM KCl in the extracellular solution, results in both inward and outward currents (Figure 6D) and in a pronounced shift in the I/V curve, yielding a reversal potential of -5 mV and a Cs<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> permeability ratio of 0.8. Finally, 180 mM Rb<sup>+</sup> in the extracellular solution give rise to currents at all potentials (Figure 6E) and shifts even further the reversal potential to -3.2 mV, yielding a Rb<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> permeability ratio of 0.9.

The above results indicate that KcsA does not display a marked preference for K<sup>+</sup> over other permeant cations such as Rb<sup>+</sup> or Cs<sup>+</sup> (i.e., the selectivity is low among permeant cations), but selects K<sup>+</sup> with high accuracy when confronted to the non-permeant Na<sup>+</sup> or Li<sup>+</sup>. Thus, the permeability sequence under bi-ionic conditions in our experimental system is: K<sup>+</sup>(1) > Rb<sup>+</sup>(0.9) > Cs<sup>+</sup>(0.8) >>> Li<sup>+</sup>(0.02) > Na<sup>+</sup>(0.01) , which grossly coincides with that reported previously in KcsA (26,38) and also, with the apparent exception of Cs<sup>+</sup>, with an additional report on KcsA (27) and with several others on eukaryotic potassium channels (39-41).

## DISCUSSION

This work explores the extent at which ion selectivity and permeation properties of a model potassium channel, KcsA, could be explained on the basis of its ion binding features. Patch-clamp studies on the relative selectivity exhibited by wild-type KcsA for different monovalent cations versus  $K^+$ , reveal that the channel selects  $K^+$  with high accuracy when confronted to non-permeant cations, either  $Na^+$  or  $Li^+$ , but it does not display a marked preference for  $K^+$  over other permeant cations such as  $Rb^+$  or  $Cs^+$ . These two categories of permeant and non-permeant cations defined by their similar relative permeabilities with respect to  $K^+$ , correlate with those established from the observed binding of these cations to the channel's selectivity filter. Thus, the non-permeant cations  $Na^+$  or  $Li^+$ , bind with low affinity (similar  $K_D$ 's for both cations in the millimolar range) to a single set of channel sites, while permeant cations  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Tl^+$  or  $Cs^+$ , bind to two thermodynamically different sets of sites, that are occupied successively as the protein becomes saturated by the cations. The first set of higher-affinity sites exhibit  $K_D$ 's in the micromolar range, fairly similar for all permeant cations, while the second set of lower affinity sites have apparent  $K_D$  values all in the millimolar range.

The available X-ray crystallographic data on KcsA in the presence of different cations allow for the assignment of the sets of binding sites detected in our ion binding experiments to the reported stack of sites present in the channel's selectivity filter (Figure 7). As shown in Figure 7A,  $Na^+$  was found at positions equivalent to the potassium S1 and S4 sites within the filter, to yield a non-conductive channel conformation with an average occupancy of one  $Na^+$  per filter at a given time (10). Therefore, these sites in the X-ray structure should account for the set of low affinity sites detected for binding of the non-permeant cations  $Na^+$  or  $Li^+$ . Likewise, still in a non-conductive conformation, the S1 and S4 sites can be occupied by  $K^+$  under conditions of low  $K^+$  concentration (Figure 7B), with an average occupancy of just one  $K^+$  distributed between those two sites (8). This suggests that the S1 and S4 sites correspond also to the set of high affinity binding sites detected in our experiments for all permeant cations. In other words, the S1 and S4 sites in non-conductive channel

states could be occupied indistinctively by either permeant or non-permeant cations but, given the almost three orders of magnitude higher affinity of the former, permeant cations should easily displace the non-permeant ones from those sites under competition conditions.

X-ray structures drawn in Figures 7C to F show that as the concentration of permeant cations increases above a certain threshold, a second ion goes into the middle of the filter (sites S2 or S3) and a change in conformation to a conductive state occurs, which has an average occupation of two permeant ions per channel (8,9). This indicates that upon the conformational change to the conductive channel conformation, the entire S1 through S4 stack of sites in the selectivity filter accounts for the set of lower affinity sites detected in our cation binding experiments. This is further confirmed by the observation that binding of all permeant cations to a “frozen” conductive conformation provided by the E71A-KcsA mutant channel shows only a single, low affinity component (Figure 4 and Table I). Therefore, low affinity binding of permeant cations seems important to allow permeation through the pore in the conductive state, although it would not guarantee selectivity, which should partly arise from the high affinity binding of such cations to the non-conductive channel state, thus, determining much of the channel selectivity properties just on the basis of cation binding features.

Nonetheless, it should be noticed that while  $K^+$  and  $Tl^+$  (Figures 7C and D, respectively) may access to either one of the S2 and S3 sites in the conductive state, the other two permeant cations  $Rb^+$  and  $Cs^+$  have access only to the S3 site (Figures 7E and F, respectively). Such differences in the occupation of the available sites within the selectivity filter have several implications. First, because all permeant cations at a given concentration induce the transition from non-conductive to conductive channel states (8,9), it should be concluded that S3 occupancy is a necessary and sufficient condition for the conformational change to occur. This is in contrast with predictions from simulation studies based in molecular dynamics , which pointed out to S2 site occupancy to play such role (12). Second, the lack of occupation by  $Rb^+$  and  $Cs^+$  of the S2 site should poses a serious energetic barrier to the flow of these ions through the

channel. This might be related to the large differences exhibited by these permeant ions with respect to  $K^+$  in single channel properties, such as channel conductance or mean open time (Figure 6 and Table III). This hypothesis was elaborated previously by MacKinnon's group, which attributed the much more efficient flow of  $K^+$  to the energetic similarity between the S1-S3 and the S2-S4 configurations of the  $K^+$ -bound channel (7). Such an electrostatic balance becomes distorted when the channel is occupied by other permeant cations such as  $Rb^+$ , and perhaps  $Cs^+$ , which find a large energetic barrier to ion flow because they cannot bind the S2 site. Moreover, occupancy of the S2 site seems critical to confer the channel the ability to inactivate (42-44), which is consistent with the much longer mean open times shown here for  $Rb^+$  or  $Cs^+$ . Alternatively, other authors attributed the differences in  $K^+$  and  $Rb^+$  permeation in certain eukaryotic channels to hypothetical affinity differences between these cations (45-47), but this seems unlikely to be case here, as the binding affinities have been found to be practically identical.

In conclusion, cation binding features exhibited by the KcsA channel seem to explain, at least partly, its ability to select permeant *versus* non-permeant cations, as well to undergo a conformational transition from a non-conductive to a conductive state, which is believed to constitute the basis of channel gating (16,48). Conversely, the dependence of the channel's permeability properties seems much more complex, cannot be explained solely on the basis of cation binding properties and is likely related to the ability of  $K^+$  and  $Tl^+$  to occupy both, the inner S2 and S3 sites, while  $Rb^+$  and  $Cs^+$  have access only to the latter. Finally, as a word of caution, it should also be noticed that the comparison of data from the different experimental approaches is often intrinsically limited. For instance both, cation binding and crystallography experiments are done under equilibrium conditions in which, additionally, cations have simultaneous access to both ends of the channel's selectivity filter. On the contrary, electrophysiological measurements have an obvious kinetic dependence and a defined directionality for ion flow to occur. In spite of these limitations, it seems remarkable that complex channel properties such as their selectivity for specific ions can be explained, at least partly, on the basis of simple and straightforward ion binding experiments.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Purification of channel proteins

The E71A-KcsA mutant was obtained through site-directed mutagenesis, using the wild-type gene as a template (23). The wild-type KcsA and the mutant channel, both with an added N-terminal hexahistidine tag, were expressed in *Escherichia coli* M15 (pRep4) cells and purified by affinity chromatography on Ni<sup>2+</sup>-Sepharose (GE Healthcare) (21). The wild-type protein stock at 70-80  $\mu\text{M}$  was finally dissolved in 20 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 5 mM DDM (Calbiochem) and 100 mM NaCl. The E71A mutant channel stock was prepared similarly, except that the final buffer contained 100 mM KCl instead of the NaCl used for the wild-type protein (23).

Protein concentrations were determined from the absorbance at 280 nm, using a molar extinction coefficient of  $34,950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (49). Tetramer integrity of the channel proteins was routinely checked by SDS-PAGE in 13.5% polyacrylamide gels (50). All the referred salts and buffers were purchased from Sigma-Aldrich.

### Fluorescence monitoring of cation binding

Fluorescence emission spectra were taken in a SLM 8000 spectrofluorometer, using 0.5 cm path-length quartz cuvettes, as described previously (16). Thermal denaturation of detergent (DDM)-solubilized KcsA in the presence of increasing concentration of the different cations, was performed in a Varian Cary Eclipse spectrofluorometer by monitoring the temperature dependence of the protein intrinsic fluorescence emission at 340 nm after excitation at 280 nm. The temperature up-scan rate was  $0.6 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  (17,22,23). Batteries of samples were prepared from the protein stock to a final  $1 \mu\text{M}$  KcsA, 1.5 mM NaCl and 5 mM DDM in 20 mM Hepes buffer and 5 mM NMDG<sup>+</sup>, so that the pH was 7.0. Aliquots from cation stock solutions were also added into these samples to provide the desired range of final concentrations of each of the cations to be tested. For Li<sup>+</sup> titrations, as different from the rest, the protein stock was previously dialyzed against buffer containing 100 mM LiCl and further diluted so that the initial Li<sup>+</sup>



concentration for the titrations was 4.5 mM, under otherwise identical conditions. Both, 1.5 mM Na<sup>+</sup> and 4.5 mM Li<sup>+</sup> are the lowest concentrations of such cations at which wild-type KcsA still remains tetrameric.

When titrating the E71A-KcsA channel, we proceeded similarly but the mutant protein stock was previously dialyzed against buffers containing 100 mM of either KCl, RbCl, CsCl or TlNO<sub>3</sub>, and further diluted so that the starting point of the ion titrations was the minimum salt concentration in which the  $t_m$  could be properly determined, i.e. 1.5 mM KCl, 1.5 mM RbCl, 2.5 mM CsCl and 1.5 mM TlNO<sub>3</sub>.

The midpoint temperature of the thermally-induced protein denaturation process ( $T_m$ ) at the different cation concentrations was calculated from the thermal denaturation curves by fitting the data to a two-state unfolding model, assuming a linear dependence of the pre- and post-transition baselines on temperature (51). The concentration-dependent increase in the  $T_m$  was used to estimate the dissociation constant,  $K_D$ , of the protein–ligand (cation) complex using the following equation:

$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{T_m - (T_m)_0}{T_m} = \frac{R \cdot (T_m)_0}{\Delta H_0} \cdot \ln \left[ 1 + \frac{[L]}{K_D} \right] \quad \text{Equation 1}$$

where  $T_m$  and  $(T_m)_0$  refer to the denaturation temperature (in Kelvin) for the protein in the presence and absence of added ligand, respectively,  $R$  is the gas constant and  $\Delta H_0$  is the enthalpy change upon protein denaturation in the absence of added ligand (17,23).

### Reconstitution of KcsA into Asolectin Lipid Vesicles

The required amount of asolectin lipids (L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine, Soy PC, Avanti Polar Lipids) was dissolved in chloroform:methanol (2:1, by volume) and the solvents removed using a rotary evaporator and vacuum overnight. The dried lipid film was

hydrated at 5 mg/ml in 10 mM HEPES buffer, pH7.0, containing 100 mM KCl, bath-sonicated to homogeneity and stored in liquid nitrogen.

For protein reconstitution, asolectin vesicles from above were solubilized in DDM at a 0.8 detergent/lipid molar ratio and mixed with purified DDM-solubilized KcsA at 100,000:1 lipid to protein molar ratio. The mixture was incubated for 1 hour at room temperature and the detergent removed by Bio-Beads SM-2 (Bio-Rad laboratories) as described previously (52). After discarding the Bio-Beads, the resulting protein-containing reconstituted vesicles were collected by centrifugation (60 minutes at 300,000xg) and the pellet suspended in 10 mM HEPES, pH7.0, 100 mM KCl to a lipid concentration of 0.3 mg/ $\mu$ l. Samples were stored at -80 °C.

Multilamellar giant liposomes (up to 50–100  $\mu$ m in diameter) were prepared by submitting the asolectin reconstituted protein to a cycle of partial dehydration/rehydration, as reported previously (53,54).

### **Single-Channel Recordings in Reconstituted Giant Liposomes and data analysis**

Patch clamp recordings were performed on excised, inside-out patches from the giant liposomes from above using an EPC-10 amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht/Pfalzt, Germany), at a gain of 50 mV/pA (23,53,55). Currents were recorded using either a conventional patch clamp system, as reported previously (23,53), or a Port-a-Patch system with external perfusion (Nanion Technologies, Germany). In the latter case, NPC-1 borosilicate glass chips (Nanion Technologies, Germany) with resistances of 3-5 M $\Omega$  were used. Negative pressure (-5 to -25 mBar) was applied to place a vesicle on the chip aperture to form a planar lipid bilayer (56). After a stable seal was formed, the remaining liposomes were washed away with the corresponding intracellular buffer.

Data were digitized at a sampling rate of 10 kHz or 40 kHz (when recording continuous pulses at +150 mV), low-pass filtered to 2 or 8 kHz (Bessel filter, HEKA amplifier), respectively, and analyzed with Clampfit10.3 (Molecular Devices, Axon

Instruments). An Ag-AgCl wire was used as the reference electrode. All measurements were taken at room temperature, with the extracellular solution containing 10 mM HEPES buffer, pH 7, and the intracellular solution 10 mM MES buffer, pH 4, containing in both cases the indicated concentrations of the different salts.

Single-channel activity was measured under symmetrical concentrations of different monovalent cations ( $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Na^+$  or  $Li^+$ ) to assess ion permeation. We determined the mean slope and chord conductances at +150 mV and -150 mV from the I-V curve of each permeant ion. Continuous recordings at +150 mV were used to study the open dwell-time distributions for these cations with the program QuB ([www.gub.buffalo.edu](http://www.gub.buffalo.edu)), as described by Chakrapani and coworkers (33).

Reversal potentials were determined under bi-ionic conditions in order to obtain the permeability ratios relative to  $K^+$ ,  $P_{X^+}/P_{K^+}$ , from the Goldman-Hodgkin-Katz equation (2)

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_o + P_X \cdot [X]_o}{P_{K^+} \cdot [K^+]_i + P_X \cdot [X]_i} \quad \text{Equation 2}$$

where  $E_{rev}$  is the calculated reversal potential (zero-current potential), R the gas constant, T the temperature (297 K), F the Faraday constant,  $[K^+]_o$  and  $[K^+]_i$  are the extracellular and intracellular  $K^+$  concentrations, respectively, and  $[X^+]_o$  and  $[X^+]_i$  refer to extracellular and intracellular concentrations of the corresponding cation, respectively. Liquid junction potentials between the pipette and bath solutions were calculated by using Clampex 10.3 (Molecular Devices, Axon Instruments) and routinely corrected.

Different controls were performed in the patches in order to properly identify KcsA activity and orientation. These include washing with solutions at neutral pH or addition of the classic potassium channel blocker TBA. Although the high lipid to protein ratios used to form the giant liposomes increases greatly the probability of finding patches containing only single channel activity from KcsA in an outside-out orientation, those

recordings with erratic baselines, high levels of noise or activity coming from several channels were discarded from further analysis.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work has been partly supported by grants BFU2012-31359 and BFU2015-66612-P from the Spanish MINECO/FEDER, UE. We are indebted to Professor Dr. Javier Gómez for his help with the analysis of binding data.

**CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no competing financial interest.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

EM and MLR contributed equally to design the experimental approaches and to redefine the objectives of the study as it evolved with time. EM and MLR also performed all the experiments and analyzed the data. AMC participated in different stages of the study, performed some of the experiments and provided an analysis of the data. JAP, AFC and AM were the main supervisors of different parts of the work, analyzed the data and provided a critical discussion on the results. JMGR defined the initial goals of the study, coordinated the work and wrote the paper. All authors participated jointly in the final analysis and discussion of the data and approved the final version of the manuscript.

## REFERENCES

1. Ashcroft, F. M. (1999) *Ion Channels and Disease*, Elsevier Science.,
2. Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed., Sinauer Associates, Inc.,
3. Doyle, D. A.; Morais, C. J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280** (5360), 69-77
4. Heginbotham, L.; LeMasurier, M.; Kolmakova-Partensky, L.; Miller, C. (1999) Single streptomyces lividans K(+) channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol* **114** (4), 551-560
5. Gao, L.; Mi, X.; Paajanen, V.; Wang, K.; Fan, Z. (2005) Activation-coupled inactivation in the bacterial potassium channel KcsA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102** (49), 17630-17635
6. Hoshi, T.; Zagotta, W. N.; Aldrich, R. W. (1991) Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* **7** (4), 547-556
7. Morais-Cabral, J. H.; Zhou, Y.; MacKinnon, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* **414** (6859), 37-42
8. Zhou, Y.; Morais-Cabral, J. H.; Kaufman, A.; MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414** (6859), 43-48
9. Zhou, Y.; MacKinnon, R. (2003) The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* **333** (5), 965-975
10. Lockless, S. W.; Zhou, M.; MacKinnon, R. (2007) Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K<sup>+</sup> channel. *PLoS. Biol.* **5** (5), e121
11. Thompson, A. N.; Kim, I.; Panosian, T. D.; Iverson, T. M.; Allen, T. W.; Nimigean, C. M. (2009) Mechanism of potassium-channel selectivity revealed by Na(+) and Li(+) binding sites within the KcsA pore. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (12), 1317-1324

12. Berneche, S.; Roux, B. (2005) A gate in the selectivity filter of potassium channels. *Structure*. **13** (4), 591-600
13. Grabe, M.; Bichet, D.; Qian, X.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. (2006) K<sup>+</sup> channel selectivity depends on kinetic as well as thermodynamic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103** (39), 14361-14366
14. Fowler, P. W.; Tai, K.; Sansom, M. S. (2008) The selectivity of K<sup>+</sup> ion channels: testing the hypotheses. *Biophys. J.* **95** (11), 5062-5072
15. Lockless, S. W. (2015) Determinants of cation transport selectivity: Equilibrium binding and transport kinetics. *J. Gen. Physiol* **146** (1), 3-13
16. Renart, M. L.; Barrera, F. N.; Molina, M. L.; Encinar, J. A.; Poveda, J. A.; Fernandez, A. M.; Gomez, J.; Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Effects of conducting and blocking ions on the structure and stability of the potassium channel KcsA. *J. Biol. Chem.* **281** (40), 29905-29915
17. Renart, M. L.; Triano, I.; Poveda, J. A.; Encinar, J. A.; Fernandez, A. M.; Ferrer-Montiel, A. V.; Gomez, J.; Gonzalez Ros, J. M. (2010) Ion binding to KcsA: implications in ion selectivity and channel gating. *Biochemistry* **49** (44), 9480-9487
18. Cordero-Morales, J. F.; Cuello, L. G.; Zhao, Y.; Jogini, V.; Cortes, D. M.; Roux, B.; Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13** (4), 311-318
19. Shealy, R. T.; Murphy, A. D.; Ramarathnam, R.; Jakobsson, E.; Subramaniam, S. (2003) Sequence-function analysis of the K<sup>+</sup>-selective family of ion channels using a comprehensive alignment and the KcsA channel structure. *Biophys. J.* **84** (5), 2929-2942
20. Heginbotham, L.; Odessey, E.; Miller, C. (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* **36** (33), 10335-10342
21. Molina, M. L.; Encinar, J. A.; Barrera, F. N.; Fernandez-Ballester, G.; Riquelme, G.; Gonzalez-Ros, J. M. (2004) Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* **43** (47), 14924-14931
22. Triano, I.; Barrera, F. N.; Renart, M. L.; Molina, M. L.; Fernandez-Ballester, G.; Poveda, J. A.; Fernandez, A. M.; Encinar, J. A.; Ferrer-Montiel, A. V.; Otzen, D.; Gonzalez-Ros, J. M. (2010) Occupancy of nonannular lipid

- binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry* **49** (25), 5397-5404
23. Renart, M. L.; Montoya, E.; Fernandez, A. M.; Molina, M. L.; Poveda, J. A.; Encinar, J. A.; Ayala, J. L.; Ferrer-Montiel, A. V.; Gomez, J.; Morales, A.; Gonzalez Ros, J. M. (2012) Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel. *Biochemistry* **51** (18), 3891-3900
  24. Cheng, W. W.; McCoy, J. G.; Thompson, A. N.; Nichols, C. G.; Nimigean, C. M. (2011) Mechanism for selectivity-inactivation coupling in KcsA potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108** (13), 5272-5277
  25. Cordero-Morales, J. F.; Jogini, V.; Lewis, A.; Vasquez, V.; Cortes, D. M.; Roux, B.; Perozo, E. (2007) Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (11), 1062-1069
  26. LeMasurier, M.; Heginbotham, L.; Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol* **118** (3), 303-314
  27. Zakharian, E.; Reusch, R. N. (2004) *Streptomyces lividans* potassium channel KcsA is regulated by the potassium electrochemical gradient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316** (2), 429-436
  28. Cecchi, X.; Wolff, D.; Alvarez, O.; Latorre, R. (1987) Mechanisms of Cs<sup>+</sup> blockade in a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from smooth muscle. *Biophys. J.* **52** (5), 707-716
  29. Cukierman, S.; Yellen, G.; Miller, C. (1985) The K<sup>+</sup> channel of sarcoplasmic reticulum. A new look at Cs<sup>+</sup> block. *Biophys. J.* **48** (3), 477-484
  30. Hille, B. (1973) Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations. *J. Gen. Physiol* **61** (6), 669-686
  31. Melishchuk, A.; Armstrong, C. M. (2001) Mechanism underlying slow kinetics of the OFF gating current in Shaker potassium channel. *Biophys. J.* **80** (5), 2167-2175
  32. Thompson, G. A.; Leyland, M. L.; Ashmole, I.; Sutcliffe, M. J.; Stanfield, P. R. (2000) Residues beyond the selectivity filter of the K<sup>+</sup> channel kir2.1 regulate permeation and block by external Rb<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup>. *J. Physiol* **526 Pt 2**, 231-240



33. Chakrapani, S.; Cordero-Morales, J. F.; Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents. *J. Gen. Physiol* **130** (5), 479-496
34. Chakrapani, S.; Cordero-Morales, J. F.; Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating I: macroscopic currents. *J. Gen. Physiol* **130** (5), 465-478
35. Nimigean, C. M.; Miller, C. (2002) Na<sup>+</sup> block and permeation in a K<sup>+</sup> channel of known structure. *J. Gen. Physiol* **120** (3), 323-335
36. Chen, F. S.; Steele, D.; Fedida, D. (1997) Allosteric effects of permeating cations on gating currents during K<sup>+</sup> channel deactivation. *J. Gen. Physiol* **110** (2), 87-100
37. Wang, Z.; Zhang, X.; Fedida, D. (1999) Gating current studies reveal both intra- and extracellular cation modulation of K<sup>+</sup> channel deactivation. *J. Physiol* **515 ( Pt 2)**, 331-339
38. Meuser, D.; Splitt, H.; Wagner, R.; Schrempf, H. (1999) Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* **462** (3), 447-452
39. Chao, C. C.; Huang, C. C.; Kuo, C. S.; Leung, Y. M. (2010) Control of ionic selectivity by a pore helix residue in the Kv1.2 channel. *J. Physiol Sci.* **60** (6), 441-446
40. Wischmeyer, E.; Doring, F.; Karschin, A. (2000) Stable cation coordination at a single outer pore residue defines permeation properties in Kir channels. *FEBS Lett.* **466** (1), 115-120
41. Loffler, K.; Hunter, M. (1997) Cation permeation and blockade of ROMK1, a cloned renal potassium channel. *Pflugers Arch.* **434** (2), 151-158
42. Devaraneni, P. K.; Komarov, A. G.; Costantino, C. A.; Devereaux, J. J.; Matulef, K.; Valiyaveetil, F. I. (2013) Semisynthetic K<sup>+</sup> channels show that the constricted conformation of the selectivity filter is not the C-type inactivated state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **110** (39), 15698-15703
43. Matulef, K.; Komarov, A. G.; Costantino, C. A.; Valiyaveetil, F. I. (2013) Using protein backbone mutagenesis to dissect the link between ion occupancy and C-type inactivation in K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **110** (44), 17886-17891

44. Matulef, K.; Annen, A. W.; Nix, J. C.; Valiyaveetil, F. I. (2016) Individual Ion Binding Sites in the K(+) Channel Play Distinct Roles in C-type Inactivation and in Recovery from Inactivation. *Structure*. **24** (5), 750-761
45. Eisenman, G.; Latorre, R.; Miller, C. (1986) Multi-ion conduction and selectivity in the high-conductance Ca<sup>++</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from skeletal muscle. *Biophys. J.* **50** (6), 1025-1034
46. Ashcroft, F. M.; Kakei, M.; Kelly, R. P. (1989) Rubidium and sodium permeability of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in single rat pancreatic beta-cells. *J. Physiol* **408**, 413-429
47. Demo, S. D.; Yellen, G. (1992) Ion effects on gating of the Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel correlate with occupancy of the pore. *Biophys. J.* **61** (3), 639-648
48. VanDongen, A. M. (2004) K channel gating by an affinity-switching selectivity filter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101** (9), 3248-3252
49. Pace, C. N.; Scholtz, J. M. (1997) *Protein Structure: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, U.K.
50. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680-685
51. Sehgal, P.; Otzen, D. E. (2006) Thermodynamics of unfolding of an integral membrane protein in mixed micelles. *Protein Sci.* **15** (4), 890-899
52. Giudici, A. M.; Molina, M. L.; Ayala, J. L.; Montoya, E.; Renart, M. L.; Fernandez, A. M.; Encinar, J. A.; Ferrer-Montiel, A. V.; Poveda, J. A.; Gonzalez-Ros, J. M. (2013) Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: relative abundance and interactions involved. *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (2), 193-200
53. Molina, M. L.; Barrera, F. N.; Fernandez, A. M.; Poveda, J. A.; Renart, M. L.; Encinar, J. A.; Riquelme, G.; Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model. *J. Biol. Chem.* **281** (27), 18837-18848
54. Riquelme, G.; Lopez, E.; Garcia-Segura, L. M.; Ferragut, J. A.; Gonzalez-Ros, J. M. (1990) Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels. *Biochemistry* **29** (51), 11215-11222

55. Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391** (2), 85-100
56. Kreir, M.; Farre, C.; Beckler, M.; George, M.; Fertig, N. (2008) Rapid screening of membrane protein activity: electrophysiological analysis of OmpF reconstituted in proteoliposomes. *Lab Chip.* **8** (4), 587-595



**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1:** Fluorescence monitoring of thermal denaturation of wt-KcsA. All experiments were performed at a protein concentration of 1  $\mu\text{M}$  in 20 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 5 mM DDM and the indicated concentrations of the different cations (panel A) or increasing concentrations of RbCl (panel B; from left to right: 0.1, 1, 10 and 50 mM, respectively).

**Figure 2:** Dependence of the wt-KcsA thermal stability on the concentration of non-permeant cations ( $\text{Na}^+$  and  $\text{Li}^+$ ). In this and all other related Figures, each of the  $t_m$  values plotted as in panel A, comes from thermal denaturation profiles equivalent to those shown in Figure 1. Titrations covering a wide range of concentrations of either NaCl or LiCl were conducted as described under Methods, on wt-KcsA samples containing either 1.5 mM  $\text{Na}^+$  or 4.5 mM  $\text{Li}^+$ , respectively, as the lowest concentrations of those cations for the titrations. Results are presented as the average  $t_m$  (in Celsius)  $\pm$  SD from at least three independent titrations. Panel B: Fitting of the experimental data from panel A to Equation 1 (see Methods).

**Figure 3:** Dependence of the wt-KcsA thermal stability on the concentration of permeant cations ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  or  $\text{Tl}^+$ ). Titrations covering the widest possible range of concentrations for all permeant cations (i.e., those increasing the  $t_m$  up to values near the thermostating limit of our circulating water bath) were conducted on wt-KcsA samples containing 1.5 mM  $\text{Na}^+$  as the starting point in the titrations (see Methods) and increasing concentrations of the indicated permeant cations (Panel A). Results are shown as the average  $t_m \pm$  SD from at least three independent experiments. Fitting of the experimental data from panel A to Equation 1 fails when taking into account the whole titration curve (i.e., when assuming a single set of binding sites) (Panel B), but it accounts reasonably well for the experimental results when the low (panel C) or high (panel D) concentration ranges are analyzed independently, that is, assuming two different sets of binding sites.

**Figure 4:** Dependence of the thermal stability of the mutant E71A-KcsA channel on the concentration of permeant cations ( $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  or  $Tl^+$ ). In Panel A, titration experiments were conducted as in Figure 2, except that the E71A-KcsA stock solutions were previously dialyzed against buffers containing either KCl, RbCl, CsCl or  $TlNO_3$  (see Methods). Titrations started at the minimum concentration of each of the cations at which the mutant channel retains its tetrameric quaternary structure. Results are shown as  $t_m \pm SD$  from at least three independent experiments. Panel B shows the fitting of experimental data from panel A to Equation 1.

**Figure 5:** Cation permeation under mono-ionic conditions through wild-type KcsA reconstituted in asolectin giant liposomes. Panels A to C show representative patch-clamp recordings at +150 (above) and -150 mV (below) attained in symmetrical concentrations of 200 mM KCl (A); 200 mM RbCl (B); 400 mM CsCl (C). Averaged I-V curves from at least 5 seals are shown in panel D.  $Rb^+$  and  $Cs^+$  zoomed-in curves are shown for clarity in the inset. Panels E to G show KcsA open-dwelling time distributions from burst analysis of long (60 seconds) recordings at +150 mV.

**Figure 6:** wt- KcsA channel permeability under bi-ionic conditions relative to  $K^+$ . Panels A to E are characteristic KcsA single channel currents obtained, at the indicated potentials, when recording under bi-ionic conditions. The intracellular solution in panels A, B, C and E contained 200 mM KCl, while the extracellular solution contained 20 mM KCl and 180 mM of the cation to be tested:  $NMDG^+$  (A),  $Na^+$  (B),  $Li^+$  (C) or  $Rb^+$  (E). Such salt concentrations were doubled to determine  $Cs^+/K^+$  selectivity (panel D). Panel F shows the average I-V curves under the indicated conditions. Each point is the average of, at least, three different seals.

**Figure 7:** X-Ray structures of the selectivity filter of wild-type KcsA in non-conductive (panels A and B) or conductive (panels C to F) conformations, showing the ion occupancy resulting from the presence of high  $Na^+$  concentration (panel A, PDB entry 2ITC), low  $K^+$  (B, PDB entry 1K4D), high  $K^+$  (C, PDB entry 1K4C), high  $Tl^+$  (D, PDB entry 1R3J), high  $Rb^+$  (E, PDB entry 1R3I) or high  $Cs^+$  (F, PDB entry 1R3L). W67 and 68, the tryptophan residues closest to the selectivity filter, are depicted in green only in panel

C. S1 to S4 sites in the selectivity filter refers to the originally reported  $K^+$  binding sites or to equivalent positions when in the presence of other cations.



## TABLES

**TABLE I. Ion binding to wild-type and E71A KcsA channels as estimated from thermal denaturation assays**

Target channel	Tested cations	Sets of binding sites detected	$K_D$ (M) <sup>(a)</sup>
<b>wt-KcsA</b>			
	Li <sup>+</sup>	1	$(9.6 \pm 0.6) \times 10^{-3}$
	Na <sup>+</sup>	1	$(3.3 \pm 0.5) \times 10^{-3}$
	K <sup>+</sup>	2	$(1.9 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ $(2.5 \pm 0.5) \times 10^{-3}$
	Rb <sup>+</sup>	2	$(4.0 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ $(3.4 \pm 0.4) \times 10^{-3}$
	Cs <sup>+</sup>	2	$(37.1 \pm 3.2) \times 10^{-6}$ $(15 \pm 1) \times 10^{-3}$
	Tl <sup>+</sup>	2	$(9.7 \pm 1.4) \times 10^{-6}$ $(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$
<b>E71A-KcsA</b>			
	K <sup>+</sup>	1	$(3.5 \pm 0.5) \times 10^{-3}$
	Rb <sup>+</sup>	1	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
	Cs <sup>+</sup>	1	$(7.1 \pm 0.4) \times 10^{-3}$
	Tl <sup>+</sup>	1	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^{-3}$

<sup>(a)</sup>  $K_D$  was calculated by fitting the average of at least three independent titrations covering a wide range of cation concentrations (see Figures 2, 3 and 4) to Equation 1 (see Methods). Each value represents the  $K_D \pm$  (SD).

**Table II. Ion permeation features of the wt-KcsA channel <sup>(a)</sup>**

Permeant cation	Mean slope conductance (pS)	Chord conductance +150 mV (pS)	Chord Conductance -150 mV (pS)	Mean Open time (ms)
200 mM K <sup>+</sup>	51 ± 3	45 ± 3	34 ± 3	5 ± 2
200 mM Rb <sup>+</sup>	7 ± 1	16.4 ± 0.6	3.9 ± 0.6	91 ± 11
400 mM Cs <sup>+</sup> <sup>(b)</sup>	9.0 ± 0.5	8.0 ± 0.6	7.2 ± 0.7	99 ± 23

<sup>(a)</sup> Ion permeation parameters were obtained from patch-clamp recordings under symmetrical concentration of permeant cations, as shown in Fig.5. Each value represents the mean ± SD from at least five independent experiments.

<sup>(b)</sup> Noticed that in order to detect channel openings, Cs<sup>+</sup> concentration was twice that used to measure K<sup>+</sup> or Rb<sup>+</sup> currents.

**Table III. Reversal potentials and permeability ratios relative to K<sup>+</sup> in wt KcsA <sup>(a)</sup>**

Challenging cation	E <sub>rev</sub> (mV)	P <sub>x</sub> <sup>+</sup> / P <sub>K</sub> <sup>+</sup>
NMDG <sup>+</sup>	-59.2 ± 1.3	≈0
Na <sup>+</sup>	-56.3 ± 0.3	0.013 ± 0.002
Li <sup>+</sup>	-55.8 ± 0.1	0.016 ± 0.001
Cs <sup>+</sup>	-5.0 ± 1.1	0.80 ± 0.04
Rb <sup>+</sup>	-3.2 ± 0.1	0.87 ± 0.01

<sup>(a)</sup> Experiments were carried out under bi-ionic conditions using 200 mM K<sup>+</sup> in the intracellular solution and 20 mM K<sup>+</sup> and 180 mM of the tested cation in the extracellular solution. The theoretical reversal potential considering K<sup>+</sup> as the only permeant specie is -59.2 mV (Nernst equation). Each value represents the mean ± SD from at least three independent experiments.



## FIGURES

FIGURE 1

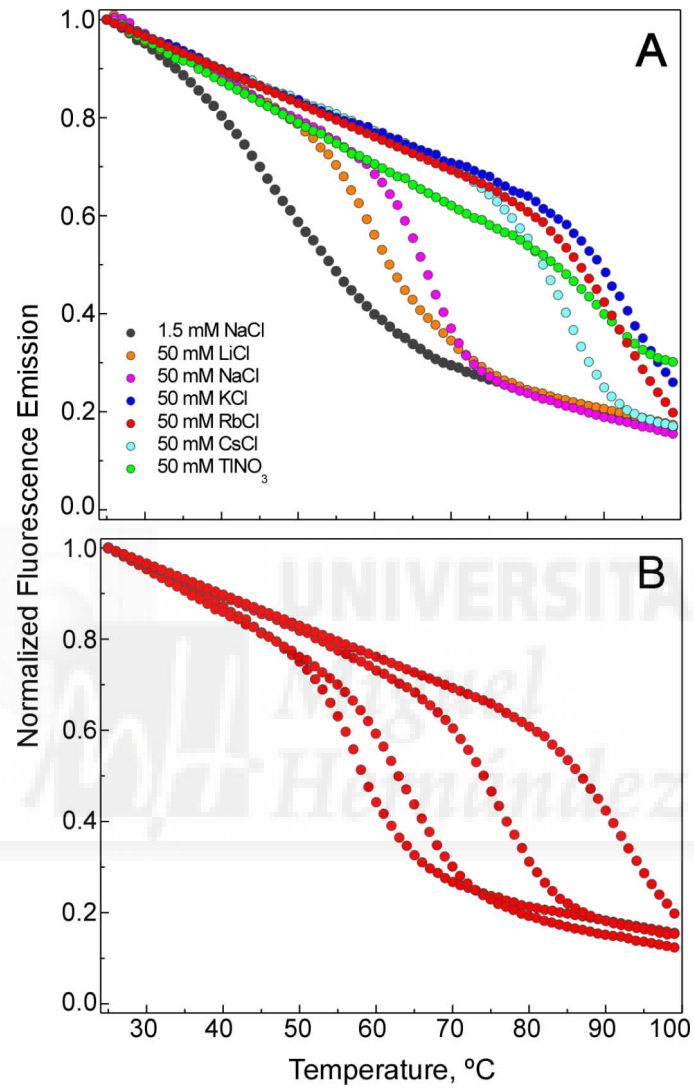


FIGURE 2

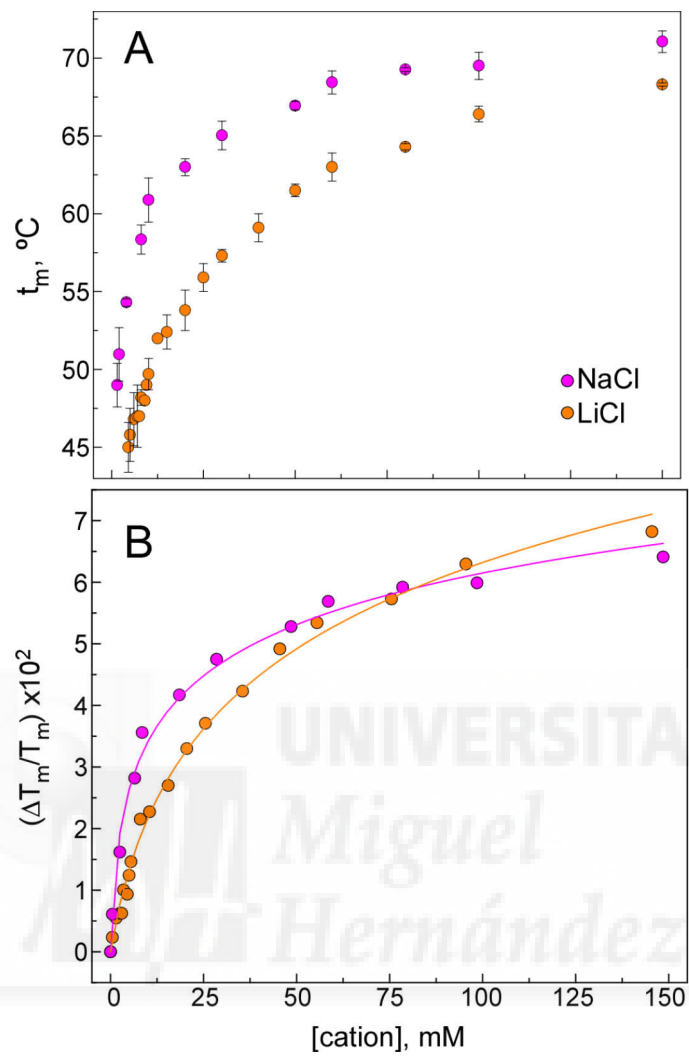


FIGURE 3

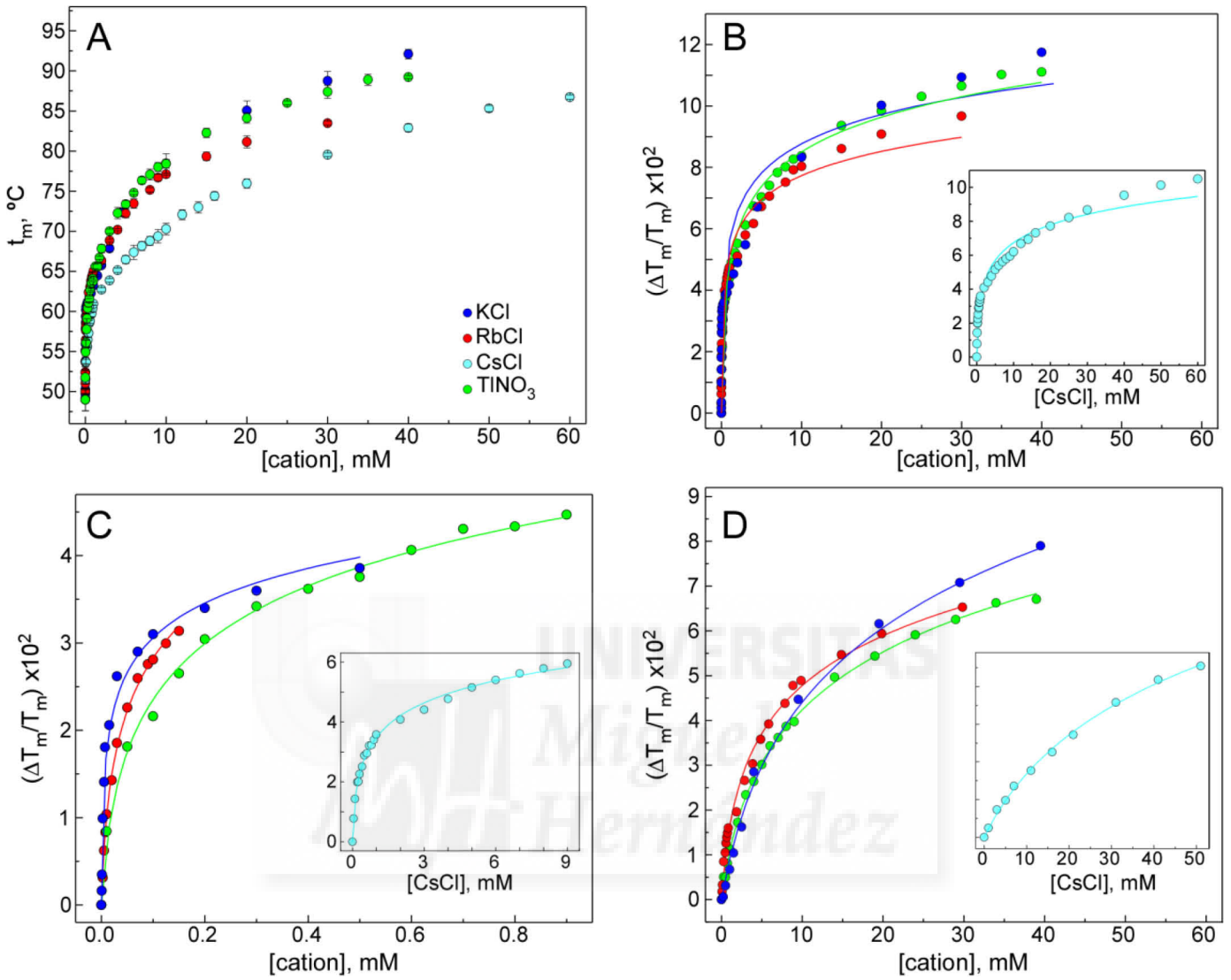


FIGURE 4

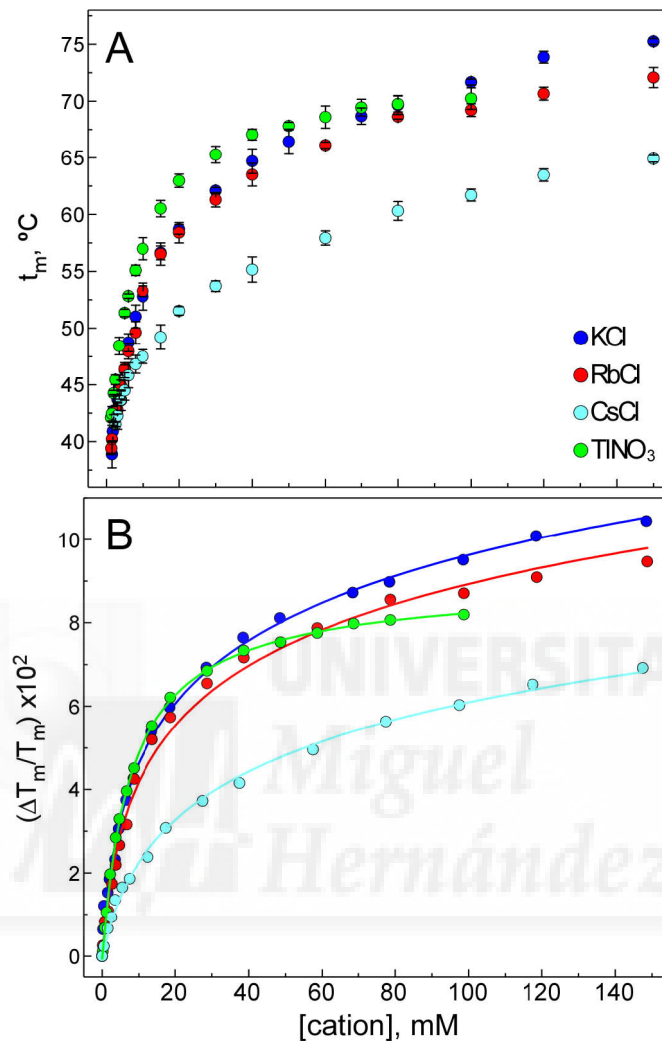


FIGURE 5

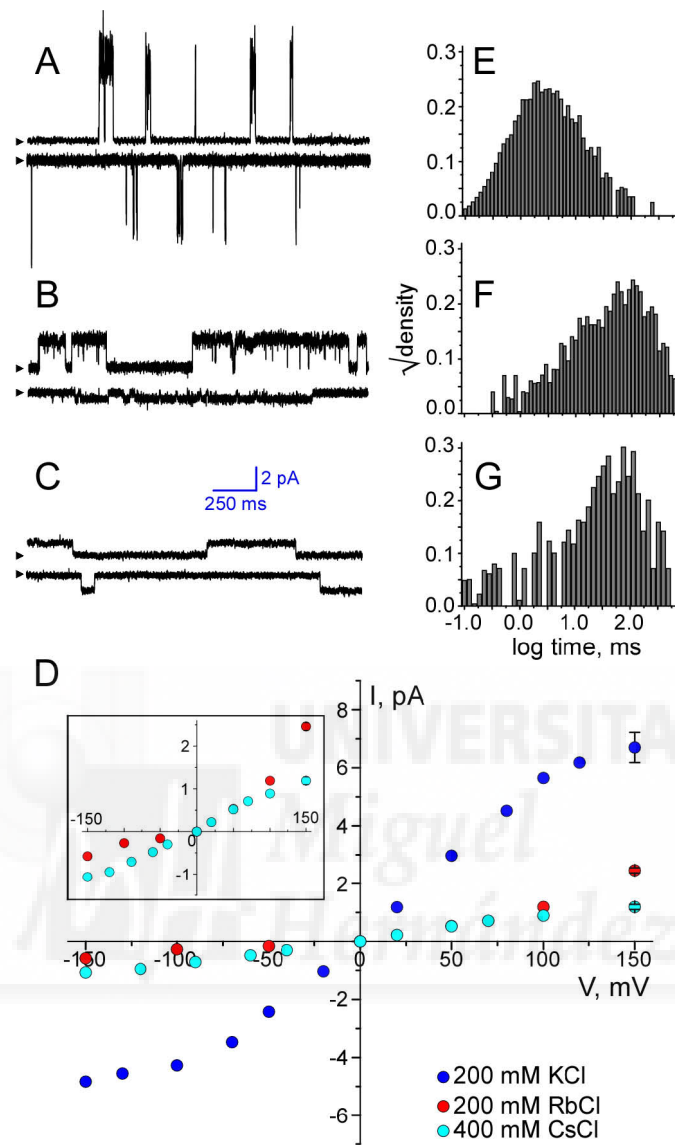


FIGURE 6

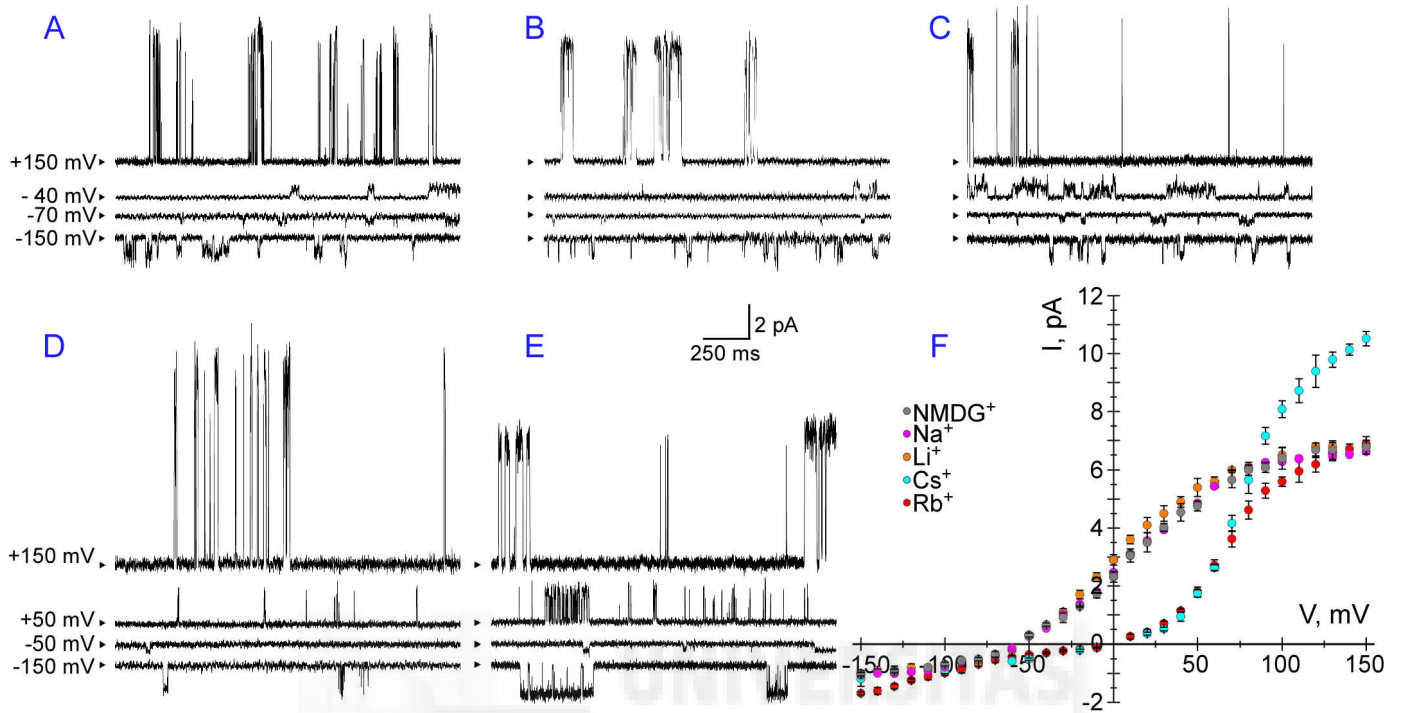
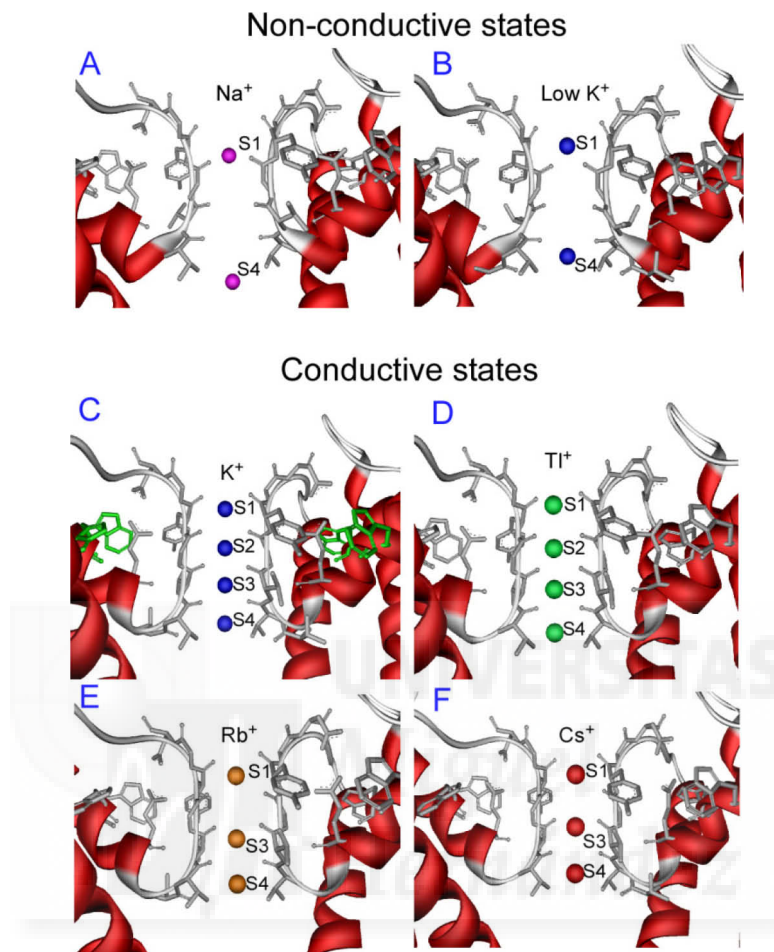


FIGURE 7







### **9.3. Manuscrito en preparación:**

*Selective exclusion and selective binding: A two component strategy to define ion selectivity in KcsA, a model potassium channel*





**Selective exclusion and selective binding: A two-component strategy to define ion selectivity in KcsA, a model potassium channel**

*M. Lourdes Renart, Estefanía Montoya, A. Marcela Giudici, José A. Poveda, Asia M. Fernández, Andrés Morales<sup>1</sup> and José M. González-Ros\**

Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain.

<sup>(1)</sup> Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, 03080 Alicante, Spain.

<sup>(\*)</sup> To whom correspondence should be addressed. Phone: + 34 96 6658757; Fax: + 34 96 6658758; E-mail: gonzalez.ros@umh.es

**KEY WORDS:** ion binding; potassium channel effectors; protein thermal stability; selectivity filter conformation; allosteric effectors; selectivity; permeability.

## INTRODUCTION

The ability of potassium channels to select  $K^+$  ions against their biological competitor  $Na^+$ , while permeating the former at near diffusion-limited rates, is crucial to develop their physiological roles (1). Thus, the understanding of the molecular basis underlying this phenomenon has been the main purpose of numerous investigations for decades, although it still remains under continued debate within the field.

The determination of the first high-resolution structure of a potassium channel, the prokaryotic channel KcsA, provided a great opportunity to further explore ion selectivity at atomic detail (2). KcsA is a tetrameric potassium channel from *Streptomyces lividans* (3), that shares the most relevant structural and functional properties with its eukaryotic counterparts (4,5). This structure pointed out that ion selection mainly occurs within the extracellular part of the ion pore known as the selectivity filter. This narrow region is lined by the backbone carbonyl groups from the residues of the conserved signature sequence TVGYG (6), creating four in-line potassium binding sites (S1-S4), where  $K^+$  ions are coordinated in their dehydrated form by the carbonyl oxygens (2). X-ray structures of KcsA under different ionic conditions show that the selectivity filter can adopt distinct conformations depending on the ion species and their concentration (7-9). In the presence of low potassium concentrations (around 3 mM), the filter exhibits a non-conductive conformation in which ions bind only at the ends of the selectivity filter (S1 and S4), with an average occupancy of one  $K^+$  ion distributed between these sites. When crystals are grown in the presence of higher potassium concentrations (from 20 to 200 mM), the selectivity filter structure presents a second ion in the central binding sites (S2 or S3) that leads to a conductive conformation of the filter. Nonetheless, in the presence of high concentrations of other permeant cations, such as  $Rb^+$  or  $Cs^+$ , the binding site S2 is not occupied, although their average occupation is also two ions in the selectivity filter at any given time (9). On the other hand,  $Na^+$  is not able to induce this conformational change, since it only occupies S1 or S4 site leading to a non-conductive conformation of the filter even at high ion concentrations (150 mM NaCl) (10). Moreover, electrophysiology experiments revealed that: i)  $Na^+$  blockade is asymmetric, since it reduces  $K^+$  currents exclusively from the intracellular side of KcsA (11,12), and ii) it

exhibits a marked selectivity for  $K^+$  over  $Na^+$  through the extracellular side, even when  $Na^+$  concentration is higher than  $K^+$  (13). The possibility of adopting different conformations of the selectivity filter depending on the interactions established between a given ion and the protein seems to be related with the ability of the filter to discriminate between distinct ions (8,14), although the ability to present ion binding asymmetry have never been fully explored.

In previous works we examined in detail the properties of ion-protein interactions by monitoring the intrinsic fluorescence from the tryptophan residues of KcsA (13,15-17). Our results suggested that the formation of the non-conductive conformation is associated to a high-affinity  $K^+$  binding, which would guarantee ion selection, while the transition to the conductive state would imply a low-affinity binding allowing  $K^+$  permeation. Moreover, KcsA showed the ability to interact with  $Na^+$ , the relevant physiological competitor, with an affinity similar to that detected for  $K^+$  in the conductive state. This fact correlates well with the  $IC_{50}$  for  $Na^+$  intracellular blockade (12), but not with the high selectivity presented by KcsA in the extracellular mouth (4,13). When the ion binding process was analyzed in the mutant E71A-KcsA channel, whose selectivity filter is stabilized in the conductive conformation (18), we found that, indeed, this protein only presents one low-affinity  $K^+$  binding event (17). However, it did retain, at least partially,  $Na^+/K^+$  selectivity compared to the wild-type channel, indicating that other mechanisms, besides the high-affinity binding to the non-conductive state, should be involved in ion selectivity.

In this work we test cation binding asymmetry and selective exclusion mechanisms as possible factors that take part in the selectivity process. For the first approach, we take advantage of the well-known blocker of potassium channels TBA (19-21), which binds to the intracellular end of the pore, allowing us to analyze ion binding to specific sites of the selectivity filter. In the second approach, we perform ion binding assays under competitive conditions, using KcsA with different selectivity filter conformations.

## MATERIALS AND METHODS

### *Protein Purification*

Expression of the wild-type (wt) and E71A KcsA protein with an added N-terminal hexahistidine tag was performed as described in (22). Briefly, protein expression was carried out in *Escherichia coli* M15 (pRep4) cells. Heterologous protein was purified by ion metal affinity chromatography on a Ni<sup>2+</sup>-Sepharose resin (GE Healthcare). Aliquots of purified KcsA channels were mixed with electrophoresis sample buffer (23) and loaded into a 13.5% polyacrylamide gel to check the tetramer integrity. Protein bands were visualized after Coomassie Brilliant Blue staining. After a dialysis step to remove the imidazole from the elution buffer, protein concentration was routinely determined from the absorbance at 280 nm, using a molar extinction coefficient of 34,950 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (24).

### *Sample preparation*

Typically a 70-80 μM protein stock was dialyzed against 20 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 5 mM n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM; Calbiochem), 5 mM N-methyl-D-glucamine (NMDG; Sigma-Aldrich), pH 7.0 supplemented with 100 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 100 mM KCl (Sigma-Aldrich) or 10 mM tetrabutylammonium chloride (TBA.Cl). In the particular case of E71A KcsA, the dialysis was performed in the presence of 2 M NaCl in order to retain tetramer integrity. These stocks were then diluted in the proper buffer reaching 1 μM final protein concentration and the desired amount of salt in each experiment.

Three types of titration experiments were carried out:

(a) *Non-competitive conditions*: 1 μM KcsA in 20 mM HEPES, 5 mM DDM, 5 mM NMDG, NaCl 1.5 mM, pH 7.0 buffer.

(b) *Non-competitive conditions in the presence of TBA.Cl*: a protein stock in the presence of 10 mM TBA<sup>+</sup> was diluted to 1 μM KcsA in 0.5 mM TBA pH 7.0 buffer and increasing amounts of NaCl or KCl were then added to individual samples.

(c) *Competitive conditions*: in this case two different approaches were taken: i) 1 μM KcsA in 20 mM HEPES, 5 mM DDM, 5 mM NMDG and 100 mM NaCl and increasing

amounts of K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> or Cs<sup>+</sup> chloride salts, ii) titration of KcsA with Na<sup>+</sup>, competing against different fixed amounts of K<sup>+</sup> (5, 10, 15, 20 or 25 mM).

### ***Intrinsic Fluorescence Measurements***

The intrinsic fluorescence emission spectra from the five Trp residues present in DDM-solubilized KcsA were recorded on a SLM 8000 spectrofluorometer, using 0.5 cm path-length quartz cuvettes, as specified in (15). Samples were excited at 280 nm, and the emission was recorded between 300 and 400 nm in 1 nm increments. Changes in emission spectra according to the type and concentration of different cations are expressed in terms of the normalized fluorescence intensity at a given wavelength,  $\langle \lambda \rangle$  (nm).

### ***Fluorescence Monitoring of Thermal Denaturation***

Thermal denaturation of KcsA channel was performed in a Varian Cary Eclipse spectrofluorometer by monitoring the temperature dependence of the protein intrinsic fluorescence emission at 340 nm after excitation at 280 nm according to previous publications (16,17,25). The midpoint temperature of the dissociation and unfolding of the tetramer ( $T_m$ ) into its monomeric constituents was calculated by using a two-state unfolding model, assuming a linear dependence of the pre- and post-transition baselines on temperature (26). Then, the increase in the  $T_m$  according to the concentration of ligand (i.e., permeant or blocking cations) was used to estimate the dissociation constant,  $K_D$ , of the protein–ligand complex using the following equation

$$\frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{T_m - (T_m)_0}{T_m} = \frac{R \cdot (T_m)_0}{\Delta H_0} \cdot \ln \left[ 1 + \frac{[L]}{K_D} \right] \quad (1)$$

where  $T_m$  and  $(T_m)_0$  refer to the denaturation temperature (in kelvin) for the protein in the presence and absence of ligand, respectively (we use the term  $t_m$  to refer to the midpoint denaturation temperature in Celsius degrees),  $R$  is the gas constant, and  $\Delta H_0$  is the enthalpy change upon protein denaturation in the absence of ligand (16,17).

### ***Estimation of theoretical apparent dissociation constants***

In a previous work (15) we found that  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  compete for the binding to the protein (P) in order to form  $\text{KcsA}\cdot\text{K}^+$  and  $\text{KcsA}\cdot\text{Na}^+$  complexes according to the following dissociation equilibrium,



where the dissociation constant for the binding of any ligand (X) to the protein is described by

$$K_X = \frac{[P] \times [X]}{[P \cdot X]}$$

Thus, the percentage of protein complexed with  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$  will depend (at a given fixed protein concentration) on the magnitudes of the individual dissociation constants ( $K_D$ ) of both complexes and on the concentration of both cations. Therefore, a mathematical approach was described in order to determine the “true” dissociation constants (i.e., non-competitive situation) for the two ligands competing for the channel under non-saturating competitive concentrations. In the present work we use this same model in order to estimate the expected apparent  $K_D$  for  $\text{Na}^+$  under a competitive situation with  $\text{K}^+$ . Protein concentration, cations concentration and the “true” dissociation constants for each of the ligands need to be known beforehand. These  $K_D$ 's for each cation in non-competitive situation were previously determined by us in (16).

As an example, we estimated the expected apparent  $K_D$  for  $\text{Na}^+$  when the channel is partially saturated with 5 mM KCl. For this estimation the protein concentration was set as 1  $\mu\text{M}$ , the “true”  $K_D$  for  $\text{Na}^+$  3.5 mM and the “true”  $K_D$  for  $\text{K}^+$  as 2.5 mM (16). The variation of the saturation fraction with  $\text{Na}^+$  concentration was then fit to a simple hyperbola and the apparent  $K_D$  was set as the concentration that gives 50% of the total response.



## RESULTS

### Cation binding asymmetry

Similarly to the conditions used in crystallography, our experimental system (purified channel protein in detergent solutions) have both, the extra- and intra-cellular ends of the channel pore, exposed to the same media and not subjected to any electrochemical gradient. This causes that, in principle, ions may access the channel pore through either end. Nonetheless, the pore could presumably be asymmetrical (non-equivalent S1 through S4 cation binding sites) and therefore, in an attempt to let channel asymmetry be manifested in our ion binding experiments, we have used TBA, which is a well-known blocker of potassium channels that binds to the intracellular end of the pore, from the channel vestibule (19-21) and in a practically irreversible manner ( $K_D$  in the nM range), as it cannot be displaced by increasing ion concentrations. Furthermore, no changes in the selectivity filter conformation induced by the TBA binding were detected. Figure 1A shows that 0.5 mM TBA causes that the  $t_m$  corresponding to thermal denaturation of wild-type KcsA, in the absence of any other ion, is increased by approximately 13-14 °C. Moreover, Figure 1A also shows that titration of the TBA-blocked channel with increasing concentrations of NaCl exhibits a lower slope, indicative of a loss in Na<sup>+</sup> binding affinity ( $K_D \sim 27$  mM; Table I) and increases only partly the stability of the protein to thermal denaturation, when compared to that seen in the absence of channel blockade (Figure 1C). This suggests that the stabilizing effect of Na<sup>+</sup> seen in the absence of TBA arises mainly from its binding to the S4 site at the intracellular end of the channel pore, whose access is now blocked by TBA. Likewise, K<sup>+</sup> titration of the TBA-blocked channel provides further evidence on the asymmetry of the selectivity filter (Figure 1B). In this case, the binding curve in the lower K<sup>+</sup> concentration range shows also a much lower slope than in the absence of TBA, indicating a loss in K<sup>+</sup> binding affinity ( $K_D \sim 160$  μM; Table I). In such lower K<sup>+</sup> concentration range, the channel is in a non-conductive state and K<sup>+</sup> has access only the S1 and S4 sites (8). However, under TBA blockade, access to the S4 site is blocked both, by the bound TBA at the cytoplasmic side and by the collapse of the filter at the S2/S3 sites within the pore in the non-conductive conformation. Therefore, the observed decreased affinity under TBA blockade should be attributed to the

binding of  $K^+$  exclusively to the S1 site. Nonetheless, as the  $K^+$  concentration is increased, the increased thermal stabilization observed in the TBA-blocked channel becomes identical to that expected from potassium alone, added on top of that provided by the bound TBA throughout the titration ( $K_D \sim 1.6$  mM; Table I). In fact, subtracting the TBA contribution to the overall thermal stability results in a binding curve very similar to that of  $K^+$  alone (Figure 1D), including the two characteristic binding phases (16). This suggests that, once the channel undergoes the  $K^+$ -induced conformational transition to the conductive state and in spite of TBA blockade,  $K^+$  eventually reaches all its binding sites within the pore to provide the characteristic thermal stability to the protein (16).

### **Cation binding to wild-type KcsA under competitive conditions**

In addition to selective binding of ions to the selectivity filter, selective exclusion of non-permeant cations when the filter changes its conformation from a non-conductive to a conductive state was hypothesized long ago as a possible basis of ion channel selectivity (27). Here we attempt to address such possibility by performing cation binding experiments under competitive conditions in which the starting points of the titrations are i) a non-conductive state of the selectivity filter caused by the presence of 100 mM  $Na^+$  (10) and ii) either non-conductive or conductive states of the channel filter resulting from the presence of varying concentrations of  $K^+$  (8).

Figure 2 shows the results from a set of experiments in which the channel in a non-conductive state caused by 100 mM  $Na^+$ , was titrated with the permeant cations  $K^+$ ,  $Rb^+$  or  $Cs^+$ . Similarly to that observed under non-competitive conditions (13), i.e., when titrations started with a channel prepared in just 1.5 mM  $Na^+$ , in which the selectivity filter is as empty as possible of bound cations, the addition of increasing concentrations of any of the permeant cations tested, resulted in the characteristic blue-shift of the fluorescence emission spectra, as previously reported for  $K^+$  (15) and a in a large thermal stabilization of the channel protein (Figure 2A, B and C). This indicates that all such permeant cations can efficiently displaced  $Na^+$  from binding to the channel pore;  $K^+$  and  $Rb^+$  being always more efficient in this regard than  $Cs^+$ . Nonetheless, instead of the two binding events reported previously under non-

competitive conditions, up to three different binding events can now be detected in the titration curves (Figure 2D, E, F and Table II). This is not unexpected under these conditions of ionic competition because, as described in the previous paragraph, the S1 and S4 sites have been found to have different affinities for  $\text{Na}^+$ , which must be displaced from both sites by the incoming permeant cation. The first binding event, seen at the lowest concentration of permeant cations, should correspond to  $\text{Na}^+$  displacement from the site having the lowest affinity for  $\text{Na}^+$ , i.e., the S1 site. Likewise, the second binding event seen at higher concentrations of permeant cations should correspond to  $\text{Na}^+$  displacement from the S4 site, which is the site with the higher affinity for  $\text{Na}^+$ , while the third binding event should reflect the occupancy by the permeant cations of the most internal sites within the selectivity filter, that is, the S2 and S3 sites in the case of  $\text{K}^+$ , or just the S3 site for  $\text{Rb}^+$  or  $\text{Cs}^+$ , which become accessible to such permeant cations upon the conformational transition to the conductive state. The binding constants corresponding to each of these individual events for the tested permeant cations are summarized in Table II.

As indicated above, X-ray data demonstrate that conductive or non-conductive conformational states of the channel's selectivity filter can be attained in the presence of different  $\text{K}^+$  concentrations (8). Thus, we tested the ability of  $\text{Na}^+$  to bind to KcsA in the presence of increasing  $\text{K}^+$  concentrations. As an example, Figure 3A shows that in 5 mM  $\text{K}^+$ , where the channel is in a non-conductive state according to the X-ray data (10), fairly high concentrations of  $\text{Na}^+$  cause an additional thermal stabilization of the protein, indicative of  $\text{Na}^+$  binding. This was fully unexpected because the non-conductive state has a micromolar  $K_D$  for  $\text{K}^+$  and therefore, at 5 mM concentration, all the available S1 and S4 sites should be saturated by  $\text{K}^+$  and thus, unavailable to  $\text{Na}^+$  having its  $K_D$  just in the millimolar range (16). In this respect, variables such as the high protein density or the presence of a bound antibody in the KcsA crystal could cause that the  $\text{K}^+$ -induced transition from non-conductive to conductive state takes place at  $\text{K}^+$  concentrations different than those needed under our solution conditions. The conductive state has a millimolar  $K_D$  for  $\text{K}^+$  and therefore, if the state transition has occurred at 5 mM  $\text{K}^+$ , it would explain the observed additional  $\text{Na}^+$  binding. Previous reports from our lab showed that the conformational change can be detected by

monitoring the spectral shift in the intrinsic fluorescence caused by increasing cation concentration (16). Figure 4 shows such spectral data for  $K^+$ . The  $K_D$  value for the equilibrium between the non-conductive and the conductive state is approximately 3 mM and therefore, the two states with micromolar and millimolar  $K_D$ 's for  $K^+$ , respectively, would coexist in our detergent solutions (in the presence of 5 mM  $K^+$ ) and should allow  $Na^+$  to compete effectively with the latter for binding to the channel.

Figure 3A also shows that in 25 mM  $K^+$ , where the channel is in the conductive state (7), the addition of  $Na^+$  causes no effects whatsoever on the thermal stability, suggesting that binding of  $Na^+$  does not occur under these circumstances, even at concentrations as high as 200 mM. This is also a surprising result considering the similar millimolar  $K_D$ 's commented above for the two cations to bind the channel (2.5 mM for  $K^+$  and 3.3 mM for  $Na^+$ ).

The results reported in the above paragraph suggest that the conductive and non-conductive channel states behave differently in regard to  $Na^+$  binding to the S1/S4 sites. In order to test such possibility, we used a model of competitive binding between two different ligands for the same receptor (16), to estimate the “theoretical” apparent dissociation constant for the KcsA- $Na^+$  complex at different initial  $K^+$  concentrations (see Methods). We also performed  $Na^+$  titrations on KcsA samples in the presence of different initial concentrations of  $K^+$  (Figure 3B) to determine experimentally such dissociation constants for  $Na^+$ . Figure 3C shows that there is a reasonable agreement between theoretical and experimental  $K_D$  values for  $Na^+$  when the initial  $K^+$  concentration was below 5-10 mM. However, as the initial  $K^+$  concentration is increased, there is a divergence between such values, as the experimental  $K_D$  values increase exponentially, suggesting that the affinity for  $Na^+$  is greatly decreased when the channel' selectivity filter undergoes the transition from a non-conductive to a conductive state. To confirm further such postulate in the simplest possible way we turned to use the mutant channel E71A-KcsA (Figure 5). This mutant channel does not inactivate because the lack of the E71 residue disrupts the W67-E71-D80 inactivation triad that confers such property to the channel (18,28) and therefore it models a channel “frozen” in a conductive conformation. Thus,  $Na^+$  binding experiments were performed using E71A-KcsA as a target. Figure 5 shows that much

higher Na<sup>+</sup> concentrations are needed now to provide thermal stability to the protein (Figure 5A) and that the binding curve can still be fitted assuming a single Na<sup>+</sup> binding event (Figure 5B), although the K<sub>D</sub> estimated from these experiments is over 250 mM, which is almost two orders of magnitude higher than that determined for Na<sup>+</sup> binding to the non-conductive state in the wt-KcsA channel (16).



## DISCUSSION

This paper contributes two new pieces of information to the molecular mechanisms behind ion selectivity in KcsA, a model K<sup>+</sup> channel. First, the experiments using TBA-blocked KcsA demonstrate the non-equivalency between S1 and S4 sites at the channel's selectivity filter to bind either Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>. At the concentration of TBA used in this work, there is no modification of the pore structure (19-21) and therefore, the experimental results can be compared to those from the wild-type channel in the absence of TBA blockade as a reference. K<sup>+</sup> binding to TBA-blocked KcsA shows a decreased affinity in the lower K<sup>+</sup> concentration range. At such low K<sup>+</sup>, the selectivity filter is in a non-conductive conformation and only the S1 and S4 sites are available for K<sup>+</sup> binding. However, when blocked by TBA, the S4 site becomes unavailable both, because TBA blocks the entrance of the cation from the cytoplasmic side and because the collapse conformation of the selectivity filter in the non-conductive state prevents K<sup>+</sup> from reaching the S4 site from the extracellular side through the pore. Thus, the observed decreased affinity must be attributed to K<sup>+</sup> binding to the S1 site. This could be physiologically relevant as it points out to an S4 site with a markedly higher affinity to bind K<sup>+</sup>, which additionally, is at a higher concentration in the intracellular media than in the extracellular one and therefore, it should facilitate even further the selection of the permeant cation by the channel.

Regarding the non-permeant Na<sup>+</sup>, it is known that it binds to both the S1 and S4 sites in a non-conductive pore conformation (10), without entering the most internal S2 and S3 sites. Such binding is characterized by a K<sub>D</sub> value of approximately 3.3 mM, which should represent an average K<sub>D</sub> coming from binding to both the S1 and S4 sites. When the access to the S4 site is blocked by TBA, there is still Na<sup>+</sup> binding to the available S1 site, but the extend of Na<sup>+</sup>-induced thermal stabilization decreases greatly and the K<sub>D</sub> for the binding process increases by almost an order of magnitude, indicating that the S1 site has a lower affinity for binding Na<sup>+</sup> than the S4 site. Under physiological conditions this could also be relevant, as the S1 site is exposed to the extracellular media, which contains a higher concentration of Na<sup>+</sup> than the cytoplasm. Therefore, a decreased affinity for Na<sup>+</sup> at the S1 site should help prevent even further the association of the channel pore to this non-permeant cation and contribute to the

selectivity mechanism, as stated by the permeability ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  of 0.013 determined for the wild-type channel (13). Moreover, this could also be related with the ability of  $\text{Na}^+$  to block  $\text{K}^+$  currents exclusively from the intracellular part of the channel (11,12).

The above observations on the binding of either  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$  to TBA-blocked KcsA, along with crystallographic evidence on the different occupation by permeant cations of the S2 and S3 sites (9), provides a picture of the selectivity filter in which the reported stack of S1 to S4 binding sites seen in the KcsA crystal are non-equivalent, which is to conclude that the selectivity filter is asymmetrical in terms of its ability to bind either permeant or non-permeant cations.

In addition to the TBA blockade approach, the competitive displacement of  $\text{Na}^+$  from its binding sites by different permeant cations (Figure 2) also serves to detect heterogeneity between S1 and S4 sites. It should be emphasized that such heterogeneity was not detected in direct  $\text{Na}^+$  binding experiments under non-competitive conditions (16), but the competitive displacement allows to see a first binding event at the lowest concentration of permeant cations, which should correspond to the displacement of  $\text{Na}^+$  from the site having the lowest affinity for  $\text{Na}^+$ , i.e., the S1 site. This is followed at higher concentrations of permeant cations, by  $\text{Na}^+$  displacement from the S4 site, which is the site with the higher affinity for  $\text{Na}^+$ .

The second type of evidence reported here has to do with a combined selective binding/selective exclusion mechanism to define ion selectivity by the channel. Here we take advantage of crystallographic reports (7,8) showing that non-conductive or conductive conformations of the channel selectivity filter can be attained in the presence of different concentrations of  $\text{K}^+$ , the physiologically relevant permeant cation. In addition to the X-ray information, which obviously pertains to the experimental conditions in the crystal and refers to just one or two different concentrations of cations, we have used fluorescence spectroscopy in our solution conditions to define the critical concentration for  $\text{K}^+$  causing the conformational change from non-conductive to conductive state. Such critical concentration (~3 mM) does not differ significantly from that estimated by crystallography (3 or 5 mM, in two different reports) (8,10), in spite of the differences in experimental conditions. Thus,

we used increasing  $K^+$  concentrations to induce a progressive displacement of the equilibrium from non-conductive to conductive channel states to perform competitive  $Na^+$  binding. We concluded at a first glimpse that the affinity of  $Na^+$  to bind to the channel is greatly decreased when the channel's selectivity filter changes its conformation to a "fully" conductive state. Progressive and not stepped decrease of  $Na^+$  affinity (Figure 3C) in a conductive selectivity filter could be correlated to an also progressive conformational change of this domain to achieve a "fully" conductive state when all the four binding sites reach a stable occupation (7). Such an initial conclusion received confirmation from experiments of  $Na^+$  binding to the mutant E71A-KcsA channel, which models a "frozen" conductive state and exhibits a two orders of magnitude lower affinity for  $Na^+$  than previously reported for the non-conductive channel state (16).

In conclusion, the observed decrease in the affinity for  $Na^+$  binding to the conductive channel contributes an additional selective exclusion mechanism, which further reinforces both, the consequences of the asymmetry encountered in the selectivity filter, as well as the effects of selective binding favoring  $K^+$  over  $Na^+$  occupancy reported previously to fully guarantee ion selectivity by the channel. The combination of selective binding and selective exclusion mechanisms to explain ion selectivity by ion channels was hypothesized long ago by Armstrong and coworkers (27), but to the best of our knowledge, no clear-cut experimental evidence such as that reported here has been provided until now.



## REFERENCES

1. Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed., Sinauer Associates, Inc.,
2. Doyle, D. A.; Morais, C. J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280** (5360), 69-77
3. Schrempf, H.; Schmidt, O.; Kummerlen, R.; Hinnah, S.; Muller, D.; Betzler, M.; Steinkamp, T.; Wagner, R. (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* **14** (21), 5170-5178
4. LeMasurier, M.; Heginbotham, L.; Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol* **118** (3), 303-314
5. MacKinnon, R.; Cohen, S. L.; Kuo, A.; Lee, A.; Chait, B. T. (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* **280** (5360), 106-109
6. Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417** (6888), 523-526
7. Morais-Cabral, J. H.; Zhou, Y.; MacKinnon, R. (2001) Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter. *Nature* **414** (6859), 37-42
8. Zhou, Y.; Morais-Cabral, J. H.; Kaufman, A.; MacKinnon, R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414** (6859), 43-48
9. Zhou, Y.; MacKinnon, R. (2003) The occupancy of ions in the K<sup>+</sup> selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* **333** (5), 965-975
10. Lockless, S. W.; Zhou, M.; MacKinnon, R. (2007) Structural and thermodynamic properties of selective ion binding in a K<sup>+</sup> channel. *PLoS. Biol.* **5** (5), e121
11. Heginbotham, L.; LeMasurier, M.; Kolmakova-Partensky, L.; Miller, C. (1999) Single *streptomyces lividans* K<sup>(+)</sup> channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J. Gen. Physiol* **114** (4), 551-560
12. Nimigean, C. M.; Miller, C. (2002) Na<sup>+</sup> block and permeation in a K<sup>+</sup> channel of known structure. *J. Gen. Physiol* **120** (3), 323-335

13. Montoya, E.; Renart, M. L.; Giudici, A. M.; Poveda, J. A.; Fernandez, A. M.; Morales, A.; Gonzalez-Ros, J. M. (2016) Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering potassium channel selectivity. *Submitted to J. Biol. Chem.*
14. Yellen, G. (2001) Keeping K<sup>+</sup> completely comfortable. *Nat. Struct. Biol.* **8** (12), 1011-1013
15. Renart, M. L.; Barrera, F. N.; Molina, M. L.; Encinar, J. A.; Poveda, J. A.; Fernandez, A. M.; Gomez, J.; Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Effects of conducting and blocking ions on the structure and stability of the potassium channel KcsA. *J. Biol. Chem.* **281** (40), 29905-29915
16. Renart, M. L.; Triano, I.; Poveda, J. A.; Encinar, J. A.; Fernandez, A. M.; Ferrer-Montiel, A. V.; Gomez, J.; Gonzalez Ros, J. M. (2010) Ion binding to KcsA: implications in ion selectivity and channel gating. *Biochemistry* **49** (44), 9480-9487
17. Renart, M. L.; Montoya, E.; Fernandez, A. M.; Molina, M. L.; Poveda, J. A.; Encinar, J. A.; Ayala, J. L.; Ferrer-Montiel, A. V.; Gomez, J.; Morales, A.; Gonzalez Ros, J. M. (2012) Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel. *Biochemistry* **51** (18), 3891-3900
18. Cordero-Morales, J. F.; Cuello, L. G.; Zhao, Y.; Jogini, V.; Cortes, D. M.; Roux, B.; Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13** (4), 311-318
19. Faraldo-Gomez, J. D.; Kutluay, E.; Jogini, V.; Zhao, Y.; Heginbotham, L.; Roux, B. (2007) Mechanism of intracellular block of the KcsA K<sup>+</sup> channel by tetrabutylammonium: insights from X-ray crystallography, electrophysiology and replica-exchange molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **365** (3), 649-662
20. Yohannan, S.; Hu, Y.; Zhou, Y. (2007) Crystallographic study of the tetrabutylammonium block to the KcsA K<sup>+</sup> channel. *J. Mol. Biol.* **366** (3), 806-814
21. Zhou, M.; Morais-Cabral, J. H.; Mann, S.; MacKinnon, R. (2001) Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* **411** (6838), 657-661
22. Molina, M. L.; Encinar, J. A.; Barrera, F. N.; Fernandez-Ballester, G.; Riquelme, G.; Gonzalez-Ros, J. M. (2004) Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* **43** (47), 14924-14931
23. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680-685

24. Pace, C. N.; Scholtz, J. M. (1997) *Protein Structure: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, U.K.
25. Triano, I.; Barrera, F. N.; Renart, M. L.; Molina, M. L.; Fernandez-Ballester, G.; Poveda, J. A.; Fernandez, A. M.; Encinar, J. A.; Ferrer-Montiel, A. V.; Otzen, D.; Gonzalez-Ros, J. M. (2010) Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry* **49** (25), 5397-5404
26. Sehgal, P.; Otzen, D. E. (2006) Thermodynamics of unfolding of an integral membrane protein in mixed micelles. *Protein Sci.* **15** (4), 890-899
27. Bezanilla, F.; Armstrong, C. M. (1972) Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J. Gen. Physiol* **60** (5), 588-608
28. Cordero-Morales, J. F.; Jogini, V.; Lewis, A.; Vasquez, V.; Cortes, D. M.; Roux, B.; Perozo, E. (2007) Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (11), 1062-1069



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Dependence of the wild-type KcsA thermal stability on the concentration of  $K^+$  (panel A) or  $Na^+$  (panel B) in the absence or presence of 0.5 mM of the channel blocker TBA. Results are presented as the average  $t_m$  (in Celsius)  $\pm$  SD from at least three independent titrations. Panels C and D compare the thermal stability of the protein with increasing concentrations of NaCl or KCl, respectively, when subtracting the TBA contribution.

**Figure 2:** Dependence of the wild-type KcsA thermal stability on the concentration of  $K^+$  (panel A),  $Rb^+$  (B) or  $Cs^+$  (C) in the presence of 100 mM NaCl. Insets to panels A-C zoom on the first binding event in each case. Results are presented as the average  $t_m$  (in Celsius)  $\pm$  SD from at least three independent titrations. Fitting of experimental data from panels A-C to Equation 1 resulted in three different binding events that are shown in panels D-F, respectively.

**Figure 3:** Binding of  $Na^+$  to wild-type KcsA in the presence of different initial amounts of  $K^+$ . All experiments were performed at a protein concentration of 1  $\mu$ M in 20 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 5 mM DDM, 5 mM NMDG and the indicated concentrations of KCl and NaCl. Panel A shows that the addition of 200 mM NaCl slightly increases the thermal stability of the channel in the presence of 5 mM KCl, but no changes are detected in 25 mM of the permeant cation. Panel B represents the dependence of the protein thermal stability on the concentration of NaCl in the presence of 0, 5, 10 or 25 mM KCl as initial condition. Panel C: comparison between the experimental apparent  $K_D$  values of KcsA for  $Na^+$  obtained from data in panel B and the ones predicted by using the “true”  $K_D$ 's for  $Na^+$  and  $K^+$  determined under non-competitive situation (see Methods).

**Figure 4:** Intrinsic fluorescence emission spectra changes according  $K^+$  concentration. A) Addition of 100 mM KCl to a wild-type KcsA sample containing 1.5 mM  $Na^+$  induces a blue-shift in the fluorescence emission spectra. B) Fluorescence spectral shift can be used as a parameter to evaluate binding of  $K^+$  to KcsA. Continuous lines represent the fit to a sigmoidal equation, leading to  $K_D$  value of  $3.3 \pm 0.8$  mM. Panel C is shown to

compare results obtained from the spectral (structural) information and those derived from the thermal denaturation assay. In the range where the increase in the  $t_m$  parameter detects the first binding event, the variation of the center of mass is not significant to determine any binding parameter. On the other hand, the  $K_D$  derived from the changes in the spectral shape correlate well to those determined for the second binding event detected by the thermal stability assay (2.5 mM).

**Figure 5:** Fluorescence monitoring of thermal denaturation of E71A-KcsA in the presence of NaCl (panel A). Experiments were carried out at a protein concentration of 1  $\mu$ M in 20 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 5 mM DDM, 5 mM NMDG and the indicated concentrations of NaCl. Panel B shows the dependence of the mutant channel thermal stability on the concentration of NaCl. Experimental data (from at least 3 independent experiments) was fitted to Equation 1 obtaining an estimated dissociation constant of  $256 \pm 41$  mM.



## TABLES

TABLE I: Binding of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> to wt-KcsA in the absence/presence of 0.5 mM TBA.

Target channel	Tested cation	Sets of binding sites detected	K <sub>D</sub> <sup>(a)</sup> (M)
KcsA <sup>(b)</sup>	Na <sup>+</sup>	1	(3.3 ± 0.5) × 10 <sup>-3(b)</sup>
	K <sup>+</sup>	2	(1.9 ± 0.5) × 10 <sup>-6(b)</sup> (2.5 ± 0.5) × 10 <sup>-3(b)</sup>
TBA-KcsA	Na <sup>+</sup>	1	(27 ± 1) × 10 <sup>-3</sup>
	K <sup>+</sup>	2	(160 ± 40) × 10 <sup>-6</sup> (1.61 ± 0.06) × 10 <sup>-3</sup>

<sup>(a)</sup> K<sub>D</sub> was calculated by fitting the average of at least three independent titrations covering a wide range of cation concentrations (see Figure 1) to Equation 1 (see Methods). Each value represents the K<sub>D</sub> ± SD. <sup>(b)</sup> As previously reported in (16).

TABLE II: Competitive binding of K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup> to wt KcsA in the presence of 100 mM NaCl.

Tested cation	Sets of binding sites detected	K <sub>D</sub> (M)
K <sup>+</sup>	3	(3.1 ± 0.6) × 10 <sup>-5</sup> (2.4 ± 0.4) × 10 <sup>-3</sup> (1.4 ± 0.2) × 10 <sup>-2</sup>
Rb <sup>+</sup>	3	(1.4 ± 0.7) × 10 <sup>-4</sup> (1.6 ± 0.4) × 10 <sup>-3</sup> (1.6 ± 0.3) × 10 <sup>-2</sup>
Cs <sup>+</sup>	3	(3.0 ± 1.0) × 10 <sup>-4</sup> (7.0 ± 0.7) × 10 <sup>-3</sup> (2.4 ± 0.2) × 10 <sup>-2</sup>

## FIGURES

FIGURE 1

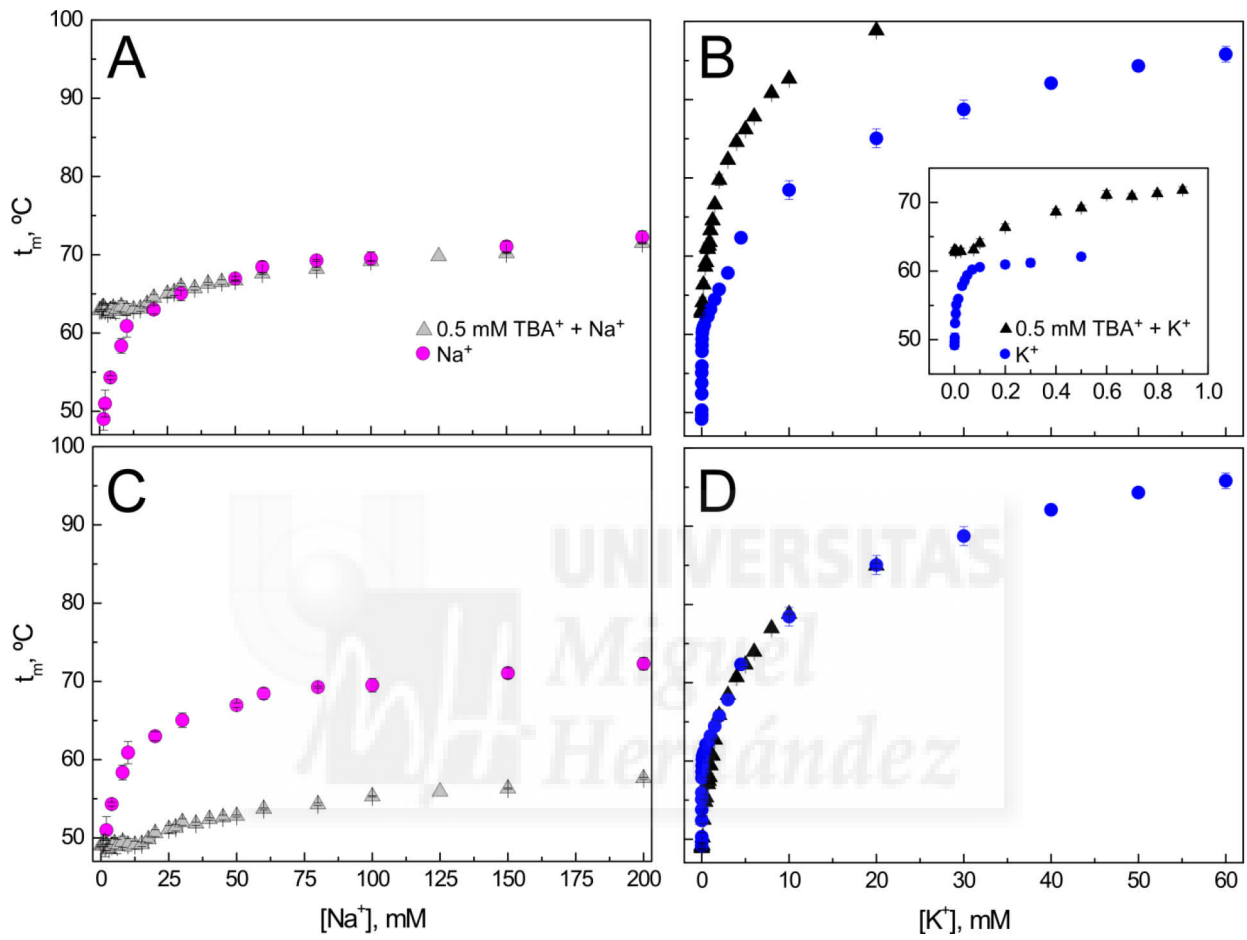


FIGURE 2

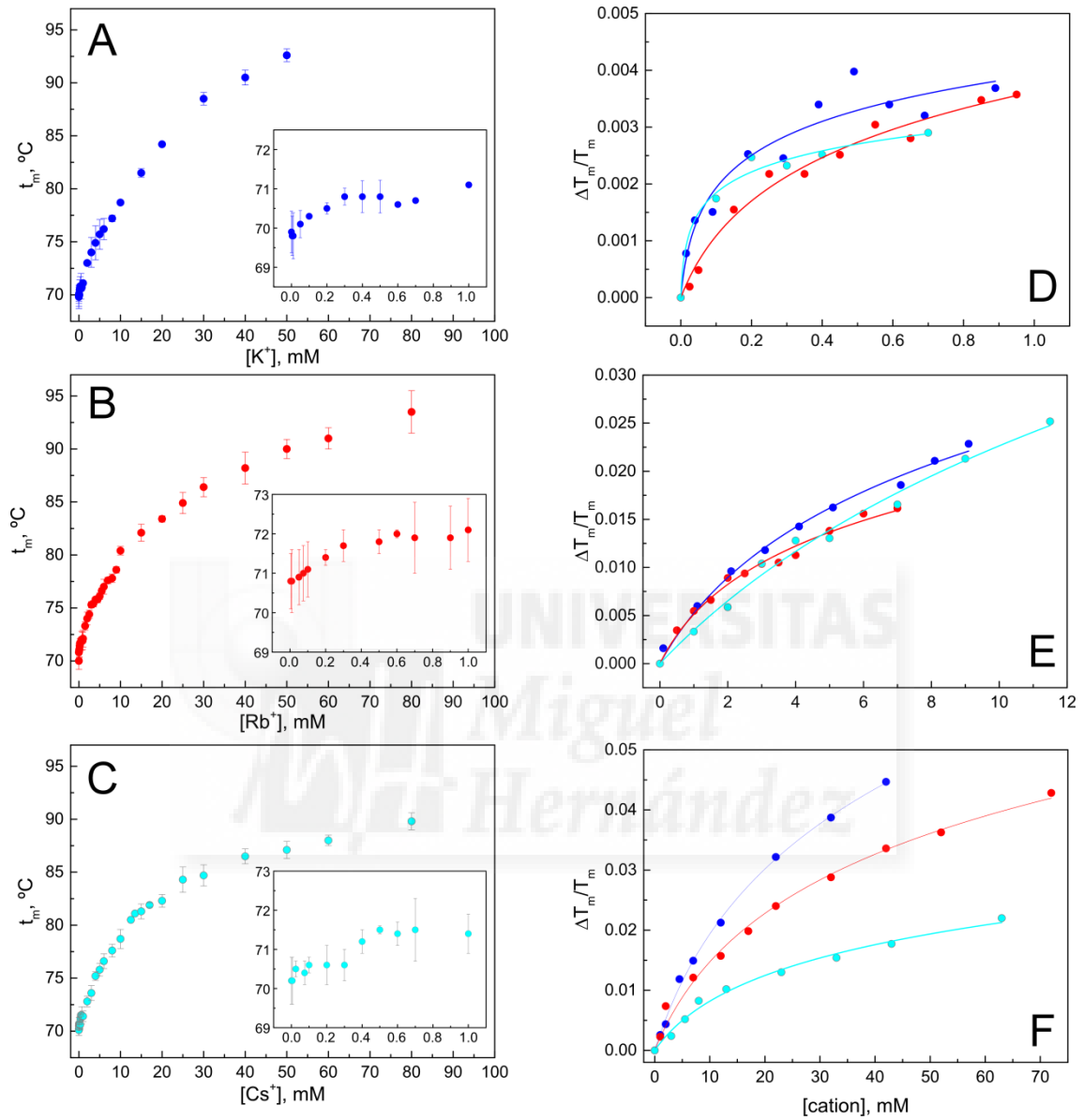




FIGURE 3

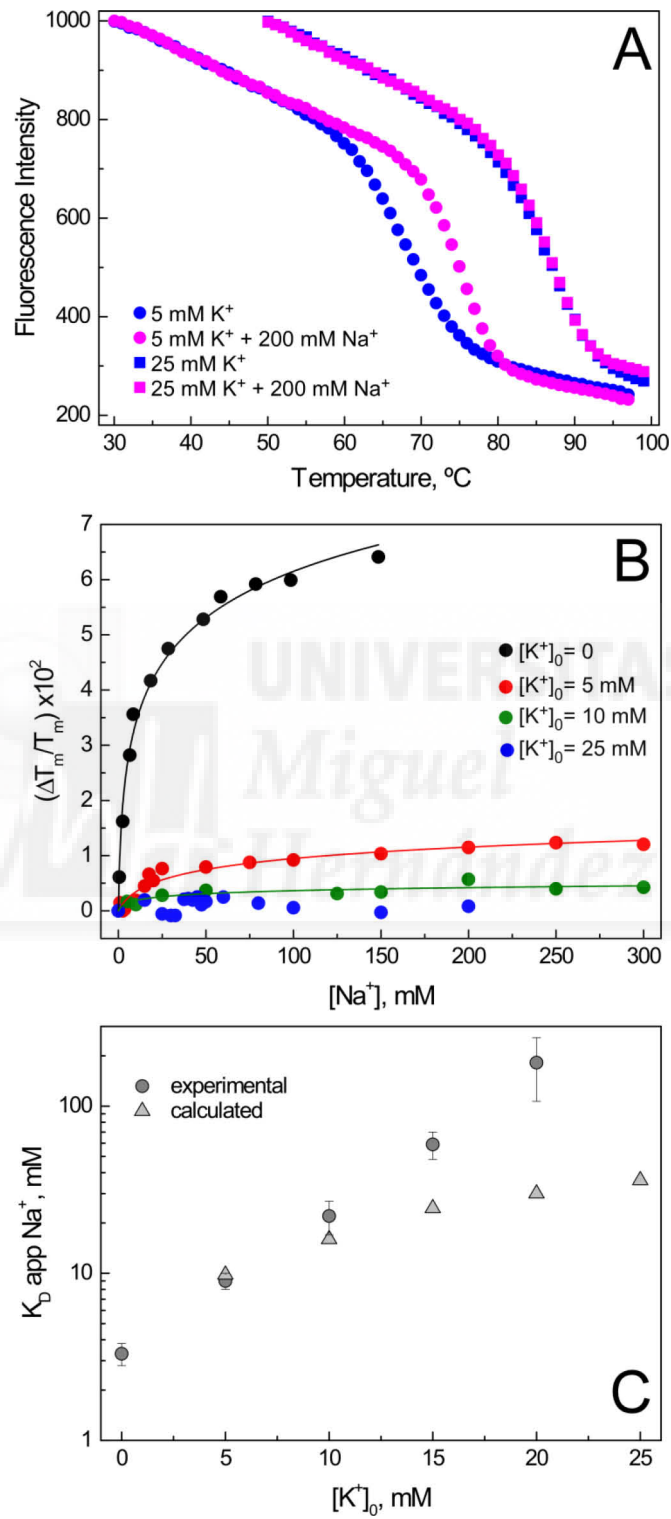


FIGURE 4

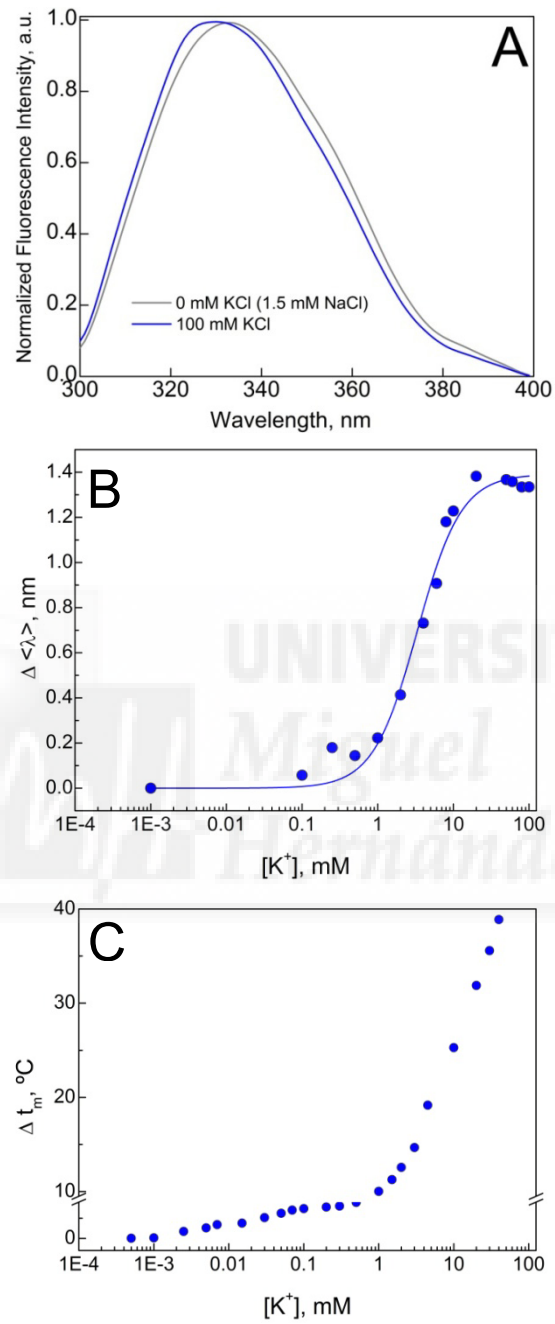
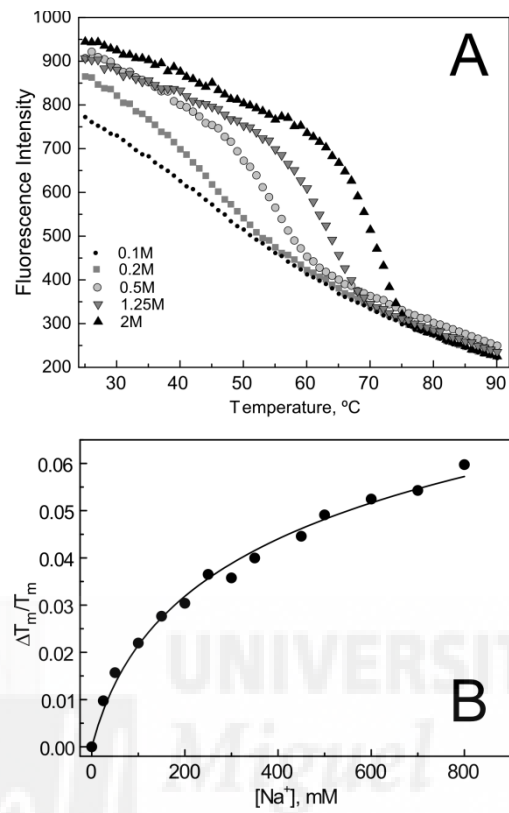


FIGURE 5





## 9.4. Curriculum vitae





## DATOS PERSONALES

**Nombre:** Estefanía Montoya Díaz

**Fecha de nacimiento:** 14 de Junio de 1986

**Lugar de nacimiento:** Elche (Alicante)

**Correo electrónico:** emontoya@umh.es

## FORMACIÓN ACADÉMICA

2014-2015 **Máster Universitario en Medicina y Genética Reproductivas** de la Universidad Miguel Hernández de Elche y la Clínica Vistahermosa de Alicante.

2009-2016 **Programa de doctorado en Biología Molecular y Celular** por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

2007-2009 **Licenciatura en Bioquímica** por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

- Premio extraordinario al mejor expediente de la Licenciatura.

2004-2007 **Primer Ciclo de la Licenciatura en Biología** por la Universidad de Alicante.

## EXPERIENCIA PROFESIONAL Y SITUACIÓN ACTUAL

Mayo 2015 - actualidad **Bioquímica especializada en Genética Clínica, Unidad de Genética de la Clínica Vistahermosa.**

- Tareas principales: Extracción de ADN a partir de distintas muestras biológicas, análisis genéticos mediante técnicas de biología molecular (QF-PCR, secuenciación, análisis de fragmentos, PCR a tiempo real), interpretación de resultados.
- Asesoramiento genético (e-GenetiCare, parque científico-empresarial de la Universidad Miguel Hernández).
- Ayudante de coordinación del Máster en Medicina y Genética Reproductivas y de la Escuela de Medicina y Genética Reproductivas (plataforma Edx) de la Universidad Miguel Hernández de Elche y la Clínica Vistahermosa de Alicante.

- Oct 2009 - **Investigadora Predoctoral**  
2016
- Estudios de conducción y selectividad iónicas en el canal de potasio procariota KcsA. Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, laboratorio del Dr. José Manuel González Ros.
  - Principales habilidades científicas: mutagénesis dirigida por PCR, expresión heteróloga de proteínas de membrana y posterior purificación, electroforesis en condiciones desnaturalizantes, espectroscopia de ultravioleta-visible, espectroscopia de fluorescencia aplicada al estudio de proteínas, reconstitución de proteínas en vesículas lipídicas, técnica electrofisiológica de *patch-clamp*.
  - Oct 2009 – Sep 2013: Beca de Formación de Personal Investigador por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España
  - Nov 2013 – Feb 2014: Contrato Predoctoral
- Oct 2008 - **Colaboración con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de**  
Sep 2009 **la Universidad Miguel Hernández de Elche.**
- Empleo de espectroscopía de infrarrojo y técnicas electrofisiológicas en el estudio de la relación estructura-función de canales iónicos.

#### ESTANCIAS PREDOCTORALES

- Mayo 2013 - **Estancia predoctoral** en Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin  
Agosto 2013 (Göttingen, Alemania).
- Laboratorio de los Dres. Walter Stühmer y Luis Pardo (tutor)
  - Perfeccionamiento del manejo y ampliación de conocimientos de técnicas electrofisiológicas.

#### PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

**Montoya E\***, Renart ML\*, Giudici AM, Poveda JA, Fernández AM, Morales A, González-Ros JM. (\*Both authors contributed equally to this work). Differential binding of monovalent cations to KcsA: Deciphering potassium channel selectivity. Artículo enviado a *The Journal of Biological Chemistry* (Junio 2016).

Molina ML, Giudici AM, Poveda JA, Fernández-Ballester G, **Montoya E**, Renart ML, Fernández AM, Encinar JA, Riquelme G, Morales A, González-Ros JM. Competing lipid-protein and protein-protein interactions determine clustering and gating patterns in the potassium channel from *Streptomyces lividans* (KcsA). *J. Biol.Chem.* 2015 Oct 16;290(42): 25745-55.



Poveda JA, Giudici AM, Renart ML, Molina ML, **Montoya E**, Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Encinar JA, González-Ros JM. Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014 Jun; 1838(6):1560-7.

Giudici AM, Molina ML, Ayala JL, **Montoya E**, Renart ML, Fernández AM, Encinar JA, Ferrer-Montiel AV, Poveda JA, González-Ros JM. Detergent-labile, supramolecular assemblies of KcsA: relative abundance and interactions involved. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013 Feb;1828(2):193-200.

Renart ML\*, **Montoya E\***, Fernández AM, Molina ML, Poveda JA, Encinar JA, Ayala JL, Ferrer-Montiel AV, Gómez J, Morales A, González Ros JM. (\*Both authors contributed equally to this work). Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel. *Biochemistry.* 2012 May 8;51(18):3891-900.

#### CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

Autores: A. Urbano, I. Ochando, M. Sánchez, **E. Montoya**, A. Segura, J. J. López- Gálvez, M. Lloret, J. Rueda.

Título: Heterochromatine polymorphism does not appear to alter spermatogenesis in infertile men.

Tipo de participación: Póster

Congreso: European Human Genetics Conference, Barcelona (España), 21-24 de Mayo de 2016.

Autores: M.L. Renart, M. Giudici, **E. Montoya**, J.A. Poveda, A. Fedorov, M.N. Berberan-Santos, M. Prieto, J.M. González Ros, A. Coutinho.

Título: Homo-FRET studies of K<sup>+</sup> channel KcsA: a closer look to selectivity filter dynamics and regulation.

Tipo de participación: Póster

Congreso: 10th EBSA Biophysics Congress, Dresden (Germany), 18-22 de Julio de 2015.

Autores: A. Fernández, M.L. Renart, **E. Montoya**, M. Giudici, M.L. Molina, J.A. Poveda, J.A. Encinar, A.V. Ferrer-Montiel, J.M. González Ros

Título: The potassium channel KcsA: A model for developing useful tools in the understanding of potassium channels and design new potential drugs.

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: XIVth Congress of the Spanish Biophysical Society, Alcalá de Henares (Madrid), 11-13 de Junio de 2014

Autores: M.L. Renart, **E. Montoya**, M. Giudici, J.A. Poveda, A. Fernández, J.A. Encinar, J.M. González Ros

Título: Tryptophan mutants of KcsA channel as a tool to study ion and lipid-protein interaction.

Tipo de participación: Póster

Congreso: 9th European Biophysics Congress, Lisboa (Portugal), 13-17 de Julio de 2013

Autores: **E. Montoya**, A.M. Fernández, J.M. González-Ros, O. Millet

Título: Interaction between the B-ball peptide and the KcsA channel as studied by NMR spectroscopy.

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: XIII Iberian Peptide Meeting, Alicante (España), 1-3 de Febrero de 2012

Autores: A.M.Giudici, J.A. Poveda, M.L. Molina, M.L. Renart, J.L. Ayala, **E. Montoya**, A.M. Fernández, J.A. Encinar, J.M. González-Ros

Título: Protein-protein and lipid-protein interactions in KcsA

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: International Workshop on Integrative Research on Ion Channels, Oviedo (España), 12-13 de Julio de 2011

Autores: J.L. Ayala, A.M. Giudici, J.A. Poveda, M.L. Molina, **E. Montoya**, M.L. Renart, M.L. Molina, A. M. Fernández, J.M. González-Ros, J.A. Encinar

Título: Efecto de péptidos "anti-cluster" sobre el canal de potasio KcsA.

Tipo de participación: Póster

Congreso: XI Congreso de la Sociedad de Biofísica de España, Murcia (España), 1-4 de Junio de 2011

Autores: J.A. Poveda, M. Giudici, M.L. Molina, M.L. Renart, J.L. Ayala, **E. Montoya**, A.M. Fernández, J.A. Encinar, J.M. González-Ros

Título: Electroforesis "blue-native" para la cuantificación de la auto-asociación de KcsA

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: XI Congreso de la Sociedad de Biofísica de España, Murcia (España), 1-4 de Junio de 2011

Autores: **E. Montoya**, M.L. Renart, A.M. Fernández, M.L. Molina, J.L. Ayala, J.A. Encinar, J.A. Poveda, J.M. González-Ros

Título: Role of the conformation of selectivity filter in KcsA stability and function

Tipo de participación: Póster

Congreso: XI Congreso de la Sociedad de Biofísica de España, Murcia (España), 1-4 de Junio de 2011

Autores: M.L. Renart, I. Triano, **E. Montoya**, J.A. Poveda, J.L. Ayala, F.J. Gómez, J.A. Encinar, A.M. Fernández, G. Fernández-Ballester, A.V. Ferrer-Montiel, J.M. González-Ros

Título: Specific ions, specific lipids: sources of protein stability in an ion channel model.

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: III Reunión Española de Canales Iónicos, Puerto de la Cruz (Tenerife, España), 2-4 de Febrero de 2011

Autores: **E. Montoya**, M.L. Renart, A.M. Fernández, M.L. Molina, J.L. Ayala, J.A. Encinar, J.A. Poveda, J.M. González-Ros

Título: Role of the conformation of selectivity filter in KcsA stability and function

Tipo de participación: Póster

Congreso: III Reunión Española de Canales Iónicos, Puerto de la Cruz (Tenerife, España), 2-4 de Febrero de 2011

Autores: M.L. Renart, I. Triano, J.A. Poveda, **E. Montoya**, J.L. Ayala, F.J. Gómez, J.A. Encinar, A.M. Fernández, G. Fernández-Ballester, A.V. Ferrer-Montiel, J.M. González-Ros

Título: Specific ions, specific lipids: sources of protein stability in an ion channel model.

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: International Workshop on Membrane Proteins, Signal Transduction and Disease, Bilbao (España), 12-13 de Julio de 2010

Autores: A.M. Fernández, M.L. Molina, M.L. Renart, **E. Montoya**, I. Triano, J.L. Ayala, J.A. Poveda, J.A. Encinar, G. Fernández-Ballester, A.V. Ferrer-Montiel, O. Millet, J.M. González-Ros.

Título: Potential new approaches in drug discovery arising from the study of functionally-relevant interactions in the KcsA channel.

Tipo de participación: Comunicación oral

Congreso: Channelopathies: from bench to bedside, Gavà (Barcelona, España), 2-3 de Febrero de 2010

## FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

- 2016 **Curso de Experto en Marketing Online y Posicionamiento Web**  
ENFES (Escuela de Negocios y Estudios Superiores), 120 horas
- 2015 **Prácticas en la Unidad de Reproducción Humana del Hospital General Universitario de Valencia** (23 de Febrero al 6 de Marzo)
- 2011 **SICI Advanced Practical Course in Structural Techniques**  
CicBiogune (Derio-Vizcaya), 11-13 de Abril

## IDIOMAS

- First Certificate in English (B2), University of Cambridge.
- Francés nivel básico.
- Certificado Oficial de Conocimientos de Valenciano (Grau Mitjà) per la Junta Qualificadora de Coneixements de València.

## OTROS DATOS DE INTERÉS

Socia adherida de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM).

Socia adherida de la Sociedad de Biofísica Española (SBE).



