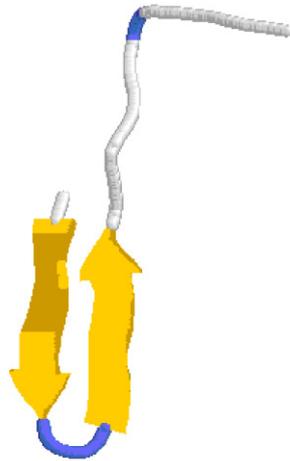




**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



Estudios estructurales de los fragmentos amino terminal de los canales de potasio tipo *Shaker B* nativo (ShB) y mutado (ShBL7E)

TESIS DOCTORAL presentada por

JOSÉ ANTONIO ENCINAR HIDALGO

Alicante, 1998



CENTRO DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y CELULAR
Campus de Elche. C/ Monóvar s/n
Teléfono (96) 665 87 59 – Fax (96) 665 86 80
Telephone +34 96 665 87 59 – Fax +34 96 665 86 80
E-03206 ELCHE (Alicante) · ESPAÑA - Spain

D. JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ ROS, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández.

CERTIFICO: Que la Tesis Doctoral que lleva por título: "ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LOS FRAGMENTOS AMINO TERMINAL DE LOS CANALES DE POTASIO TIPO *SHAKER* B NATIVO (SHB) Y MUTADO (SHBL7E)", presentada por D. José Antonio Encinar Hidalgo para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Neuroquímica de la Universidad Miguel Hernández.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgada,

Elche, a 2 de Julio de 1998.

El Director de la Tesis

José Manuel González Ros.

“En última instancia, vivir significa asumir la responsabilidad de encontrar la respuesta correcta a los problemas que ello plantea y cumplir las tareas que la vida asigna continuamente a cada individuo.”

Viktor Emil Frank
El hombre en busca de sentido

El trabajo recogido en la presente Memoria ha dado pie a la publicación de diversos artículos en revistas científicas internacionales. Dicho trabajo ha sido financiado con las dotaciones económicas asignadas a distintos proyectos de investigación dirigidos por el Dr. José Manuel González-Ros, concedidos por la Unión Europea (CT91-0666) y por la DGICYT de España (PB90-0564, PB92-0340, PB93-0093, PB93-0934, PM95-0108). Quien presenta esta Memoria ha dispuesto de una Beca de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia de España durante los últimos cuatro años.

El trabajo ha sido realizado en el *Instituto de Neurociencias*. A lo largo de esta Memoria se recogen distintas contribuciones, fruto de la colaboración, realizadas por distintas personas y con su permiso, lo que queda reflejado en las distintas secciones de dicha Memoria.

QUIERO DEJAR CONSTANCIA ESCRITA DE MI AGRADECIMIENTO A:

El Dr. José Manuel GONZÁLEZ ROS por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar este trabajo. Por su acertada dirección, su constante disponibilidad y sobre todo por su capacidad para poner luz cuando nos hemos perdido. Así mismo, por propiciar un ambiente de trabajo en grupo donde cada uno de sus miembros se hace responsable de una parte del trabajo.

Las personas que han formado parte del mencionado grupo de trabajo: la Dra. Asia M^a FERNÁNDEZ CARVAJAL, el Dr. Francisco GAVILANES y el Dr. Juan Pablo ALBAR. No quiero olvidarme de la fructífera colaboración establecida con el grupo del Dr. José LÓPEZ-BARNEO que nos ha permitido ampliar nuestro trabajo con las aportaciones de la Electrofisiología; agradeciendo al Dr. Antonio MOLINA la disponibilidad de sus registros electrofisiológicos para ser incluidos en esta Memoria, así como sus comentarios en la interpretación de estos datos. Al Dr. Emilio GIL que trabajó en nuestro laboratorio durante un año. También quiero agradecer al Dr. Luis Miguel GARCIA-SEGURA su ayuda en los estudios de crio-fractura, al Dr. Carlos GONZÁLEZ, al Dr. George LUNT y al Dr. Jeff SCHMITT su ayuda y comentarios sobre el modelaje asistido por ordenador del péptido ShB; al Dr. Emilio CAMAFEITA y al Dr. Enrique MÉNDEZ su trabajo de análisis de espectrometría de masas.

El Dr. Gregorio FERNÁNDEZ-BALLESTER por ayudarme a dar mis primeros pasos en el campo del FT-IR. De inestimable ayuda para afianzar mis conocimientos en este campo fue la estancia de dos meses que realicé en el laboratorio del Dr. José Luis RODRIGUEZ ARRONDO, donde trabajé con Izaskun ECHABE en un estudio de análisis de ruido de espectros de infrarrojo. También allí pude mantener instructivas conversaciones con el Dr. Arturo MUGA.

El Dr. Antonio Vicente FERRER-MONTIEL que llevó a cabo los experimentos de fosforilación por tirosin-quinasa de péptidos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Su entusiasmo y deseos de trabajar son un ejemplo a seguir. Espero que futuras colaboraciones me den la oportunidad de seguir aprendiendo de él.

Afortunadamente también he vivido enriquecedoras experiencias fuera de los laboratorios con otras muchas personas durante estos cuatro últimos años de estancia en Alicante. A todos gracias por compartir su tiempo conmigo.

Finalmente, he de dar las gracias a mis nuevos compañeros de laboratorio por su apoyo. Espero que la nueva andadura que iniciamos en el Centro de Biología Molecular y Celular sea larga y fructífera. En especial, quiero agradecer a la Dra. Amparo ESTEPA su amistad y apoyo.

ABREVIATURAS

ΔH	Entalpía
ΔS	Entropía
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ARN	Acido ribonucleico
ASIB	1-(<i>p</i> -azidosalicilamido)-4-(iodoacetamido)butano
ATP	Adenosintrifosfato
ATR	Reflectancia total atenuada
CAPS	Ácido 3-[ciclohexilamino] 1-propanosulfónico
CD	Dicroísmo circular
células CHO	Células de ovario de hámster chino
CHAPS	3-[(3 colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CHES	Ácido 2-[N-ciclohexilamino]etanosulfónico
D ₂ O	Agua deuterada
DMPA	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfato
DMPC	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DMPG	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTGS	Detector de sulfato de triglicina deuterado
DTT	1,4 ditioneitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol- bis (β -aminoetileter) N,N,N',N' tetraacético
EPPS	N-[2-Hydroxietyl] piperazina N'-[ácido 3 propanosulfónico]
ESR	Resonancia electrónica de spin
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
HEPES	N-[2-Hydroxietyl] piperazina N'-[ácido 2 etanosulfónico]
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IMPs	Partículas intramembrana
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico
NBD-iodoacetamida	(N, N'-dimetil-N-(iodoacetil)-N'-(7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol-4-metil) etilendiamino
NGF	Factor de crecimiento nervioso
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Fosfatidilglicerol
PKA	Protein-quinasa A
PKC	Protein-quinasa C
Pyr-iodoacetamida	N-(1-pireno) iodoacetamida
Rho-iodoacetamida	Tetrametilrodamina-5-(y-6)-iodoacetamida
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
T _c	Temperatura de transición
TEA	Tetraetilamonio
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
T _m	Temperatura de máxima capacidad calorífica
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
UV	Ultravioleta
ZPD	Diferencia de trayecto cero

1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS CANALES DE K⁺ DEPENDIENTES DE VOLTAJE.....	1
1.1. DESARROLLO HISTÓRICO.....	1
1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO.....	1
1.3. <i>SHAKER</i> Y OTROS GENES QUE CODIFICAN PARA CANALES DE K ⁺ DEPENDIENTES DE VOLTAJE... 4	4
1.3.1. LOS CANALES DE K ⁺ TIPO <i>SHAKER</i> DE <i>DROSOPHILA</i>	4
1.3.2. LOS CANALES DE K ⁺ TIPO <i>SHAKER</i> DE MAMÍFEROS.....	6
1.3.3. SEGREGACIÓN SUBCELULAR DE CANALES DE K ⁺ EN CÉLULAS EXCITABLES.....	8
1.4. SUBUNIDADES QUE COMPONEN LOS CANALES DE K ⁺ NEURONALES PURIFICADOS.....	9
1.5. BASES ESTRUCTURALES QUE DETERMINAN LA FUNCIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE.....	9
1.5.1. LA ACTIVACIÓN ES UN FENÓMENO DEPENDIENTE DE VOLTAJE.....	10
1.5.2. CONDUCTANCIA IÓNICA.....	12
1.5.2.1. La boca extracelular del poro.....	13
1.5.2.2. La boca intracelular del poro.....	15
1.5.2.3. El segmento H5.....	15
1.5.3. MECANISMOS MOLECULARES DE LA INACTIVACIÓN DE LOS CANALES DE K ⁺	17
1.5.4. LA INACTIVACIÓN RÁPIDA INDUCIDA POR LA SUBUNIDAD β	21
1.5.5. LA INACTIVACIÓN LENTA O TIPO C.....	21
1.5.6. UN MODELO ESTRUCTURAL DE LOS CANALES DE K ⁺ DEPENDIENTES DE VOLTAJE.....	22
1.6. PROTEÍNAS ASOCIADAS A CANALES K ⁺	23
1.7. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS CANALES DE K ⁺ POR PROCESOS DE FOSFORILACIÓN Y DESFOSFORILACIÓN.....	25
1.7.1. FOSFORILACIÓN DE CANALES DE POTASIO POR SERIN/TREONIN-QUINASAS.....	26
1.7.2. REGULACIÓN DE CANALES DE K ⁺ POR FOSFORILACIÓN EN TIROSINAS.....	27
2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.	29
2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	29
2.2. INSTRUMENTACIÓN.....	31
2.2.1. LOS INSTRUMENTOS DISPERSIVOS.....	31
2.2.2. LOS INSTRUMENTOS CON TRANSFORMADA DE FOURIER.....	32
2.2.3. ASPECTOS TÉCNICOS EN EL ESTUDIO DE MUESTRAS.....	36
2.3. ASPECTOS TEÓRICOS DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	36
2.4. ASIGNACIÓN DE BANDAS DE INFRARROJO EN PROTEÍNAS.....	38
2.5. BANDAS DE ABSORCIÓN DEL AGUA.....	40
2.6. PROCESAMIENTO DE DATOS Y TÉCNICAS DE AUMENTO DE RESOLUCIÓN.....	40
2.6.1. DESCONVOLUCIÓN DE FOURIER.....	41
2.6.2. DERIVADA.....	42
2.6.3. ELIMINACIÓN DE RUIDO.....	43
3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	44
4. OBJETIVOS	46
5. MATERIALES.....	47
6. MÉTODOS.....	47
6.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS.....	47
6.1.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.....	47

6.1.2. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.....	48
6.1.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	50
6.1.4. DERIVATIZACIÓN DE PÉPTIDOS CON LA Sonda FOTOACTIVABLE ASIB.....	50
6.2. DICROÍSMO CIRCULAR.....	51
6.3. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	51
6.4. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO.....	53
6.5. MEDIDAS DE FLUORESCENCIA.....	53
6.5.1. MARCAJE DE PÉPTIDOS DERIVATIZADOS CON CISTEINA CON SONDAS FLUORESCENTES.....	53
6.5.2. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUEÑAS (SUV).....	54
6.5.3. ENSAYO DE UNIÓN DE PÉPTIDOS A VESÍCULAS LIPÍDICAS.....	54
6.5.4. ENSAYO DE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE FLUORESCENCIA.....	56
6.5.5. ENSAYO DE FORMACIÓN DE EXCÍMEROS DE PIRENO.....	57
6.6. ESTUDIOS DE CRIOFRACTURA.....	57
6.7. HIDRÓLISIS CON TRIPSINA DE COMPLEJOS PÉPTIDO-LIPOSOMA.....	57
6.8. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS: "PATCH-CLAMP" EN CÉLULAS CHO.....	58
6.9. ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN Y DESFOSFORILACIÓN IN VITRO.....	60
7. RESULTADOS.....	62
7.1. ESTUDIOS CONFORMACIONALES DE LOS PÉPTIDOS EN SOLUCIÓN ACUOSA.....	62
7.2. UNIÓN DE PÉPTIDOS A VESÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS.....	77
7.3. ESTUDIOS DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	81
7.3.1. INSERCIÓN DEL PÉPTIDO SHB EN BICAPAS LIPÍDICAS.....	81
7.3.2. ESTUDIOS DE SEPARACIÓN DE FASES.....	82
7.4. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN DE PÉPTIDOS.....	86
7.4.1. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA POR RESONANCIA.....	86
7.4.2. FORMACIÓN DE EXCÍMEROS DE PIRENO.....	87
7.5. ESTUDIOS DE CRIOFRACTURA DE LA INSERCIÓN DEL PÉPTIDO SHB EN MEMBRANAS FOSFOLIPÍDICAS.....	91
7.6. HIDRÓLISIS CON TRIPSINA DEL PÉPTIDO SHB INSERTADO EN VESÍCULAS DE ÁCIDO FOSFÁTICO (PA).....	92
7.7. SÍNTESIS DE UN ANÁLOGO FOTOACTIVABLE DEL PÉPTIDO INACTIVANTE DEL CANAL DE K ⁺ SHAKER B.....	95
7.7.1. SÍNTESIS DE LOS PÉPTIDOS DERIVATIZADOS CON ASIB.....	95
7.7.2. ESTUDIOS DE INACTIVACIÓN DEL CANAL DE POTASIO SHB Δ 4-46 POR DIFERENTES PÉPTIDOS DERIVADOS DEL PÉPTIDO INACTIVANTE SHB.....	98
7.7.3. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DEL PÉPTIDO INACTIVANTE DERIVATIZADO CON ASIB.....	99
7.7.4. FOTÓLISIS DE LOS PÉPTIDOS DERIVATIZADOS CON ASIB EN SOLUCIÓN ACUOSA.....	100
7.8. PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DEL PÉPTIDO SHB FOSFORILADO EN Y8.....	103
7.8.1. EL PÉPTIDO SHB COMO SUSTRATO DE LA QUINASA SRC Y DE LA TIROSIN- FOSFATASA 1B.....	103
7.8.2. EL PÉPTIDO SHB-Y8(P) PIERDE SU CAPACIDAD DE INDUCIR LA INACTIVACIÓN RÁPIDA AL CANAL SHB Δ 4-46.....	103
7.8.3. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DEL PÉPTIDO SHB-Y8(P).....	105
7.8.4. ESTUDIO DE INSERCIÓN DEL PÉPTIDO SHB-Y8(P) EN BICAPAS FOSFOLIPÍDICAS.....	108
8. DISCUSIÓN.....	111

8.1. INTERACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS SHB Y SHBL7E CON VESÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS	111
8.2. EL PÉPTIDO SHB-21C-ASIB: UN ANÁLOGO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL PÉPTIDO SHB.	124
8.3. MODULACIÓN DE LA CAPACIDAD INACTIVANTE DEL PÉPTIDO SHB MEDIANTE FOSFORILACIÓN POR TIROSIN-QUINASA EN Y8.....	127
9. CONCLUSIONES	131
10. BIBLIOGRAFÍA	133
11. APÉNDICES.....	144
11.2. ANÁLISIS MATEMÁTICO DETALLADO DEL CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN EN LOS EXPERIMENTOS DE UNIÓN DE PEPTIDO-NBD A VESÍCULAS LIPÍDICAS.....	144

1. Estructura y función de los canales de K⁺ dependientes de voltaje.

1.1. Desarrollo histórico.

A principios de los años 50 Hodgkin, Huxley y Katz perfeccionan la técnica de registro electrofisiológico de "fijación de voltaje" (*Voltage-clamp*), lo que permitió realizar una descripción cuantitativa de los cambios de la permeabilidad iónica que tienen lugar durante el desarrollo del **potencial de acción** en una preparación del axón gigante del calamar. En estos trabajos (Hodgkin, Huxley y Katz, 1952; Hodgkin y Huxley, 1952 a-d) se propone un modelo en el que la membrana puede distinguir entre el paso de iones de Na⁺ y K⁺ modificando su permeabilidad relativa para ambos iones de manera independiente. En dicho modelo se describe que tiene lugar inicialmente la activación de una corriente transitoria de entrada de Na⁺, responsable de la despolarización de la membrana; y por otra parte la activación, con un cierto retraso (*delayed rectifier*), de una corriente no inactivante de salida de K⁺, que daba cuenta de la repolarización observada al final del potencial de acción. El transporte selectivo de iones debía estar mediado por **transportadores** o **poros** con una actividad dependiente del voltaje de la membrana. Así pues, el papel asignado a las corrientes de K⁺ en células excitables es estabilizar el potencial de membrana cerca del potencial de equilibrio de Nernst para el potasio, alejando el potencial del valor umbral de disparo del potencial de acción.

Durante las tres décadas siguientes se redefinió la teoría iónica desde un punto de vista más molecular. Ello fue posible gracias al desarrollo de la técnica de "*patch-clamp*" (Hamill y cols., 1981) y a la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Con los nuevos estudios se puso de manifiesto la existencia de moléculas proteicas responsables del paso de los iones a través de la membrana, los **canales iónicos**, y se postulan para ellos una serie de conceptos mecanicistas (poro iónico, filtro de selección, sensor de voltaje, compuertas de activación e inactivación) que aún hoy en día tratan de asignarse a dominios o zonas concretas de la secuencia de estas proteínas.

1.2. Clasificación de los canales de potasio.

Los canales de K⁺ son probablemente el tipo de canales más antiguo, numeroso, diverso y ubicuo de canales iónicos dependientes de voltaje, ya que virtualmente se encuentran en todas las células eucariotas, desde las levaduras hasta neuronas de mamíferos. En las neuronas finalizan los potenciales de acción, ya que repolarizan la

membrana y la llevan a su potencial de reposo (Rudy, 1988). Su gran variedad de propiedades biofísicas hace posible que puedan llevar a cabo múltiples funciones.

Las corrientes generadas a través de canales de potasio son siempre inhibitorias: corrientes de salida que deben ser superadas por corrientes de entrada de Na^+ o Ca^{2+} para que se pueda provocar un nuevo potencial de acción. Así, desde un punto de vista fisiológico, juegan un importante papel en la regulación de la excitabilidad neuronal, estableciendo el potencial de reposo, modificando la frecuencia de disparo de potenciales de acción, finalizando periodos de actividad eléctrica intensa y de forma general inhibiendo la actividad eléctrica de las neuronas.

Los canales de K^+ pueden subdividirse desde un punto de vista biofísico en tres grandes grupos: 1) canales dependientes de voltaje, que a su vez comprenden los tipos inactivantes (corrientes de tipo A) y no inactivantes o "*delayed rectifier*" 2) canales "rectificadores de entrada" (*inward rectifier*) y 3) canales dependientes de ligando, cuya actividad puede depender de Ca^{2+} , Na^+ ATP, proteínas G, etc. En cada uno de estos grupos se encuentran diversos miembros y la delimitación entre los grupos es flexible (Rehn, 1991).

Los canales de K^+ dependientes de voltaje inactivantes o **canales tipo A** dan lugar a un tipo de corrientes de potasio cuyas cinéticas de activación e inactivación se parecen a las de las corrientes de sodio responsables de la propagación del potencial de acción axónico. Es frecuente que coexistan con corrientes no inactivantes, ejerciendo un papel inhibitorio que ayuda a regular de forma más precisa la respuesta eléctrica de la célula. Ante una despolarización de la membrana producen la activación rápida de una corriente transitoria, cuya inactivación, que también es rápida, transcurre en un rango de 20-100 ms. Las representaciones de corriente frente al voltaje en el estado estacionario muestran que la corriente conduce en un estrecho rango de potenciales negativos (-65 a -45 mV), lo que define su función principal, que no es otra sino ralentizar la frecuencia de disparo de una neurona. Al potencial de membrana en reposo estos canales permanecen en estado inactivado (no conductor). Durante la hiperpolarización, que ocurre tras un primer potencial de acción, estos canales pasan a un estado no conductor o inactivado y contribuyen al mantenimiento de dicha hiperpolarización junto con la corriente no inactivante. Ante un nuevo estímulo

eléctrico se tarda más tiempo en alcanzar el potencial umbral, lo que supone una disminución de la frecuencia de disparo de potenciales de acción (ver **Fig. 1**).

Los canales de K^+ dependientes de voltaje no inactivantes **rectificadores retrasados** (*delayed rectifier*) son el grupo más variado y frecuentemente coexisten en una misma célula más de un tipo. Se activan lentamente en respuesta a una despolarización de la membrana y se inactivan, también lentamente, con cinéticas del orden de cientos de milisegundos a segundos. De esta forma, reducen la duración del potencial de acción y son también responsables del periodo refractario que limita la frecuencia de conducción de impulsos a través de los axones (ver **Fig. 1**).

Los canales de K^+ del tipo **rectificador de entrada** (*inward rectifier*) presentan una mayor permeabilidad de entrada de potasio al interior celular que de salida. Ello se debe a un bloqueo intracelular por iones de magnesio o a una activación hacia potenciales más negativos que el potencial de Nerst del potasio, o a ambas razones. La rectificación depende de la concentración extracelular de K^+ y se desplaza a valores menos negativos conforme es mayor la concentración extracelular de este ión. Su importancia fisiológica reside en que contribuyen a mantener el potencial de membrana cercano al potencial de Nerst, a mantener las despolarizaciones prolongadas en células ventriculares o a evitar una doble fertilización en ovocitos. A potenciales más negativos que el de equilibrio para potasio generan una corriente de entrada mayor que contrarresta la hiperpolarización generada por la actividad electrogénica de la bomba de sodio.

El estudio bioquímico de los canales de K^+ dependientes de voltaje se ha visto dificultado por la pequeña cantidad de proteína que se encuentra en las células, a diferencia de lo que ocurre con el receptor nicotínico de acetilcolina; así como a la falta de ligandos específicos de gran afinidad. Desde mediados de los años 80 comenzaron a utilizarse moléculas como las aminopiridinas, quinidinas y el tetraetilamonio (TEA), que son poco específicas y tienen baja afinidad. Sin embargo, a partir de los años 1987/88 la investigación sobre los canales de K^+ experimenta un importante avance, explicable por dos razones; la primera es que se asocia la mutación *Shaker* de *Drosophila* con las corrientes de K^+ dependientes de voltaje, lo que permite el estudio genético que supone la clonación de varios ADN complementarios (ADNc) que codifican para canales de K^+ dependientes de voltaje (Papazian y cols., 1987; Timpe y

cols., 1988; Baumann y cols., 1987; Kamb y cols., 1987). En segundo lugar, se purifican y caracterizan canales de K^+ neuronales dependientes de voltaje con la ayuda de toxinas que se unen a los mismos con gran afinidad (Rehm and Lazdunski, 1988; Parcej and Dolly, 1989).

1.3. *Shaker* y otros genes que codifican para canales de K^+ dependientes de voltaje.

1.3.1. Los canales de K^+ tipo *Shaker* de *Drosophila*.

Shaker es una mutación asociada al comportamiento de *Drosophila melanogaster*, que hace que la mosca siga moviendo las patas después de ser anestesiada con éter (Catsch, 1944). Los trabajos electrofisiológicos con larvas mutantes *Shaker* de esta mosca permitieron relacionar el gen *Shaker* con canales de K^+ dependientes de voltaje (Jan y cols., 1977; Salkoff y Wyman, 1981). El gen se localiza en la banda politécnica 16 F, una región del cromosoma X de *Drosophila* con múltiples exones distribuidos sobre unas 65 kb de ADN genómico (Papazian y cols., 1987; Baumann y cols., 1988). Las modificaciones alternativas de los ARN transcritos inicialmente a partir del gen *Shaker* dan lugar a diferentes ARN mensajeros que se traducen en distintas proteínas (Schwarz y cols., 1988; Pongs y cols., 1988; Kamb y cols., 1988). Estas proteínas presentan una región central común, que se corresponde con ocho exones pero con diferentes extremos N-terminal y C-terminal, de disposición intracelular. Cuando estas proteínas son expresadas en oocitos en su mayoría inducen corrientes de K^+ dependientes de voltaje con inactivación rápida (Tipo A) (Timpe y cols., 1988; Iverson y cols., 1988; Stocker y cols., 1990). Las proteínas codificadas por el gen *Shaker* se expresan fundamentalmente en el Sistema Nervioso Central (Pongs y cols., 1988).

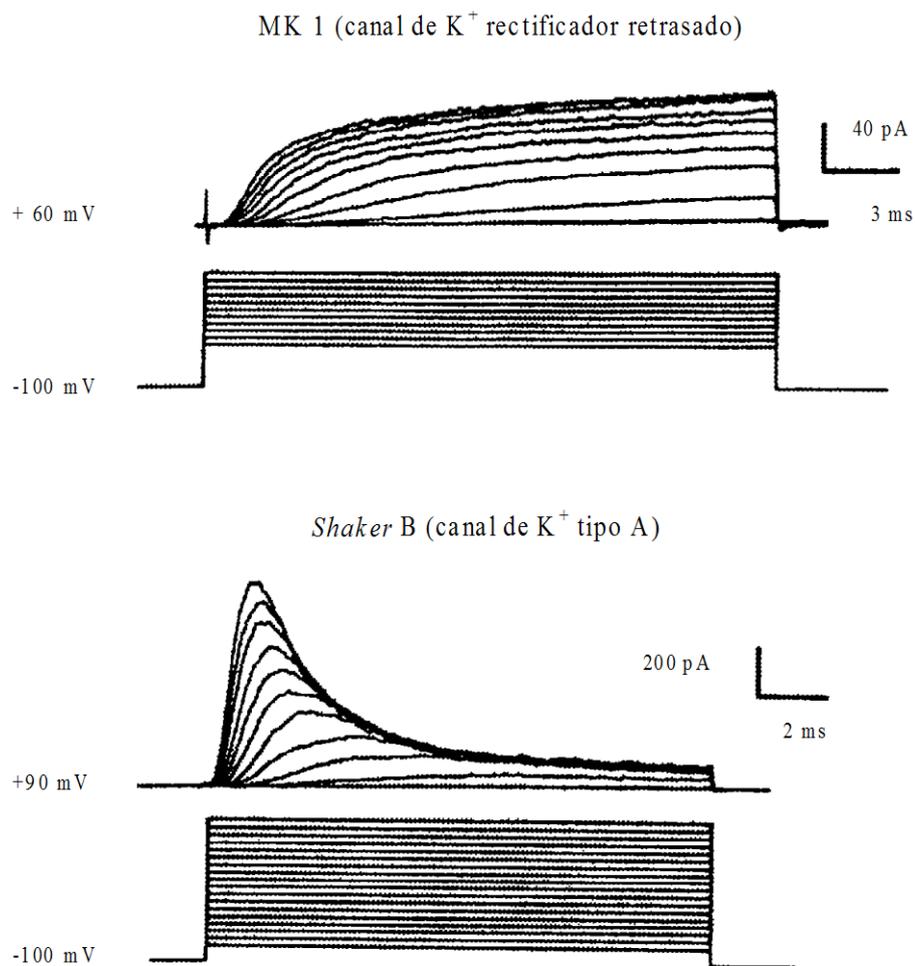


Fig. 1. Corrientes de K⁺ provocadas por pulsos despolarizantes en canales de potasio clonados a partir de mamífero y de *Drosophila*: ejemplo de canales rectificadores retrasados y canales tipo A, respectivamente. Las respuestas fueron observadas en oocitos de *Xenopus leavis* inyectados con ARN mensajero transcrito *in vitro* a partir de ADNc de los canales MK 1 (mamífero) y *Shaker B* (*Drosophila*). Las corrientes iónicas se registraron con la técnica de "patch-clamp" en la modalidad de "cell-attached". (Tomado de Remh, 1991).

Después de la clonación del gen *Shaker* y basándose en la homología de secuencias se identificaron otras tres subfamilias de genes en *Drosophila*: *Shal*, *Shab* y *Shaw* situados en el segundo y tercer cromosoma, respectivamente (Butler y cols., 1989). Cuando estos genes son expresados en oocitos, *Shal* da lugar a canales de K⁺ tipo A, mientras que *Shab* y *Shaw* originan rectificadores retrasados. También experimentan modificaciones postranscripcionales alternativas dando lugar a subfamilias de canales de K⁺, que siempre comparten una estructura primaria similar. La masa molecular de las proteínas canal expresadas a partir de *Shal*, y *Shaw* es de 56 kDa, mientras que la de *Shab* es de 100 kDa.

El canal *Shaker B* es una de las cinco variantes conocidas de modificación postranscripcional en el extremo N-terminal (Schwarz y cols., 1988; Pongs y cols., 1988;

Kamb y cols., 1988). Las cinco secuencias alternativas difieren en su longitud, entre 9 y 61 aminoácidos, y su secuencia es diferente. Sin embargo, tres de las variantes poseen inactivación rápida (ShB, ShC y ShD) (Aldrich y cols., 1990; Timpe y cols., 1988; Zagotta y cols., 1989), mientras que las otras dos (ShD2 y ShH37) se inactivan mucho más lentamente con constantes de tiempo de cientos de ms (Iverson y cols., 1988; Stocker y cols., 1990).

1.3.2. Los canales de K⁺ tipo *Shaker* de mamíferos.

Los genes de *Drosophila Shaker*, *Shal*, *Shab*, *Shaw* tienen uno o más genes homólogos en mamíferos (ver **Tabla 1**). Partiendo de secuencias de los canales de K⁺ clonados en *Drosophila* y usando condiciones de baja astringencia y posterior amplificación por la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se han clonado una gran cantidad de canales de potasio en mamíferos (Tempel y cols., 1988; Baumann y cols., 1988; MacKinnon y Miller, C., 1989; Wei y cols., 1990; MacCormack y cols., 1990; Kirsch y cols., 1991). La diferente nomenclatura adoptada por los distintos laboratorios para nombrar los numerosos clones indujo gran confusión. Gutman y Chandy (1993) propusieron una nomenclatura sistemática que evitara tales confusiones. Dicha nomenclatura asigna nombres que tienen la forma "Kv3.1", que indica canal de potasio ("K") con dependencia de voltaje ("v"), miembro de la tercera subfamilia (relacionada con el gen *Shaw*) ("3") y primer miembro descrito del grupo ("1"). Se definen las subfamilias en relación con los genes de *Drosophila*: Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*Shab*), Kv3 (*Shaw*) y Kv4 (*Shal*).

Esta diversidad de canales de K⁺ tipo *Shaker* en mamíferos se debe a la existencia de diferentes genes y no a modificaciones postranscripcionales alternativas (Stühmer y cols., 1989; Chandy y cols., 1990). Se trata también de proteínas con seis segmentos transmembrana (S1-S6), y con una secuencia H5 entre los segmentos S5 y S6 con diferentes sitios de glicosilación y fosforilación. Su masa molecular varía entre 56 y 73 kDa. La inyección de ARNs complementarios a los genes tipo *Shaker* de mamífero en oocitos de *Xenopus* induce la aparición de corrientes de K⁺ no inactivantes o de inactivación lenta, es decir, rectificadores retrasados (Stühmer et al, 1989; Christie y cols., 1989; Kirsch y cols., 1991), no obstante, existen marcadas diferencias en el curso temporal de la inactivación de estos canales. Por ejemplo, RCK4 se inactiva casi completamente después de 350 ms de despolarización, mientras que RCK1 y RCK5

mantienen el 80 % y el 60 %, respectivamente, del pico de corriente máxima después de más de 3 s de despolarización (Stühmer y cols., 1989). La homología de secuencia entre los distintos tipos de canales de K^+ es mayor en la zona transmembrana, con una identidad de aminoácidos de hasta un 40 % para canales de distintas subfamilias y del 70 % para miembros de la misma subfamilia.

Tabla 1. Nomenclatura de los genes clonados que codifican para canales de potasio dependientes de voltaje en mamíferos (Adaptado de Gutman y Chandy, 1993).

Nombre estándar	Nombres usados:		
	Ratón	Rata	Humano
Subfamilia 1 relacionada con el gen <i>Shaker</i> :			
Kv1.1	MBK1, MK1	RCK1, RBK1, RK1	HuK(I)
Kv1.2	MK2, MK5	BK2, RCK5, NGK1, RK2, RAK	HuK(IV)
Kv1.3	MK3	RCK3, RGK5, KV3	HuK (III), hPCN3, HLK3, HGK5
Kv1.4	MK4	RCK4, RHK1, RK4, RK8	HuK(II), hPCN2, HK1
Kv1.5	-	KV1, RK3, RMK2	HuK(VI), hPCN1, HK2, HCK1
Kv1.6	MK3, MK6	RCK2, KV2	HBK2, HuK(V)
Kv1.7	MK6, MK4	RK6	-
Subfamilia 2 relacionada con el gen <i>Shab</i> :			
Kv2.1	MShab	DRK1	-
Kv2.2	-	CDRK	-
Subfamilia 3 relacionada con el gen <i>Shaw</i> :			
Kv3.1	NGK2, mShaw22	Kv4	hKv3.1, NGK2- KV4
Kv3.2	MShaw12	Rshaw12, RKShIII A, Raw 1, rKv3.2	HKShIII A
Kv3.3	mKv3.3, mShaw19	RKShIIID	HKShIIID, hKv3.3
Kv3.4	MKv3.4	Raw3	HKShIIIC
Subfamilia 4 relacionada con el gen <i>Shal</i> :			
Kv4.1	MShal	-	-
Kv4.2	-	RK5, Shal1	-
Kv4.3	-	RKShIVB	-

El perfil de hidrofobicidad deducido a partir de la secuencia primaria de los canales de K^+ indicaba un patrón estructural muy parecido a uno de los cuatro dominios estructurales típicos de los canales de Na^+ y Ca^{2+} , lo que llevó a pensar que se trataría de proteínas oligoméricas con una estequiometría de cuatro subunidades por canal. Efectivamente, los canales de potasio son proteínas tetraméricas (MacKinnon, 1991; Liman y cols., 1992). Los miembros de una misma subfamilia son capaces de

formar canales heteromultiméricos en sistemas de expresión heterólogos con propiedades intermedias entre los homoméricos (MacCormack y cols., 1990; Ruppertsberg y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; MacKinnon, 1991). No parece posible la formación de canales heteromultiméricos entre miembros de distintas subfamilias, posiblemente debido a restricciones moleculares al proceso de ensamblaje de subunidades. A este respecto, se conoce una región en la zona N-terminal que parece implicada en la regulación de los procesos de ensamblaje (Li y cols., 1992; Shen y cols., 1993).

1.3.3. Segregación subcelular de canales de K^+ en células excitables.

Registros electrofisiológicos realizados en diferentes zonas de células excitables sugieren que una misma célula expresa diferentes tipos de canales de K^+ tanto de una misma subfamilia como de diferentes subfamilias. No está totalmente aclarado cómo una célula determina qué tipos de canales expresa y cómo se distribuyen en los distintos compartimentos subcelulares. La formación de un gran número de canales heteromultiméricos es posible a partir de unos pocos genes de una misma subfamilia. La regulación de la expresión diferencial de canales de K^+ por parte de una célula puede responder a diferentes mecanismos: 1) regulación de la expresión génica, 2) regulación del procesamiento alternativo postransduccional, 3) formación de canales homoméricos o heteromultiméricos dependiendo de restricciones moleculares al coensamblaje, 4) control del tránsito vesicular subcelular. Ninguno de ellos tiene porqué ser excluyente y posiblemente el resultado final dependa de su acción conjunta.

Estudios de localización subcelular de canales de K^+ realizados en neuronas de Sistema Nervioso Central de rata utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-canal de K^+ ponen de manifiesto que dentro de un mismo tipo neuronal se expresan varios tipos de canales de K^+ tipo A; por ejemplo en neuronas del giro dentado se han localizado tres clases de canales tipo A: RCK4, Raw 3 y *RShal* (Rettig y cols., 1992; Sheng y cols., 1992). Las proteínas se localizan en áreas subcelulares concretas, RCK4 y Raw 3 en la zona presináptica (axón) y *RShal* en la zona somatodendrítica o postsináptica. En el cerebelo, la regulación ocurre al nivel de la transcripción, habiéndose detectado *RShal* en la capa granular, RCK4 en el núcleo cerebeloso y Raw3 en las células de Purkinje. Varios miembros de la subfamilia RCK se expresan a la vez en neuronas de cerebro de rata. En unos casos son transportadas a los distintos compartimentos

subcelulares, por ejemplo RCK1 y RCK5 son transportados a las regiones presinápticas de las células en cesta del cerebelo, pudiendo formarse heteromultímeros; y en otros casos se transcriben diferentes proteínas, por ejemplo en las células de Purkinje, donde se detectan canales homoméricos RCK1 y RCK5 (Scott y cols., 1994).

1.4. Subunidades que componen los canales de K⁺ neuronales purificados.

La dendrotoxina es una toxina polipeptídica básica usada para identificar y purificar tanto canales tipo A como rectificadores retrasados en cerebro de mamíferos. Su sitio de unión al canal lo es también para otros péptidos ligandos: caribdotoxina, β -bungarotoxina y el péptido MCD (Rehm y Lazdunski, 1988). Estudios de marcaje por fotoafinidad con β -bungarotoxina ponen de manifiesto la existencia de dos componentes peptídicos de 75 kDa y 28 kDa en homogenados de cerebro de pollo (Schmidt y Betz, 1989). La purificación de proteínas unidas a dendrotoxina, a partir de membranas de cerebro de mamíferos solubilizadas con detergente permite igualmente distinguir dos componentes unidos de forma no covalente, uno de 75-80 kDa y otro más pequeño de 35-42 kDa, dependiendo de su estado de proteólisis (Rehm y Lazdunski, 1988). Al componente de bajo peso molecular, que no está N-glicosilado, se le ha denominado **subunidad β** .

Se ha clonado y determinado la estructura primaria de la subunidad β asociada a los canales de potasio sensibles a dendrotoxina de cerebro de rata (Scott y cols., 1994). Se trata de una proteína de 367 aminoácidos (41 kDa) sin glicosilar. En su secuencia contiene varios sitios para fosforilación y es sustrato de una proteína quinasa dependiente de AMPc. Aunque en estas características se parece a la subunidad β de los canales de calcio, no presentan homologías de secuencia.

Cuando se expresan a la vez las subunidades α y β , tanto de los canales de K⁺ como de los de Ca²⁺, se acelera el curso temporal tanto de la activación como de la inactivación, aunque en ambos casos no está totalmente claro el mecanismo de acción de ambas subunidades auxiliares (Rettig et al, 1994).

1.5. Bases estructurales que determinan la función de los canales iónicos dependientes de voltaje.

La clonación molecular, la purificación y la determinación de la estructura primaria de las principales subunidades de los canales de sodio, calcio y potasio han permitido disponer de un modelo molecular que pone de manifiesto las relaciones

entre estructura y función. La estructura de cada una de las principales subunidades de cada tipo de canales posee el mismo motivo: cuatro subunidades homólogas que probablemente contienen seis segmentos transmembrana con estructura de α -hélice, que se disponen alrededor de un poro central acuoso que permite el paso de iones (ver **Fig. 2**).

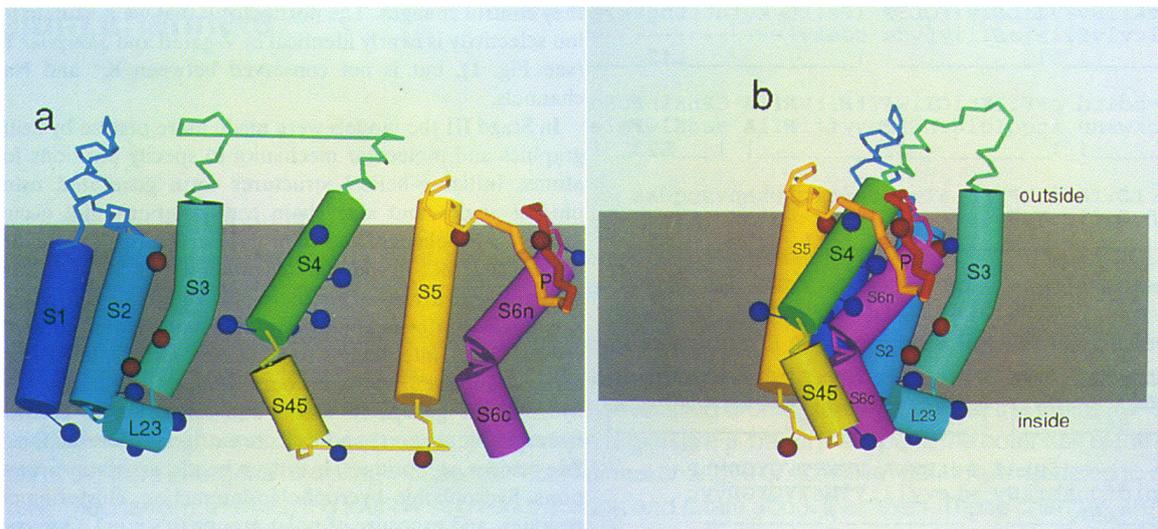


Fig. 2. Posible topología de los segmentos transmembrana de cada una de las subunidades de un canal de K^+ tipo *Shaker*. El modelo incluye seis segmentos transmembrana, de S1 a S6, posiblemente con estructura en α -hélice y la región formadora del poro (P), también llamada H5 ó SS1-SS2, formada por dos hojas β (**2.a**). Se postula la existencia de dos α -hélices anfipáticas que se insertarían parcialmente en la membrana: S45 que conecta los segmentos S4 y S5, y L23 que uniría los segmentos S2 y S3 (**2.b**). (Tomado de Durrell y Guy, 1992).

1.5.1. La activación es un fenómeno dependiente de voltaje.

En el modelo inicialmente propuesto por Hodgkin y Huxley, (1952) se postulaba que la dependencia de voltaje que marcaba la activación de las corrientes de Na^+ y K^+ radicaba en la existencia de unas partículas cargadas, que sensibles al potencial de membrana se movían a través de ella para abrir o cerrar los transportadores.

Amstrong (1981) postuló un modelo de activación para canales de Na^+ dependientes de voltaje en el que unas estructuras cargadas positiva y negativamente interaccionarían electrostáticamente ante cambios del potencial de membrana, y desplazándose en forma de cizalla producirían la activación e inactivación del canal. Dado que la diferencia de potencial reside fundamentalmente en la parte transmembrana, cabría esperar que el "sensor de voltaje" se localizara en el interior de la membrana.

En la **activación** de los canales iónicos dependientes de voltaje un cambio en el potencial de la membrana provoca un cambio conformacional en la proteína que permite la apertura de un poro a través de ella. La despolarización de la membrana ejerce una fuerza eléctrica sobre un sensor de voltaje que contiene aminoácidos cargados dentro del campo eléctrico transmembrana del canal. El análisis de la estructura primaria de la subunidad α de los canales de sodio, que fue el primer miembro clonado de la familia de los canales iónicos activados por voltaje (Noda y cols., 1989), permitió predecir que el cuarto segmento transmembrana podía servir como sensor de voltaje. Este segmento tiene como motivos repetidos un residuo cargado positivamente (lisina o arginina) seguido de dos hidrofóbicos. La predicción de que esos residuos cargados positivamente formaban parte del sensor de voltaje se ha investigado con estudios de mutagénesis dirigida y expresión en sistemas celulares tanto de canales de Na^+ (Stühmer y cols., 1989) como de K^+ (Papazian y cols., 1991).

El segmento S4 de los canales de K^+ posee una distribución de cargas positivas que sigue el patrón $(\text{R/K-X-X})_n$, donde n puede valer entre 4 y 7. Mutaciones puntuales en estas cargas desplazan la curva de activación del canal de potasio *Shaker* (Papazian y cols., 1991).

El mecanismo por el que el segmento S4 actúa como sensor de voltaje se desconoce, aunque se han propuesto diversos modelos para explicarlo, que cuentan con cierto apoyo de datos experimentales (Durrell y Guy, 1992; Guy y Conti, 1990). La despolarización de la membrana provoca un movimiento de cargas del sensor de voltaje, debido a la reorganización de aminoácidos cargados que es responsable de las llamadas **corrientes de compuerta** (Armstrong y Bezanilla, 1973), las cuales son anteriores al inicio de la corriente iónica. Las corrientes de compuerta proporcionan información sobre los cambios conformacionales que ocurren durante el proceso de activación en la región transmembrana del canal. Este movimiento implicaría al menos a 10 de los 19 aminoácidos que se predice que forman el segmento S4 (Durrell y Guy, 1992), produciendo un desplazamiento perpendicular a la membrana plasmática, que expondría a dichos residuos al ambiente acuoso del poro del canal (Mannuzzu y cols., 1996). El movimiento de cargas que implica este desplazamiento de parte del segmento S4 estaría de acuerdo con el desplazamiento de las 12 a 16 cargas por canal medidas en las corrientes de compuerta (Sigworth, 1994). Sin embargo, existen datos

que parecen indicar que el segmento "sensor de voltaje" no se puede simplificar con un modelo estructural definido por la distribución de cargas en el segmento S4. Y ello porque mutaciones en residuos hidrofóbicos de dicho segmento, modifican la dependencia de voltaje del canal, de forma similar a la neutralización de cargas positivas (López y cols., 1991); además la dependencia de voltaje no es sólo sensible a la carga del S4, sino incluso a la naturaleza del residuo cargado (Papazian y cols., 1991). La neutralización de cargas del segmento S4, no tiene una correlación directa con modificaciones en las corrientes de compuerta (Papazian y cols., 1991; Logothetis y cols., 1992). Mutaciones de aminoácidos cargados negativamente que están muy conservados en los segmentos S2 y S3 de un canal de K⁺ clonado de cerebro modulan de forma selectiva las propiedades de compuerta del canal sin modificar sus propiedades de permeación. Por lo que debe considerarse que si bien ambos segmentos no parece probable que estén implicados en la formación de la pared del poro, si deben formar parte, junto con S4, de la estructura del canal sensible al voltaje (Planells y cols, 1995). Por otra parte, la presencia de un segmento típico S4 en canales no dependientes de voltaje (canal activado por GMPc) sugiere que ejerce funciones estructurales muy importantes para el empaquetamiento del canal (Jan y Jan, 1990).

Todos estos resultados parecen relacionar el segmento S4, con funciones estructurales de ensamblaje y transducción de la señal de apertura del canal. La localización de una secuencia con leucinas repetidas cada 7 aminoácidos en la unión entre los segmentos S4 y S5 ha sugerido una estructura del tipo "cremallera de leucinas", que puede tener importancia en el acoplamiento voltaje-activación. Sustituciones de estas leucinas, especialmente una localizada al final del segmento S4, desplazan notablemente la curva de activación del canal *Shaker* (McCormack y cols., 1991). De esta forma cabe suponer que durante la activación del canal se produce inicialmente un desplazamiento de cargas (movimiento dependiente de voltaje del segmento S4), que parece ser cooperativo entre las cuatro subunidades del canal (Tytgat and Hess, 1992); seguido de cambios conformacionales independientes de voltaje en los que están implicadas interacciones entre residuos hidrofóbicos.

1.5.2. Conductancia iónica.

Cualquier modelo estructural de los canales iónicos activados por voltaje supone la apertura de un poro transitorio en una proteína transmembrana con

estructura cuaternaria, en la que cada monómero contribuye a un cuarto de la pared del poro. Identificar los segmentos que forman el poro, así como los aminoácidos implicados en la conductancia y la selectividad iónica tiene gran importancia porque numerosas toxinas, drogas y cationes orgánicos bloquean estos canales. En muchos casos ese bloqueo se debe a que dichas moléculas entran y se unen a algún sitio del poro, compitiendo con los iones permeantes por ocupar dicho sitio. Precisamente estos bloqueadores del canal sirven como sondas específicas para delimitar las regiones intra- y extracelular del poro.

1.5.2.1. La boca extracelular del poro.

Tanto la tetrodotoxina como la saxitoxina bloquean los canales de Na^+ uniéndose con gran afinidad a la boca extracelular del poro. Neutralizando el Glu387 del dominio II del canal de Na^+ de cerebro de rata mediante experimentos de mutagénesis dirigida, expresión en un sistema celular y análisis de la funcionalidad del canal resultante; se ha podido definir un anillo de residuos carboxílicos al que se unirían estas toxinas catiónicas. La afinidad de la tetrodotoxina por el canal mutado disminuye unas 10.000 veces (Noda y cols., 1990). La unión de tetrodotoxina con gran afinidad a estos canales de sodio necesita el mantenimiento de aminoácidos ácidos tanto en la posición 387 del primer dominio como en las posiciones correspondientes a los otros tres restantes. Además de este anillo de residuos carboxílicos, es necesario para la unión a tetrodotoxina un segundo anillo de aminoácidos en posición 384; de estos, son ácidos los de los dominios I y II, básico el del dominio III y neutro el del dominio IV (Terlau y cols., 1991).

Los canales de Na^+ de músculo cardíaco tienen una afinidad 200 veces menor por la tetrodotoxina que los de cerebro y músculo esquelético, a pesar de que mantienen los ocho residuos antes mencionados formando esos dos anillos, supuestamente concéntricos, como requisito necesario para unirse a la toxina con gran afinidad. Sin embargo, en el segundo dominio del canal, dos restos hacia N-terminal de la posición que correspondería a la 387, hay una Tyr o Phe en los canales de cerebro y músculo esquelético, respectivamente; y una Cys en el canal de músculo cardíaco. La sustitución de esta Cys en el canal de músculo cardíaco por una Tyr o una Phe suponen un aumento de la afinidad por tetrodotoxina de 200 veces. Por el contrario, mutaciones

de la Tyr o Phe de los canales de cerebro y músculo esquelético por una Cys hacen que disminuya su afinidad unas 200 veces (Satin y cols., 1992; Heinemann y cols., 1992).

El cadmio bloquea con gran efectividad los canales de sodio de músculo cardíaco y no los de cerebro y músculo esquelético. Cuando la Tyr y Phe en los canales de cerebro y músculo se sustituyen por Cys, el bloqueo del canal es efectivo (Satin y cols., 1992; Backx y cols., 1992).

La caribdotoxina es un péptido que bloquea extracelularmente los canales de potasio uniéndose a la boca externa del poro. Se ha identificado una serie de residuos cargados negativamente situados en el segmento H5 (SS1-SS2) que son necesarios para mantener la unión a esta toxina con gran afinidad. Sustituirlos supone una considerable disminución de la afinidad. En los canales de K^+ activados por Ca^{2+} el bloqueo por este péptido se ve favorecido por la disminución de la fuerza iónica lo que sugiere la presencia de una región cargada negativamente cerca del sitio de unión a la toxina. MacKinnon y Miller (1989) y MacKinnon y cols. (1990) crearon mutaciones puntuales que modificaban la carga de los restos de esta región y observaron que la toxina disminuye unas 12 veces su afinidad con la mutación Glu422Lys, mientras que se incrementa 25 veces con la mutación Lys427Glu (ver **Fig 3**).

El tetraetilamonio (TEA) es un ion orgánico que también bloquea externamente los canales de K^+ con gran afinidad, siendo necesaria la presencia de una serie de residuos específicos tanto en el segmento SS1 como en el SS2. Es especialmente importante el residuo de la posición 449. La presencia de Tyr ó Phe en esta posición permite que el TEA bloquee con alta afinidad. Si el aminoácido es ácido el bloqueo ocurre con afinidad intermedia y si posee carga positiva no tiene lugar el bloqueo por TEA. La presencia de residuos de Phe en dicha posición en las cuatro subunidades de un canal de potasio, sugiere que debe formarse un complejo de coordinación entre los cuatro anillos fenólicos y el TEA estabilizado por interacciones entre los orbitales π y el cation (MacKinnon and Yellen, 1990; Kavanaugh y cols.,1991; Heginbotham y MacKinnon, 1992).

1.5.2.2. La boca intracelular del poro.

El verapamil y diversos derivados bloquean intracelularmente el poro de los canales de calcio con gran afinidad. El desmetoxivarapamil y un análogo suyo derivatizado con un grupo azida, se unen a canales de calcio purificados con gran afinidad (K_d del orden nM) y se han usado como sondas para localizar el sitio de unión de estos compuestos en la boca interna del poro. Se ha observado que en canales purificados sólo la subunidad α_1 se marca covalentemente con la sonda. El sitio concreto que se ha marcado se identifica proteolizando de forma exhaustiva la subunidad α_1 e inmunoprecipitando el fragmento fotomarcado con anticuerpos antipeptídico generados contra cada uno de los fragmentos resultantes de la hidrólisis. Dicho fragmento contiene el segmento S6, y por tanto debe formar parte de la boca intracelular de los canales de calcio (Striessnig y cols., 1990; Catterall y Striessnig, 1992).

Analizando mutaciones que alteran el bloqueo por TEA de canales de potasio desde el sitio intracelular se ha determinado que tanto aminoácidos del segmento H5 (SS1 y SS2) como de la parte intracelular del segmento S6 forman parte de la boca intracelular del poro. Así por ejemplo, el cambio del residuo residuo Thr441 (situado entre los segmentos SS1 y SS2 del canal *Shaker*) por una Ser supone una disminución de la afinidad por el TEA de unas 10 veces (Yellen y cols., 1991). Análogos del TEA con cadenas más o menos largas también necesitan la presencia de ese residuo de Thr para unirse al canal y bloquearlo. Además cambiando la Thr469, situada en la mitad del segmento S6 del canal *Shaker*, por un aminoácido hidrofóbico se incrementa significativamente la afinidad por estos alquilderivados del TEA (Choi y cols., 1993).

1.5.2.3. El segmento H5.

Cabría esperar que aquellos residuos de aminoácidos necesarios para que se produzca la unión de los compuestos que bloquean el poro, interaccionaran también con los iones permeantes y si los cambiamos deberíamos observar cambios notables en la conductancia y en la selectividad del canal quimera resultante. Hartmann y cols. (1991) estudian el transporte iónico en dos canales de K^+ del tipo rectificador retrasado: NGK2 y DRK1, el primero con una conductancia de 24 pS y que une TEA con gran afinidad y el segundo con la mitad de conductancia y baja afinidad por TEA. Construyen una quimera en la que transplantan el fragmento que une S5 y S6 del canal

NGK2 al canal DRK1. El resultado es que el canal DRK1 adquiere las propiedades del canal NGK2, por consiguiente, dicho fragmento está implicado en el transporte de K^+ .

Las treoninas 449 y 441 están implicadas en el bloqueo por TEA extra- e intracelular, respectivamente; si el TEA extracelular atraviesa una 19 % (Heginbotham y MacKinnon, 1992) del campo eléctrico transmembrana y un 15 % cuando su aplicación es intracelular (Yellen y cols., 1991), entonces sólo 8 aminoácidos atraviesan el 66 % restante del campo eléctrico. Si estos 8 aminoácidos adoptaran conformación en α -hélice ocuparían una longitud de 1,2 nm y razones electrostáticas impedirían que más de un ion se situara en ese corto poro; de hecho se sabe que el canal *Shaker* es multi-ion (Heginbotham y MacKinnon, 1992). Estos datos indican que H5 debería adoptar una conformación extendida (β), que ocuparía 2.7 nm. Sin embargo, la reciente determinación de la estructura tridimensional del canal Kcsa (Doyle y cols., 1998) pone de manifiesto que parte su segmento H5 tiene estructura helicoidal y otra parte (la implicada en la selectividad iónica) posee una estructura extendida (ver **Apéndice 4**).

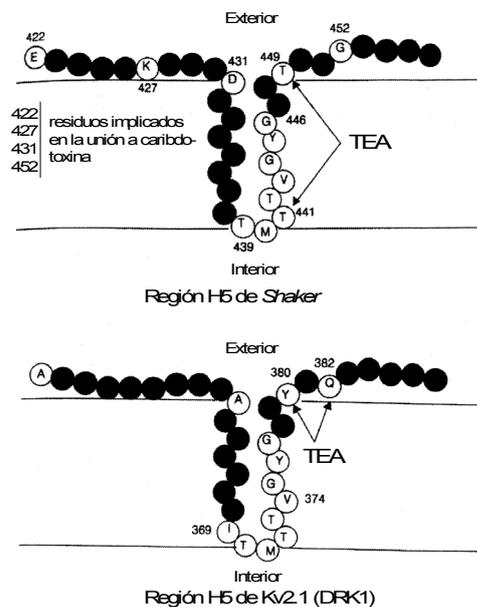


Fig. 3. Diagrama del segmento H5 del canal *Shaker* (parte superior) y del canal Kv2.1. Se señalan los residuos implicados en el bloqueo por TEA y caribdotoxina del canal *Shaker* así como los implicados en el bloqueo por TEA, Ba^{2+} y en la regulación de la selectividad iónica en los canales Kv2.1 (Tomado de Kukuljan y cols., 1995).

Yool y Schwarz (1991) introducen mutaciones en el segmento que forma la pared del poro buscando los residuos que discriminan entre los cationes monovalentes. Así por ejemplo la mutación Thr441Ser cambia la secuencia de selectividad medida a partir de la razón entre conductancias a nivel de canal único: $NH_4^+(1.42) > K^+(1) >$

Rb⁺(0.61), mientras que en el tipo salvaje la secuencia es K⁺(1) > Rb⁺(0.32) > NH⁴⁺(0.31) (ver **Fig. 3**).

Kirsch y cols. (1992a) y Kirsch y cols. (1992b) construyen quimeras utilizando Kv2.1 como canal receptor y Kv3.1 como canal donador del segmento H5, que difiere en 9 aminoácidos con el de Kv2.1. Sobre la quimera introducen mutaciones puntuales, dobles y triples para tratar de revertir a las propiedades del canal parental Kv2.1. Sólo la reversión triple Val369Ile/Leu374Val/Gln382Lys es capaz de restaurar las propiedades de conductancia a nivel de canal único y sensibilidad interna y externa a TEA del canal Kv2.1(ver **Fig. 3**).

Con aminoácidos hidrofóbicos en la posición 374 (Val o Ile) la conductancia para Rb⁺ es mayor que para K⁺, mientras que si el residuo es Thr o Ser, la razón de conductancias se invierte. Así se propone que la longitud de la cadena lateral del residuo en posición 374 actúa como filtro que distingue entre Rb⁺ y K⁺ (Tagliatela y cols., 1993) (ver **Fig. 3**).

1.5.3. Mecanismos moleculares de la inactivación de los canales de K⁺.

El proceso de inactivación fue inicialmente observado en corrientes de Na⁺ dependientes de voltaje en el axón gigante de calamar y en corrientes de Na⁺ de otros tipos celulares. La aplicación de proteasas en el lado citoplásmico permitía separar los procesos de activación e inactivación de las corrientes de Na⁺, sin que se viera afectada la dependencia de voltaje de la activación; ello permitía pensar que ambos procesos pudieran adscribirse a distintos dominios de la proteína. Por otra parte el TEA bloqueaba los canales de K⁺ rectificadores retrasados, que normalmente no inactivan, induciendo un proceso similar a la inactivación. Ambas observaciones permitían pensar que alguna partícula que formaba parte del canal bloqueaba el paso de iones cuando se unía a la boca interna del poro. Esta partícula o "bola" estaría unida al resto de la proteína por un polipéptido, la "cadena", que podría "cortarse" por hidrólisis enzimática (Bezanilla y Armstrong, 1972; Bezanilla y Armstrong, 1977).

En los canales de K⁺ dependientes de voltaje no se observa la homogeneidad en cuanto al comportamiento de la inactivación que presentan los canales de Na⁺ dependientes de voltaje. La inactivación transcurre en un rango de tiempo que va desde unos pocos ms a varios cientos de ms. Este amplio rango temporal también se observa en los canales clonados y expresados en sistemas heterólogos. El canal *Shaker*

B inactiva con una constante de tiempo de 1-3 ms (Iverson y cols., 1988; Timpe y cols., 1988), el canal drk1 tiene una inactivación mucho más lenta (Frech y cols., 1989) y los canales clonados de cerebro de mamíferos tienen un amplio rango de velocidades. En el caso extremo se encuentra el minicanal de K^+ que tarda varios s en inactivarse, aunque se trata de una proteína no relacionada estructuralmente con los canales dependientes de voltaje (Takumi y cols. 1988).

Iverson y Rudy (1990) realizaron diferentes construcciones variando los extremos N y C-terminal del canal *Shaker* y encontraron corrientes inactivantes y no inactivantes cuando los expresaron, atribuyendo esta diferencia a los distintos extremos N-terminal empleados.

Hoshi y cols. (1990) observaron que tratando con tripsina el lado citoplásmico de parches de membrana escindidos de la membrana de oocitos de *Xenopus* en los que habían inyectado ARN mensajero codificante para el canal *Shaker* B se produce una disminución de la velocidad de la inactivación, sin que se modifique la activación o la permeación de iones. El extremo N-terminal debe estar implicado en el proceso de inactivación, además en su secuencia primaria existen varios sitios susceptibles de ser hidrolizados por tripsina. Eliminando los 20 primeros aminoácidos se altera el proceso de la inactivación rápida de la misma manera que cuando se trata con tripsina. Así pues, deleciones de esta región incrementan el tiempo medio de apertura, el número de aperturas durante una ráfaga y disminuyen el intervalo de tiempo entre dos ráfagas en condiciones de registro de canal único; resultados que se correlacionan con la inactivación de la corriente macroscópica. Deleciones en la "cadena" no eliminan el proceso de inactivación rápida sino que hacen que disminuya el tiempo medio de apertura de una forma proporcional a la longitud de la secuencia delecionada.

El modelo de "bola y cadena" predice que la adición de la "bola", desgajada del resto de la proteína, en el lado citoplásmico de un canal en el que se haya eliminado completamente la inactivación rápida, debe permitir la recuperación de ésta. Zagotta y cols. (1990) expresan una construcción del *Shaker* B en la que han eliminado completamente la inactivación rápida (*ShB Δ 4-46*). Añaden a lado citoplásmico un péptido con la secuencia primaria del extremo N-terminal del canal *Shaker* B y observan que el canal recupera la inactivación rápida. La velocidad de la inactivación depende de la concentración de péptido aplicada. El efecto del péptido es reversible y

puede perderse previo tratamiento con tripsina. Hay que destacar que este péptido inactivante ShB también inactiva otros canales de K^+ que normalmente no inactivan: dependientes de voltaje (Zagotta y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; Dubinsky y cols., 1992), activados por Ca^{2+} del alta conductancia (Toro y cols., 1992; Foster y cols., 1992) o por nucleótidos cíclicos (Kramer y cols., 1994).

El péptido inactivante ShB tiene una estructura primaria que contiene la parte N-terminal con 11 aminoácidos hidrofóbicos seguida de 8 aminoácidos polares en la parte C-terminal. Mutaciones en su región C-terminal que no modifican la carga neta suponen cambios en la velocidad de inactivación, tanto a nivel de canal único como de corriente macroscópica (Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993a; Toro y cols., 1994). Los cambios en la carga del péptido suponen únicamente una modificación de la velocidad de tránsito entre el estado "abierto" y el estado "N-inactivado"; esto es, una modificación de la " K_{on} " (empleando la terminología inglesa), sin que se vea afectada la velocidad de la transición inversa, es decir, la " K_{off} ". Un aumento de la carga positiva supone una subida de la " K_{on} ", mientras que una disminución de la carga negativa conlleva una bajada de " K_{on} " (Murrell-Lagnado and Aldrich, 1993a). Además, este efecto de la carga iónica se ve aumentado por condiciones de baja fuerza iónica y disminuido por condiciones de alta fuerza iónica (Murrell-Lagnado and Aldrich, 1993b). Por tanto cabe pensar que se establecen interacciones electrostáticas entre los residuos cargados positivamente de la "bola" y residuos cargados negativamente situados en la superficie o las proximidades de la boca interna del canal (ver **Fig 4**).

Sustituciones de aminoácidos hidrofóbicos por residuos polares no cargados en el extremo N-terminal del péptido inactivante provocan una disminución de la velocidad de inactivación de la corriente macroscópica, lo que se debe a un aumento de la velocidad de desbloqueo. Mutaciones que introducen restos cargados conllevan la pérdida de la capacidad inactivante del péptido, es el caso de la mutación Leu7Glu (Murrell-Lagnado and Aldrich, 1993b).

Demo y Yellen (1991) encontraron que el péptido inactivante ShB actúa como un bloqueador de canales abiertos. La presencia de K^+ en gran concentración en el medio extracelular acelera el tránsito desde el estado inactivado hasta el estado no inactivado cerrado y ello porque los iones permeantes desestabilizan la interacción entre el péptido inactivante y el canal. Igualmente la hiperpolarización de la membrana

se asocia con una recuperación más rápida del estado no inactivado cerrado desde el estado inactivado. Aparentemente, esta observación se opone a la independencia de voltaje del proceso de la inactivación pero se explica fácilmente teniendo en cuenta que el K^+ extracelular en la zona del poro tenderá a moverse a favor de gradiente eléctrico, lo que finalmente tiene un efecto similar al incremento de la concentración de K^+ extracelular.

Como ya se ha dicho los canales de K^+ dependientes de voltaje están formados por cuatro subunidades idénticas o muy similares (MacKinnon, 1991; Liman y cols., 1992), y por consiguiente los cuatro dominios N-terminal se encontrarán disponibles como partículas inactivantes. ¿Cuántas son necesarias para que ocurra la inactivación en un canal? MacKinnon y cols. (1993) y Gomez-Lagunas y Armstrong (1995), usando diferentes aproximaciones experimentales concluyen que sólo uno de los cuatro dominios N-terminal de cada canal bloquea el poro.

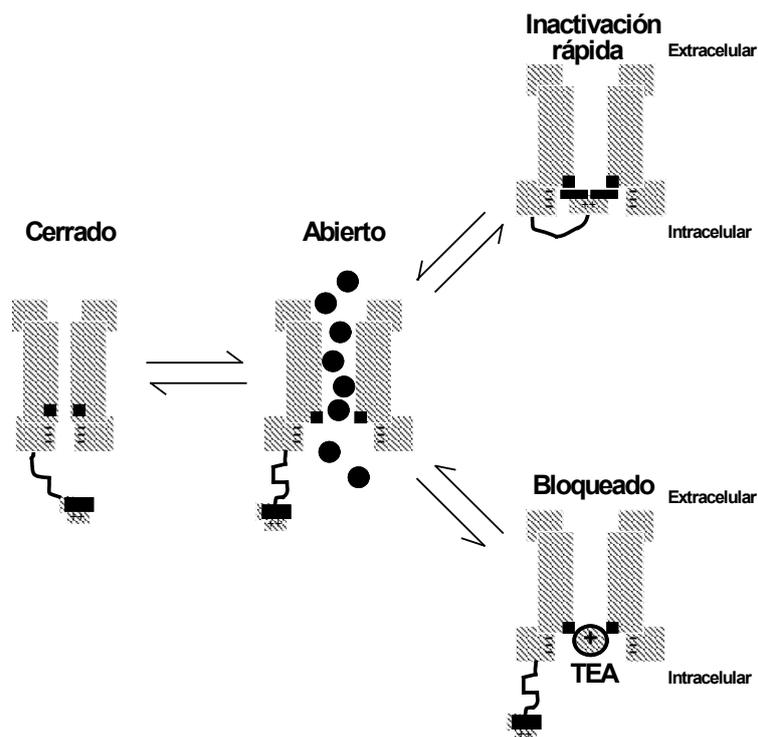


Fig. 4. Modelo esquemático del proceso de inactivación rápida (tipo N) de canales de K^+ dependientes de voltaje. La transición entre el estado cerrado y abierto, que es dependiente de voltaje, crea un vestíbulo en la parte citoplásmica del poro, en el que se hace patente un bolsillo hidrofóbico. La interacción del dominio N-terminal inactivante con la boca interna del canal abierto bloquea el paso de iones. El TEA también interacciona con la boca interna del canal abierto bloqueando el paso de iones, y compete con el dominio N-terminal inactivante. (Tomado de Kukuljan y cols., 1995).

1.5.4. La inactivación rápida inducida por la subunidad β .

Cuando se expresan conjuntamente las subunidades α y β de un canal que carece de inactivación rápida, la corriente resultante adquiere inactivación rápida; y si la subunidad α confería por sí misma inactivación rápida, esta ve acelerada por la presencia de la subunidad β (Rettig y cols., 1994). Así pues, la subunidad β mimetiza la función asignada al dominio N-terminal de la subunidad α (ver **Fig. 5**).

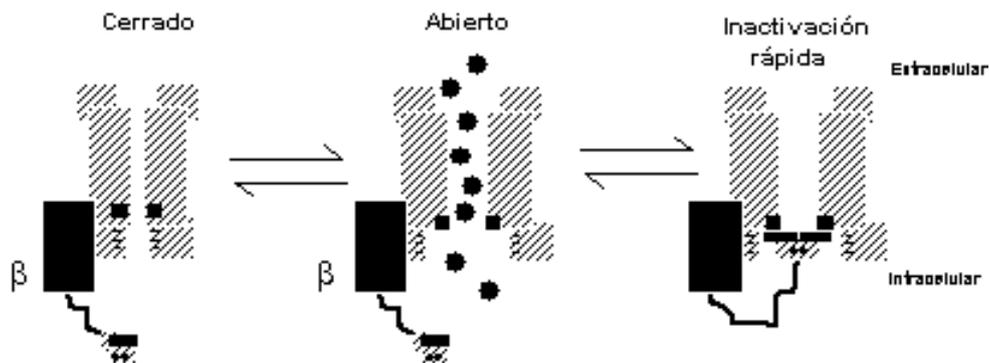


Fig. 5. Inactivación rápida inducida por la subunidad β . (Tomado de Kukuljan y cols., 1995).

1.5.5. La inactivación lenta o tipo C.

Los canales tipo *Shaker* tienen dos mecanismos diferentes de inactivación, la inactivación rápida y la inactivación lenta o tipo C (con constantes de tiempo de s); asociadas a distintos dominios del canal. La inactivación tipo C se asocia a cambios conformacionales que implican a aminoácidos localizados en la boca externa del canal y del segmento transmembrana S6 (Busch y cols., 1991; Choi y cols., 1991; De Biasi y cols. 1993; López-Barneo y cols., 1993).

Se desconoce el mecanismo molecular de la inactivación tipo C. Es inhibida por TEA externo pero no interno así como por K^+ y otros cationes monovalentes. Estas observaciones se explican por el modelo de compuerta de "foot-in-the-door" en el que cationes externos, o el TEA, compiten con la inactivación tipo C por ocupar un sitio en el poro que debe vaciarse antes de que el proceso de inactivación tenga lugar. El K^+ externo también puede evitar la inactivación tipo C para estados cerrados, incrementando el número de canales que pasan a estar cerrados (López-Barneo y cols., 1993) (ver **Fig. 6**).

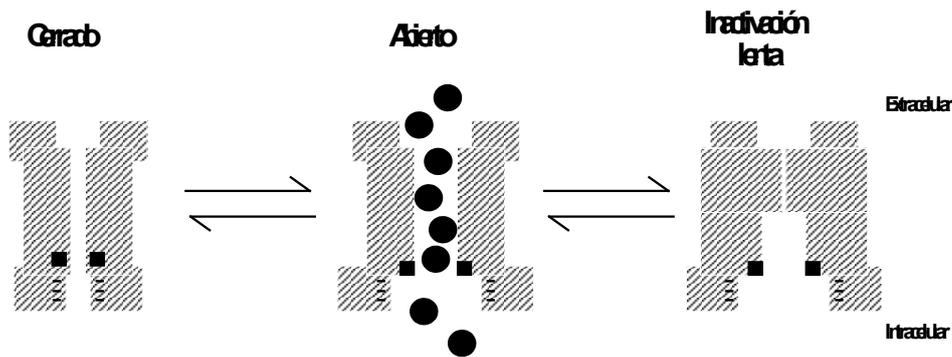


Fig. 6. Modelo de inactivación lenta de canales de K⁺ dependientes de voltaje (Tomado de Kukuljan y cols., 1995).

1.5.6. Un modelo estructural de los canales de K⁺ dependientes de voltaje.

Los canales de potasio son oligómeros de cuatro subunidades, con una porción transmembrana constituida por un cilindro exterior formado por 16 α -hélices (S1, S2, S3 y S5), que rodean un cilindro de ocho α -hélices (S6 y S4) que a su vez rodea un anillo de 8 cadenas antiparalelas (segmento H5) que constituye el poro iónico. El cilindro exterior, resulta de poner en contacto los aminoácidos hidrofóbicos no conservados de los segmentos S1, S2, S3 y S5, con la matriz lipídica. En el cilindro central los segmentos S6 forman un puente disulfuro con los segmentos S2 del cilindro exterior, y el segmento S4 (sensor de voltaje) se encuentra estabilizado formando pares iónicos con cargas opuestas localizadas en otros segmentos transmembrana. Ante un proceso de despolarización, la hélice del segmento S4 se desplaza unos 10 Å en forma de "sacacorchos" formándose nuevos pares iónicos que estabilizan su estructura. Durante este movimiento el segmento S45, que en la conformación cerrada orienta cargas positivas hacia el poro iónico (formando una barrera electrostática a la permeación iónica), se reorienta alejando las cargas positivas y ofreciendo cargas negativas que conforman un anillo negativo en la boca citoplasmática del poro, favoreciéndose la conducción de K⁺. De esta forma el segmento S45 funcionaría como la compuerta de activación que regularía la permeación a través del poro, cuya sección más angosta estaría formada por las nubes electrónicas π de los anillos aromáticos de un residuo de tirosina, coordinando al catión K⁺ en su paso a través del canal. No obstante, este modelo ha sido en parte superado gracias a la publicación reciente de la estructura tridimensional del canal de K⁺ de *Streptomyces lividans* obtenida a partir de datos de difracción de rayos X (Doyle y cols., 1998).

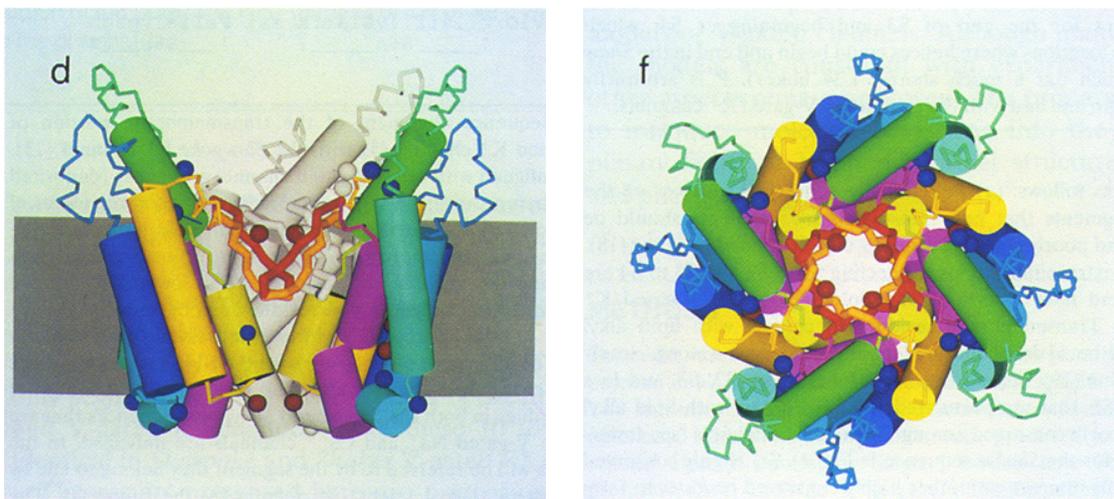


Fig. 7. Vistas lateral (**d**) y extracelular (**f**) de un canal activado por voltaje en conformación abierta. (Tomado de Durrel y Guy, 1992).

1.6. Proteínas asociadas a canales K^+ .

La transmisión de señales eléctricas entre las células del Sistema Nervioso depende del funcionamiento de una gran variedad de canales iónicos presentes en la membrana plasmática de las neuronas. La clonación y expresión en sistemas heterólogos de genes que codifican para diferentes tipos de canales ha permitido el estudio de sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. Sin embargo, *in vivo*, los canales iónicos no difunden libremente por la membrana plasmática sino que se encuentran inmovilizados formando grupos o racimos, localizados en regiones subcelulares concretas; sobre todo en las membranas pre- y postsinápticas. Esto implica que deben interactuar directa o indirectamente con proteínas del citoesqueleto.

En las uniones neuromusculares de vertebrados la localización de moléculas de receptor de acetilcolina en la membrana postsináptica es posible gracias a la interacción directa de los canales con una proteína conocida como rapsina (Apel y Merlie, 1995). En el Sistema Nervioso Central se ha descrito otra proteína llamada gefirina que es necesaria para la formación de agregados de receptores de glicina en sinapsis inhibitoras (Khuse y cols., 1995). Recientemente se ha identificado en mamíferos una familia de proteínas sinápticas asociadas a membrana que incluye al menos cuatro miembros: PSD-95 (Chou y cols., 1992; Hunt y cols., 1996), SAP97/hdlg (Lue y cols., 1994; Müller y cols.), chapsina 110/PSD-93 (Brenman y cols., 1996; Kim y cols., 1995; Kim y cols., 1996) y SAP102 (Müller y cols., 1996). Dichas proteínas se localizan en las zonas de sinapsis e *in vitro* interactúan directamente con receptores

de NMDA y con canales de K⁺ de tipo *Shaker*. Estas proteínas multidominio se caracterizan por presentar en su extremo N-terminal tres dominios de unión a otras proteínas, llamados PDZ o también DHRs (de *discs large homology regions*), de unos 90 aminoácidos cada uno, que son responsables de interacciones proteína-proteína de gran afinidad. En la mitad C-terminal poseen un dominio homólogo a la quinasa Src (SH3) y otro a la guanilato-quinasa, con lo cual, los canales de potasio podrían estar íntimamente asociados con quinasas, implicadas, quizá, en su regulación (ver sección **1.7.**). Sheng y Kim (1996) proponen llamar a esta familia chapsinas (del inglés *channel associated proteins of synapses*) (ver **Fig 8**).

Las chapsinas se unen por sus dominios PDZ a motivos aminoacídicos del tipo ES/TXV (donde E es ácido glutámico; S/T serina o treonina; X es cualquier aminoácido y V es valina) presentes en el extremo C-terminal tanto de receptores de NMDA como de canales de K⁺ tipo *Shaker*. La coexpresión de canales de K⁺ tipo *Shaker* o receptores de NMDA con PSD-95 en células heterólogas en cultivo supone la formación de racimos o "clusters" de dichos canales (Kim y cols., 1995; Kim y cols., 1996). Esto hace pensar que PSD-95 media la agregación de proteínas específicas de membrana en los sitios de sinapsis, aunque hasta el momento no se haya demostrado *in vivo*.

La proteína de los discos grandes (*dlg*) en *Drosophila* es homóloga a PSD-95. También contiene tres dominios PDZ y se localiza en el Sistema Nervioso Central de la mosca adulta y en sinapsis glutamatérgicas (Budnik y cols., 1996). Los canales tipo *Shaker* de *Drosophyla* también contienen en el extremo C-terminal secuencias ETDV como los canales de mamífero (Pongs y cols., 1988; Schwarz y cols., 1988). La *dlg* de *Drosophila* interacciona directamente con canales de K⁺ tipo *Shaker in vivo* y ello es esencial tanto para la formación de racimos o "clusters" de dichos canales (que únicamente requiere los dominios PDZ 1 y 2 en la proteína *dlg* junto con el motivo EDTV en C-terminal del canal) como para que estos "clusters" se sitúen en las regiones sinápticas (lo que requiere también la integridad del dominio PDZ 3) (Tejedor y cols., 1997).

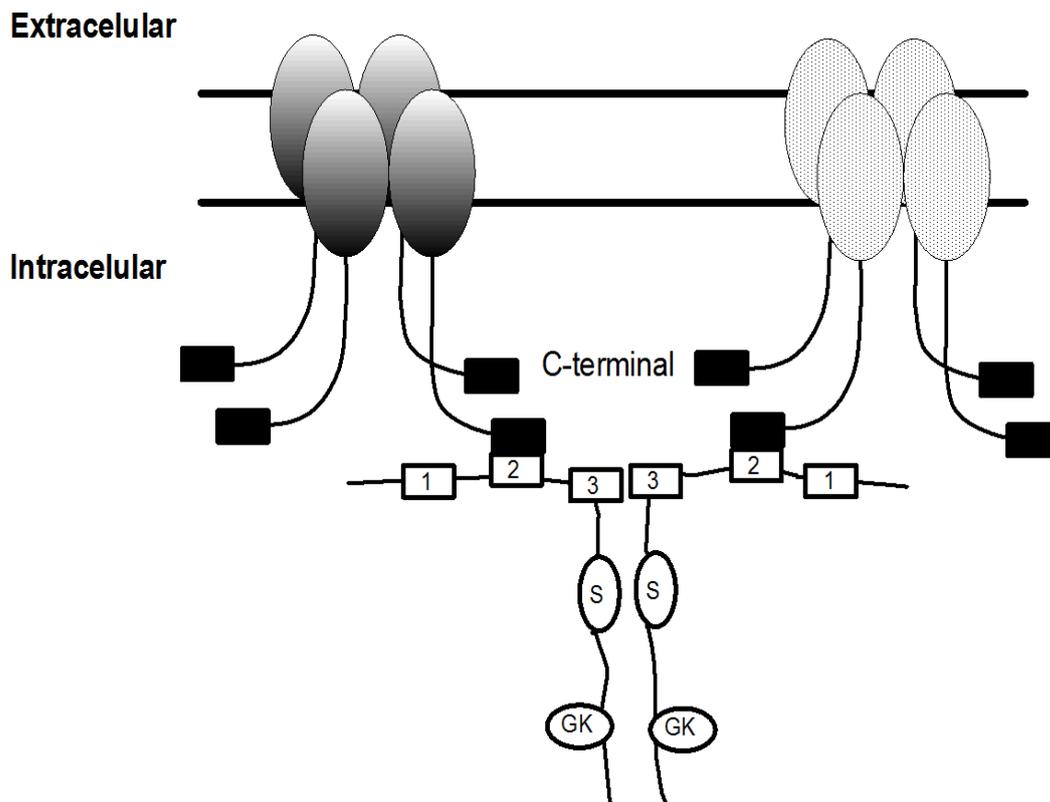


Fig. 8. Modelo de agrupamiento de canales iónicos por chapsinas. Podrían formarse oligómeros de chapsina con múltiples sitios de unión (dominios PDZ) capaces de unir diferentes tipos de canales u otras proteínas de membrana que posean motivos complementarios, formando una especie de "racimo" proteico. (Tomado de Sheng y Kim, 1996).

1.7. Regulación de la actividad de los canales de K^+ por procesos de fosforilación y desfosforilación.

Actualmente se acepta que la actividad de algunos tipos de canales iónicos se modula mediante la actuación de protein-quinasas unidas a sistemas de segundos mensajeros. Aunque esta modulación ocurre en canales de sodio (West y cols., 1991; Li y cols., 1993; Qu y cols., 1994) y calcio (Knox y cols., 1992; Johnson y cols., 1994; Perez-Reyes y cols., 1994; Selinfreund y Blair, 1994; Hell y cols., 1995; Jonas y cols., 1996), parece que muchas de las respuestas de las neuronas a la activación de rutas de segundos mensajeros pueden explicarse por la regulación que se ejerce sobre sus canales de potasio. Como se ha dicho con anterioridad, la gran variedad de propiedades eléctricas de estos canales, como consecuencia de sus posibilidades de modulación enzimática y la diversidad de genes que pueden codificarlos, explica su versatilidad. A nivel celular estos acontecimientos moleculares implican para las neuronas la posibilidad de modificar los patrones de disparo de potenciales de acción en respuesta a las entradas sinápticas, lo que implica cambios en el comportamiento del animal (Jonas y Kaczmarek, 1996).

Se puede distinguir dos tipos de fosforilación, por una parte la que implica a residuos de Serina/Treonina, y por otra la que ejercen tirosin-quinasa.

1.7.1. Fosforilación de canales de potasio por serin/treonin-quinasa.

El tratamiento de oocitos de *Xenopus* que expresan el canal de K⁺ humano, hKv3.4, con protein-quinasa C (PKC) convierte a este canal tipo A, con inactivación rápida, en un rectificador retrasado. Este efecto puede atribuirse a la fosforilación que experimentan *in vitro* las Ser15 y Ser21, situadas en el extremo N-terminal, que es el responsable de la inactivación rápida. La mutación de estos residuos impide la acción de la PKC y, en el mismo sentido, la mutación de la Ser15 por aspartato, que mimetiza la carga negativa debida al grupo fosfato, simula parcialmente la acción de la PKC (Covarrubias y cols., 1994).

La velocidad de inactivación de los canales de K⁺ tipo *Shaker* puede ser modulada de forma reversible por un mecanismo de fosforilación. La aplicación de fosfatasa alcalina a la parte citoplásmica de parches escindidos de oocitos de *Xenopus* que han expresado canales *Shaker* supone la pérdida de la inactivación rápida en dichos canales, siendo revertido dicho efecto por la aplicación de la protein-quinasa A (PKA). La fosforilación por PKA se produce en el extremo C-terminal como se deduce del hecho de que la eliminación, por mutagénesis dirigida, de la secuencia consenso para la PKA en esta región previene la acción de la fosfatasa. No resulta fácil explicar cómo el extremo C-terminal está implicado en la inactivación tipo N. Está claro que están implicadas interacciones electrostáticas entre la parte con residuos positivos del dominio N-terminal inactivante y algunos residuos cargados negativamente del canal. Podría ocurrir que el incremento de carga negativa conferido por el fosfato en el extremo C-terminal del canal favoreciera la interacción que acabamos de mencionar. Sin embargo, esta no es más que una hipótesis no apoyada por datos experimentales como reconocen los propios autores de este trabajo (Drain y cols., 1994).

Levin y cols. (1995) han propuesto un segundo papel para el sitio consenso de fosforilación por PKA del extremo C-terminal de los canales de K⁺. La fosforilación de canales Kv1.1, que contienen un único sitio consenso para fosforilación por PKA, en oocitos de *Xenopus* no tiene lugar en canales con la mutación Ser446Ala, pero sí en el canal silvestre y produce un aumento de la amplitud de la corriente registrada. Dicho aumento podría explicarse por un incremento de la proteína canal presente en la

membrana de oocito, ya que en presencia de inhibidores de la síntesis proteica sólo el tipo salvaje incrementa la amplitud de la corriente. Además, en ausencia de inhibidores se produce un incremento de la cantidad de canales en membrana tanto para el tipo salvaje como para el mutado. Todo ello indica que el aumento en la velocidad de síntesis de canales inducido por la PKA es independiente del efecto producido por la quinasa en el propio canal. En neuronas de *Aplysia* el aumento de la concentración de AMPc provoca un aumento del tránsito intravesicular a través del axón que puede acercar nuevos canales iónicos a la membrana presináptica y quizá estos canales fosforilados favorezcan que la maquinaria implicada en la fusión vesicular inserte dichos canales en la membrana presináptica (Azhdarian y cols., 1994). Este aumento de la amplitud de las corrientes de potasio, registradas en oocitos, se ha observado en términos similares, tras la fosforilación por PKA en secuencias consenso en el extremo C-terminal, en otros canales clonados de mamíferos como por ejemplo Kv1.2 (Huang y cols., 1994) y Kv2.1 (Wilson y cols., 1994).

1.7.2. Regulación de canales de K⁺ por fosforilación en tirosinas.

En principio se ha relacionado a las tirosin-quinasa con fenómenos de oncogénesis y crecimiento, y sólo desde principios de los años 90 han salido a la luz trabajos que ponen de manifiesto su implicación en el control de la actividad eléctrica neuronal. En este sentido, Sharma y cols. (1993) muestran que la exposición durante doce horas al factor de crecimiento nervioso (NGF), que tiene un actividad de tirosin-quinasa asociada, regula la distribución y la abundancia de canales Kv2.1 expresados en células PC12. Además, el NGF no incrementa los niveles totales de ARNm de Kv2.1, luego su acción debe ejercerse a otros niveles.

Pero las tirosin-quinasa no sólo tienen estos efectos a tan largo plazo, sino que también pueden modular los canales iónicos de forma rápida, cambiando la amplitud de la corriente o la velocidad de la inactivación. Jonas y cols. (1996) encuentran que la activación de un receptor en unas neuronas de *Aplysia*, que tiene actividad de tirosin-quinasa, produce un claro aumento tanto de las corrientes de K⁺, debidas a rectificadores retrasados, como de las corrientes de Ca²⁺. Esta drástica regulación de la amplitud de las corrientes de K⁺ por receptores que tienen asociada una actividad de tirosin-quinasa también se ha observado en canales clonados expresados en oocitos. De esta forma, la amplitud de las corrientes provocadas por un canal Kv1.5 se ve

modificada por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) cuando se coexpresan con dicho canal. No obstante, se desconoce el sitio exacto de fosforilación (Timpe y Fantl, 1994).

Huang y cols. (1993) implican directamente a la fosforilación de tirosinas en el control de un canal de K^+ rectificador retrasado (RAK) presente tanto en músculo cardíaco como en neuronas, donde se activa en respuesta a la despolarización de la membrana y contribuye a la repolarización de la misma durante el potencial de acción. Los autores coexpresan el canal RAK con el receptor muscarínico de acetilcolina m1 en oocitos de *Xenopus*. El receptor m1 está acoplado a una proteína G que estimula a la fosfolipasa C, que a su vez hidroliza el fosfatidilinositol a inositol trifosfato, que provoca la liberación de Ca^{2+} de los almacenes internos, y diacilglicerol que activa a la PKC. Esta activa a una tirosin-quinasa (no identificada) que fosforila el canal RAK, reduciendo la amplitud de la corriente casi en un 90 %. La mutación de la Tyr132Phe supone un menor grado de supresión de la corriente registrada. Para determinar que los canales RAK son fosforilados directamente por tirosin-quinasa, los autores coexpresan el canal RAK con el receptor m1 en una línea embrionaria de riñón humano (HEK), en la que el canal se inhibe por la acción del carbacol. Usan anticuerpos policlonales producidos contra un péptido de igual secuencia al extremo C-terminal de RAK para inmunoprecipitar el canal a partir de las células HEK que lo han expresado y prueban en un "Western blot", usando un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina, la eficacia de la fosforilación. A pesar de que encuentran una cantidad de fosforilación en tirosinas considerable en la situación basal, el nivel de fosforilación se ve incrementado significativamente por el carbacol.

El canal Kv1.3 también puede ser fosforilado en residuos de tirosina como demuestran Holmes y cols. (1996). Estos autores expresan dicho canal en una línea celular de mamífero que presenta de forma constitutiva la tirosin-quinasa *v-src* produciendo un incremento del contenido de fosfotirosina del canal. Por otra parte, la adición de un inhibidor de la tirosin-fosfatasa aumenta el grado de fosforilación en tirosinas del canal Kv1.3, decreciendo la amplitud de la corriente registrada. Este efecto del inhibidor puede suprimirse por la mutación Tyr449Phe.

Finalmente, Lev y cols. (1995) son los primeros en demostrar que una nueva tirosin-quinasa (PYK2) fosforila directamente un canal Kv1.2. De la misma forma que en

otros ejemplos ya expuestos, esta quinasa es activada por PKC y/o por aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} ; produciendo, de una forma relativamente rápida, la supresión de la corriente.

2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier.

2.1. Antecedentes históricos.

El conocimiento de la conformación de las proteínas ha sido una de las grandes metas de la Bioquímica desde que se postula la importancia de la relación estructura-función. No obstante, este conocimiento se ha visto limitado por la disponibilidad de la metodología adecuada. La complejidad de los distintos niveles de la estructura de las proteínas ha impulsado a muchas generaciones de bioquímicos a buscar herramientas analíticas cada vez más poderosas, que permitieran abordar su estudio. El reciente desarrollo de técnicas rápidas de secuenciación de ADN, junto con la disponibilidad de bases de datos de proteínas han permitido obtener la estructura primaria de proteínas a partir de su secuencia de ADN y predecir otros niveles estructurales a partir de esta secuencia primaria. Sin embargo, son necesarios otros métodos experimentales simples que aporten información fiable de la estructura secundaria o terciaria de las proteínas y de los cambios conformacionales inducidos por factores internos y/o externos.

La difracción de rayos X es uno de esos métodos empleados para resolver la estructura de proteínas. Esta técnica puede dar las coordenadas de los átomos componentes de la proteína y resolver completamente su estructura terciaria. Desde las primeras observaciones de la cristalización de proteínas (Hoppe-Seyler, 1864) se pudo observar que estas tenían estructura definida. Los primeros estudios de difracción de rayos X mostraban que en los cristales los átomos se ordenaban a la escala que imponían las distancias atómicas (Bernal y Crowfoot, 1934). No obstante, deberán transcurrir casi veinticinco años para que se desarrollen métodos suficientemente precisos como para resolver la complejidad atómica de proteínas como la mioglobina (Kendrew y cols., 1960), a pesar de que su estructura en α -hélice había sido postulada con anterioridad (Pauling y cols., 1951). Sin olvidar sus innegables ventajas, numerosos factores dificultan el uso de las técnicas de difracción, tales como, la dificultad o imposibilidad de conseguir cristales grandes de ciertas proteínas, las limitaciones para modificar su ambiente, por ejemplo con el pH, y sobre todo las diferencias que existen

entre la proteína en solución y en el cristal; o los problemas derivados de pretender trasladar la información estática obtenida a las propiedades dinámicas.

También se han usado técnicas espectroscópicas en los estudios de conformación de proteínas. La RMN bidimensional, que se ha introducido recientemente en el estudio de proteínas en solución (Wüthrich, 1989), ofrece una alternativa razonable a la cristalografía de rayos X pero, al menos hasta el presente, se ve limitada por el bajo peso molecular de las proteínas que puede estudiar. La Resonancia Electrónica de Spin (ESR) y la espectroscopia óptica (visible, UV, fluorescencia, dicroísmo circular, etc.) también tienen las limitaciones específicas de las técnicas de estudio de conformación proteica, sobre todo las derivadas del uso de sondas externas que limitan la información obtenida, o las interferencias ópticas.

El uso de la espectroscopia infrarroja en el estudio de la estructura molecular se ha desarrollado a partir de la primera mitad del siglo. La posibilidad de obtener información de la conformación de proteínas a partir de las bandas de vibración del espectro de infrarrojo se estableció en los trabajos pioneros de Elliot y Ambrose (1950), antes de disponer de buenos resultados con la técnica de difracción de rayos X. La espectroscopia de infrarrojo obtiene información de la energía vibracional de enlace; por ello no necesita sondas. Su escala temporal es de 10^{-12} sec, frente a 10^{-8} y 10^{-5} de ESR y RMN, respectivamente. A pesar de estas ventajas, a finales de los años sesenta el interés por la espectroscopia infrarroja para el estudio de la conformación de proteínas decrece debido a las dificultades tanto en la obtención de los espectros como de la información que estos contienen. Entre las principales desventajas se encontraba la baja sensibilidad de los espectrómetros de infrarrojo, que producían espectros con una relación señal-ruido muy baja; la fuerte absorción del agua, que es el medio fisiológico en el que se disuelven las proteínas, junto con la dificultad de sustraer su contribución y la de obtener información del contorno de la banda sensible a conformación proteica, debido a la gran anchura de las bandas componentes.

La recuperación del interés en el uso del IR para el estudio de biomoléculas ocurrió como consecuencia de introducir los espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). El desarrollo de computadoras permitió el diseño de instrumentos basados en el interferómetro de Michelson (Michelson, 1891) y la fácil aplicación de rápidos algoritmos de transformada de Fourier (Cooley y Tukey, 1965)

supuso una mejora de la relación señal-ruido que a su vez permitió superar otras desventajas de los instrumentos dispersivos convencionales. La necesidad de computadoras para llevar a cabo todos los cálculos matemáticos también permitió su uso para el tratamiento de los datos, permitiendo, por ejemplo, la sustracción del espectro de la banda de agua por métodos empíricos (Valpuesta y cols., 1988) o el uso de algoritmos recientemente desarrollados para los espectros de reflexión (Powell y cols., 1986) o transmisión (Dousseau y cols., 1989) de proteínas en solución. El desarrollo de programas informáticos adecuados ha permitido la resolución de los numerosos componentes del contorno de la banda del espectro de proteínas, lo que se dio en llamar métodos de aumento de resolución, tales como la derivada y la desconvolución. Estos métodos, estrechando la anchura de banda intrínseca, permiten visualizar los componentes superpuestos que contiene la banda infrarroja de las proteínas debidos a sus distintos motivos estructurales, como α -hélices, hojas β , giros β , etc. No modifican la resolución de los actuales instrumentos pero permiten el desarrollo de herramientas matemáticas para trabajar con los espectros digitalizados lo que no sólo mejora la interpretación cualitativa de los datos que contiene el espectro sino que también provee de las bases para los estudios cuantitativos de la conformación de proteínas (Castresana y cols., 1988). Estas mejoras han contribuido al relanzamiento de la aplicación del IR en estudios de conformación de proteínas desde la mitad de los años ochenta. El gran poder de los espectrómetros de FT-IR ha permitido el uso del infrarrojo en técnicas distintas que la transmisión; como la reflectancia total atenuada (ATR) o la microscopía de IR, que necesitan gran sensibilidad y que hoy son accesorios comunes en los instrumentos modernos.

2.2. Instrumentación.

2.2.1. Los instrumentos dispersivos.

Los instrumentos de infrarrojo convencional dispersivos consistían en una fuente de luz infrarroja que se dirigía sobre la muestra; la luz infrarroja emitida se dispersaba con una rejilla o un prisma y permitía que un estrecho rango de frecuencias llegara al detector, la resolución dependía de la anchura de la rejilla. Para obtener un espectro completo, el ángulo de la rejilla variaba continuamente respecto al haz de luz infrarroja incidente. El resultado era un espectro con baja energía debido a que la necesaria proximidad de la muestra a la fuente luminosa limitaba su poder, con tal de evitar el calentamiento de la muestra y porque además sólo una fracción de la luz

infrarroja emitida desde la fuente llegaba al detector. La adquisición de espectros era muy lenta y dependía de numerosos dispositivos mecánicos que hacían que su exactitud fuera poco fiable, con el problema añadido de la estabilidad de la muestra.

2.2.2. Los instrumentos con transformada de Fourier.

Los espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier producen un patrón interferométrico en el que después de que la luz atraviesa la muestra llega al detector. El interferómetro de Michelson es todavía el más usado en instrumentos para el estudio de proteínas, aunque también se han desarrollado otros interferómetros para aplicaciones específicas, como el interferómetro de Genzel, el interferómetro de barrido refractivo, el interferómetro rotacional, etc. (Griffiths y De Haseth, 1986).

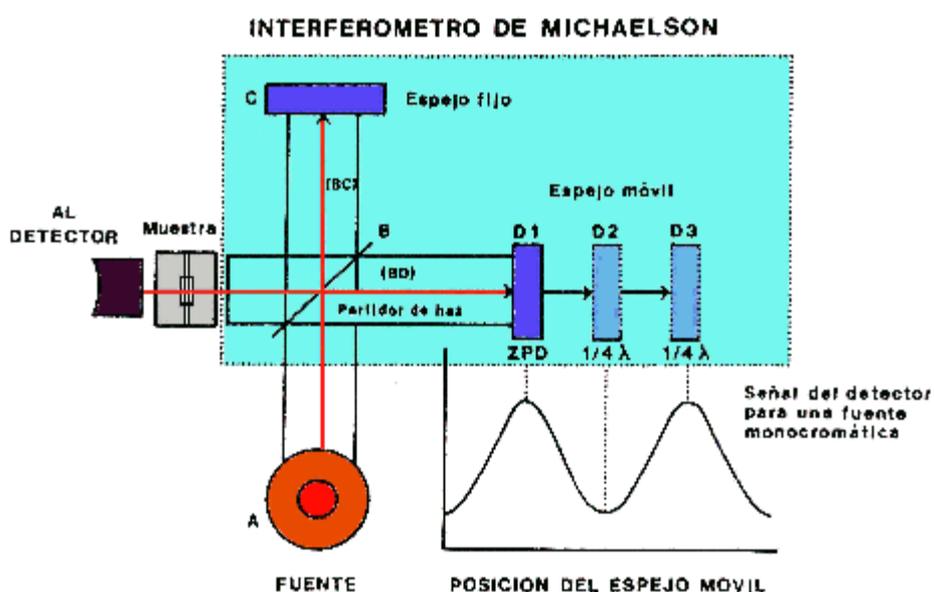


Fig. 8. Representación esquemática de un interferómetro de Michelson.

El interferómetro de Michelson (**Fig. 8**) es un dispositivo capaz de dividir el haz de luz en dos y recombinarlo posteriormente, introduciendo entonces una diferencia de paso óptico. Consta de un divisor de haz (B) situado formando un ángulo de 45° con dos espejos planos, uno fijo (C) y otro móvil (D), formando ambos un ángulo de 90°. El divisor de haz es una película semireflectante que refleja el 50 % del haz incidente y transmite el 50 % restante, normalmente es de germanio en instrumentos para estudios de proteínas. Cuando el haz de luz que proviene de la fuente llega al separador de haz la mitad se refleja hasta el espejo móvil y la otra mitad se transmite hasta el espejo fijo. Después de ser reflejados en ambos espejos, vuelven a juntarse nuevamente en el separador de haz, donde un 50 % es reflejado y el 50 % transmitido,

ahora el haz reflejado atraviesa la muestra y alcanza el detector. Usándose una luz monocromática como fuente, cuando la distancia desde el separador de haz a cada uno de los espejos es igual, se obtiene una interferencia constructiva y la señal que llega al detector es máxima. Al moverse el espejo móvil (D), los dos haces que convergen en el separador de haz estarán fuera de fase y la señal que llega al detector decrece; cuando el espejo se ha movido hasta $\frac{1}{4} \lambda$ los haces convergentes tienen un desfase de 180° , entonces la interferencia es destructiva y la señal que llega al detector es cero. El movimiento posterior del espejo dará máximos a los pasos ópticos de $\frac{1}{2} \lambda$ y cero en los múltiplos impares de $\frac{1}{4} \lambda$. La distancia recorrida por el espejo móvil, d , se llama *diferencia de paso óptico*, o *retraso*. Si el movimiento del espejo ocurre a una velocidad constante se produce una onda cosenoidal, se dice entonces que la frecuencia ha sido modulada por el interferómetro. El punto en el que las distancias BC es igual a la distancia BD se llama "diferencia de trayecto cero" (ZPD) y la frecuencia de la onda coseno viene dada por:

$$f = \nu / \lambda = \nu v$$

donde ν es la constante de velocidad y ν la frecuencia en número de onda de la radiación monocromática. Si la radiación es policromática, todas las frecuencias estarán en fase sólo cuando las distancias entre el divisor de haz y los espejos móvil y fijo sean igual, es decir, en el ZPD. A las restantes distancias variará el grado de interferencia destructiva. La intensidad de la onda coseno será función de la distancia recorrida por el espejo móvil (D), $I(d)$ es proporcional a $\cos(2\pi\nu d)$. La representación de la intensidad de esta onda frente a dicha distancia es lo que se llama *interferograma* (**Fig. 9**).

$$I(d) = \sum_i A_i \cos(2\pi\nu d)$$

donde A_i es la amplitud máxima del coseno para cada una de las frecuencias incidentes ν_i . La máxima amplitud del interferograma se obtiene cuando $d=0$. En la situación ideal, i tiende a ∞ y la suma será la integral. Pero diversos factores separan la realidad de la práctica, afectando a la magnitud de la señal medida en el detector (Griffiths y de Haseth, 1986), entre los que se encuentra la imposibilidad de conseguir un separador de haz "ideal" con un 50 % de reflectancia y un 50 % de transmitancia, además, la mayoría de detectores de infrarrojo no tienen una respuesta uniforme a todas las frecuencias, sino que la amplificación de la respuesta depende de la frecuencia. De esta forma, la amplitud del interferograma que se observa después de la detección y la

amplificación es proporcional no sólo a la amplitud de la fuente sino también a la eficacia del separador de haz, la respuesta del detector y las características del amplificador. Así pues, el término A_i de la ecuación anterior debe sustituirse por $B(\nu)$ que da la intensidad de la fuente a las distintas frecuencias modificada en función de las características del instrumento,

$$\int_{-\infty}^{\infty} B(\nu) \cos 2\pi \nu d \cdot d\nu$$

En la práctica, el movimiento del espejo no es ∞ como se asume en esta ecuación; y la medida de la señal a partir de un cierto valor de retraso (d) dará una resolución finita. La resolución de los instrumentos de FT-IR viene determinada por la longitud de barrido del espejo desde el ZPD. De forma empírica dos frecuencias serán resueltas si la diferencia de paso óptico del espejo móvil puede incrementarse hasta un punto en el que las dos ondas se encuentren en fase después del ZPD.

Los datos interferométricos son una representación de la intensidad frente al movimiento del espejo, por tanto temporales, convirtiéndose por la transformada de Fourier en una relación de intensidad vs frecuencia. La transformada de Fourier se calcula con un algoritmo rápido de Fourier desarrollado por Cooley y Tukey (1965), seguido de la apodización y corrección de fase. El espectro final resulta de dividir el espectro promedio de un cierto número de barridos en los que la luz incide sobre la muestra entre el espectro promedio que se obtiene cuando la luz no incide sobre la muestra. Se trata de una representación de absorbancia vs frecuencia (**Fig. 10**).



Fig. 9. Interferograma.

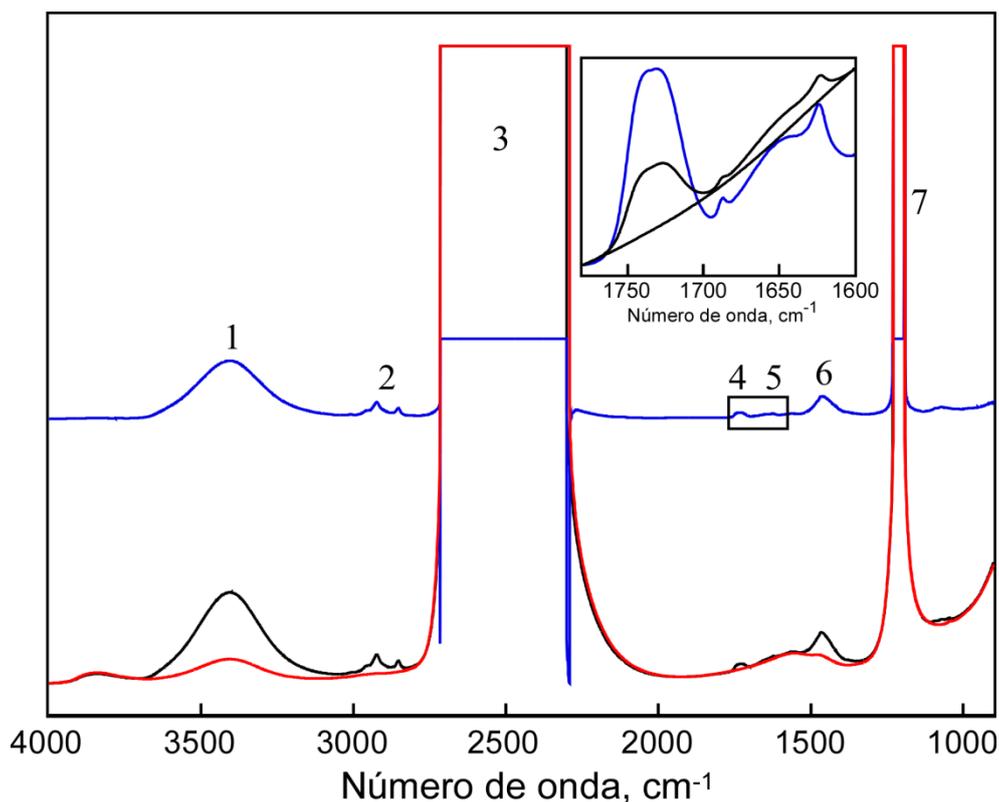


Fig. 10. Espectro de infrarrojo del buffer Hepes 5 mM, NaCl 20 mM, KCl 130 mM, pD=7.4 (traza inferior), del péptido ShB y liposomas de fosfatidilglicerol de huevo en este mismo buffer (traza media) y espectro diferencia (traza superior). El inserto es una ampliación de las bandas amida I (5) y la banda de C=O del enlace éster del fosfolípido (5). Las bandas de absorción más grandes corresponden a las vibraciones de flexión y tensión de D₂O y HOD (1, 3, 6 y 7) y las bandas de (2) son de metilos y metilenos.

Las ventajas que presenta la espectroscopia de FT-IR son:

- 1) Todas las frecuencias son detectadas simultáneamente y se puede obtener un espectro completo en menos de 1 sec. La señal del interferograma es promediada después de varios barridos por lo que la relación señal/ruido es alta (ventaja de Fellgett).
- 2) El haz de IR incide totalmente sobre la muestra sin necesidad de rejillas para monocromar la luz y no hay limitación de la cantidad de energía que llega al detector. Al permitirse un mayor flujo energético en el sistema hay una mayor sensibilidad (ventaja de Jacquinot).
- 3) Los instrumentos de FT-IR poseen un láser HeNe que permite una calibración interna de frecuencias de 0.0001 cm⁻¹ y la digitalización de los datos (ventaja de Connes). No obstante, la posición de los picos en las bandas de infrarrojo no se hace con tanta precisión debido a la dificultad en obtener un espectro "ideal".

4) La muestra sufre un pequeño calentamiento dado que se encuentra alejada de la fuente luminosa; no hay contribuciones de emisión de la muestra, lo que facilita el tratamiento matemático de los espectros.

2.2.3. Aspectos técnicos en el estudio de muestras.

Las moléculas biológicas ejercen sus funciones en solución acuosa por lo que las muestras deben estar contenidas entre ventanas insolubles en agua, por ejem. de CaF_2 , BaF_2 , ZnS , etc. Sin embargo, en el estudio de proteínas, el agua presenta una gran banda de absorción en la zona de vibración de estas. Por ello, la muestra debe formar una película muy fina ($\leq 10 \mu\text{m}$) o sustituir el agua por D_2O , evitando que se solape la banda acuosa.

2.3. Aspectos teóricos de la espectroscopía infrarroja.

La espectroscopia infrarroja se basa en medidas de transiciones vibracionales, por tanto de pequeña energía, generalmente entre el estado fundamental y el primer estado excitado. El proceso está regido por las leyes de la mecánica cuántica y la energía total de la molécula aumenta o disminuye por uno o más cuantos dependiendo de que tenga lugar la absorción o emisión, respectivamente. En moléculas con vibración armónica, sólo ocurren transiciones entre niveles adyacentes. Pero en realidad las moléculas no vibran armónicamente y la regla de selección no es completamente precisa. A veces se observan transiciones que implican la absorción de más de un cuanto y se denominan sobretonos.

Se puede considerar que la energía total de una molécula es la suma total de cuatro contribuciones, a saber, energías electrónica, vibracional, rotacional y transicional:

$$E_{total} = E_e + E_v + E_r + E_t$$

Los cambios en la energía electrónica se producen, en muchas moléculas, por radiaciones de la región ultravioleta y visible del espectro, mientras que los que ocurren en la energía vibracional son producidos por radiaciones de infrarrojo medio. Para estudios de infrarrojo de proteínas los cambios de energías rotacional y transicional no son considerados.

El cambio de energía vibracional después de la absorción o emisión infrarroja viene dado por la ecuación de Bohr:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = hf = hc\nu$$

Donde E_1 es la energía inicial, E_2 es la energía final, h la constante de Planck, c la velocidad de la luz y f la frecuencia de la vibración con unidades de sec^{-1} y ν cuyas unidades son números de onda en cm^{-1} .

Una molécula con N átomos posee $3N-6$ modos normales de vibración, y si la molécula es lineal $3N-5$, cada uno de los cuales ocurre a una frecuencia vibracional definida. El cambio en la frecuencia de la vibración depende de la fuerza del enlace, de forma aproximada se puede predecir este cambio como función de la raíz cuadrada de la razón entre la masa reducida de los dos átomos que vibran, μ ; y la constante de fuerza de la ley de Hooke, κ :

$$f = c\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{(\kappa / \mu)}$$

Esto supone que la vibración de los átomos pesados ocurre a números de onda menores que la de los más ligeros. Resultando a veces ventajoso un intercambio isotópico que desplaza una vibración de interés hasta una zona donde no se solapa con otras.

Las vibraciones características de átomos unidos covalentemente se clasifican en dos tipos, a saber, vibraciones de "tensión", que suponen cambios en la longitud de los enlaces; y vibraciones de "flexión", que corresponden a cambios en el ángulo de enlace (ver **Apéndice III**).

Determinados grupos químicos dan bandas de vibración características, independientemente de la molécula a la que pertenezcan. El rango de números de onda en el que aparecen esas bandas se ve afectado por factores inter e intramoleculares. Entre los factores intramoleculares se encuentra la masa atómica de los grupos adyacentes, el acoplamiento mecánico entre grupos similares, la formación de puentes de hidrógeno, simetría, electronegatividad, conjugación, etc. El factor intermolecular más importante es la formación de puentes de hidrógeno.

El espectro de infrarrojo de una molécula compleja como puede ser una proteína se compone de todas las posibles vibraciones de sus grupos químicos, que en ocasiones se solapan dando bandas complejas formadas por varios componentes. La forma de las bandas simples puede ser Lorentziana, Gaussiana o mezcla de ambas y también puede darnos información de las interacciones moleculares locales.

2.4. Asignación de bandas de infrarrojo en proteínas.

El espectro de infrarrojo de polipéptidos y proteínas contiene diversas bandas de absorción relativamente grandes asociadas con el enlace peptídico, representado por el grupo CONH. Al tratarse de bandas asociadas a polipéptidos y proteínas pronto se llamaron de forma común "bandas amida". Del estudio de pequeñas moléculas como la N-metilacetamida se han podido describir estas bandas. Un grupo CONH plano hipotéticamente aislado posee nueve bandas amida, que se llaman amida A, amida B y amidas I a VII, en orden decreciente de frecuencia. Estas pueden describirse en términos de cambio de coordenadas, en el plano: tensión C=O, tensión C-N, tensión N-H, flexión OCN, flexión CNH; y fuera del plano: torsión C-N, flexión fuera del plano C=O y N-H. La **Tabla 2** recoge la descripción y la frecuencia aproximada de las diferentes bandas amida estudiadas en la N-metilacetamida. Aunque las amidas I, II y III pueden ser consideradas en estudios de proteínas, la mayoría en la mayoría de estudios de conformación proteica se tiene sólo en cuenta la banda amida I (Arrondo y cols., 1993).

Tabla 2. Bandas características asociadas con el enlace peptídico. Tomada de Arrondo y cols., 1993.

Simetría	Descripción	Frecuencia aproximada (cm ⁻¹)	Descripción.
En el plano	Amida	A	NHs (100%)
		B	
		I	COs (80%), CNs, CCNd
		II	NHib(60%), CNs (40%), COib, CCs, NCs
Fuera del plano	Amida	III	CNs (40%), NHib (30%), CCs # (20%), COib
		IV	COd (40%), CCs#(30%), CNCd
		V	NHob, CNT
		VI	COob, CNT
		VII	NHob, CNT, COob

s, tensión; d, deformación; t, torsión; ib, flexión en el plano; ob, flexión fuera del plano; s #, tensión metilo-C.

La amida I se produce fundamentalmente por vibraciones de tensión del enlace C=O del enlace peptídico, acopladas con vibraciones de tensión del enlace C-N y de deformación de CCN. La frecuencia de las vibraciones depende de los puentes de H que establezcan los grupos C=O y N-H, y el patrón de puentes de H depende a su vez de la estructura secundaria que adopte la proteína, de ahí la sensibilidad de la banda

amida I a cambios en la conformación de las proteínas y péptidos. La posibilidad de disponer de espectros de infrarrojo de proteínas de alta calidad (debido a las mejoras en la instrumentación) y el uso de procedimientos de aumento de resolución han permitido obtener la información contenida en la banda amida I y asignar las distintas bandas a los distintos motivos estructurales (ver **Tabla 3**). Dicha asignación se basó en cálculos teóricos (Miyazawa y cols., 1961) y en estudios realizados con homopolímeros sintéticos de estructura secundaria conocida y homogénea.

Algunas proteínas presentan espectros de infrarrojo cuyos componentes no se ajustan a los recogidos en esta tabla. Es el caso de la bacteriorodopsina, una proteína que se estructura fundamentalmente en α -hélice, y que presenta un máximo en H₂O a 1660 cm⁻¹ (Rothschild y Clark, 1979). Estas hélices presentan una conformación que se llama α_{II} , en la que el enlace peptídico plano se inclina sobre el enlace N-H apuntando hacia adentro en la dirección del eje. Este tipo de α -hélices no son equivalentes a las que suelen encontrarse en proteínas solubles. Las hélices 3_{10} tampoco son muy comunes y presentan máximos de vibración a 1665 cm⁻¹, que pueden solaparse con giros T.

Tabla 3. Asignación de frecuencias (cm⁻¹) de componentes de la banda amida I a diferentes motivos de estructura secundaria de proteínas. Tomado de Arrondo y cols., 1993.

Conformación	Simbología	Amida I	
		H ₂ O (cm ⁻¹)	D ₂ O (cm ⁻¹)
α -hélice	$\nu(0)_{\alpha}$	1653 (<i>s</i>)	1650 (<i>s</i>)
		(1648-1655)	(1648-1655)
Hoja β antiparalela	$\nu(\pi,0)_{A}$	1632 (<i>s</i>)	1632 (<i>s</i>)
	$\nu(0,\pi)_{A}$	(1630-1636)	(1628-1638)
		1690 (<i>w</i>)	1675 (<i>w</i>)
		(1690-1693)	(1672-1678)
Hoja β paralela	$\nu(\pi,0)_{P}$	1630 (<i>s</i>)	1632 (<i>s</i>)
	$\nu(0,\pi)_{P}$	1645 (<i>w</i>)	1648 (<i>w</i>)
Estructura no ordenada	$\nu(m)$	1656 (<i>m, br</i>)	1643 (<i>m, br</i>)
		(1656-1660)	

s, fuerte; *m*, media; *w*, débil; *br*, ancha.

El uso de D₂O en vez de H₂O se postula que no induce cambios en la estructura de la proteína (Graham y Wallach, 1971; Koenig y Tabb, 1980), manteniéndose así mismo la función de la proteína. No obstante, la banda asignada al componente de estructura no ordenada cambia de 1657 cm⁻¹ en H₂O a 1643 cm⁻¹ en D₂O, lo que supone una forma diferente de la amida I. La deutерación de los grupos amida (por

ejem. tras un intercambio isotópico realizado por ultracentrifugación) supone un desplazamiento hacia frecuencias más bajas (Surewicz y Mantsch, 1988).

2.5. Bandas de absorción del agua.

En la **Tabla 4** se recogen las bandas de absorción del H₂O y D₂O. Las grandes bandas de absorción del H₂O impiden el estudio de bandas de otros grupos que se solapen con las primeras. En estudios de conformación proteica se elimina la banda de 1645 cm⁻¹ sustituyendo el H₂O por D₂O.

Tabla 4. Bandas de absorción de H₂O, D₂O y HOD.

Tomada de Mendelsohn & Mantsch., 1986.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Descripción de la vibración	Símbolo
3490	tensión H-O-H	$\nu(\text{O-H})$
3280		
3380	tensión H-O(D)	$\nu(\text{H-OD})$
2540	tensión D-O-D	$\nu(\text{O-D})$
2450		
2500	tensión D-OH	$\nu(\text{D-OH})$
2125	banda asociada a H ₂ O	$\nu_A(\text{H}_2\text{O})$
1645	flexión H-O-H	$\delta(\text{H}_2\text{O})$
1555	banda asociada a D ₂ O	$\nu_A(\text{D}_2\text{O})$
1455	flexión H-O-D	$\delta(\text{HOD})$
1215	flexión D-O-D	$\delta(\text{D}_2\text{O})$

2.6. Procesamiento de datos y técnicas de aumento de resolución.

Los espectros de infrarrojo de muestras biológicas, en especial cuando se estudian las señales debidas a proteínas, presentan con frecuencia bandas complejas de absorción que resultan del solapamiento de varias bandas simples. La razón reside en el hecho de que la anchura de estas bandas simples es mayor que la separación entre ellas, lo que impide que sean instrumentalmente separables. Se han desarrollado procedimientos matemáticos que permiten estrechar las bandas y extraer así toda la información que contienen las bandas complejas. Sin embargo, introducen distorsiones en la forma del espectro original, lo que supone una disminución de la relación señal-ruido. Estas técnicas que se llaman de *aumento de resolución*, simplemente facilitan la visualización de las bandas componentes de una banda compleja.

Se impone, por tanto, conseguir una relación señal-ruido lo mayor que sea posible. Esto se puede lograr:

- 1) Tomando espectros que resulten de promediar un número grande de barridos, ya que la relación señal-ruido mejora de forma directamente proporcional a la raíz cuadrada del número de barridos.
- 2) Purgando continuamente el compartimento que contiene la muestra con aire seco para eliminar el vapor de agua que produce señales en la zona de la amida I. En el mismo sentido contribuye el uso de un sistema mecánico de lanzadera que permite retirar la muestra del recorrido del haz luminoso y tomar el espectro de referencia sin necesidad de abrir el compartimento, lo que evita la entrada de vapor de agua del ambiente.
- 3) Manteniendo un buen alineado de todos los componentes ópticos.
- 4) Eligiendo una adecuada concentración de muestra.

La digitalización de los espectros permite que los datos se encuentren separados por intervalos de frecuencia iguales en números de onda. El algoritmo llamado de "centro de gravedad" permite discriminar cambios de frecuencia con una precisión de menos de 0.1 cm^{-1} . La medida de la anchura de banda se obtiene usando otro algoritmo casi tan preciso como el de la posición de pico y que mide no sólo la anchura a mitad de altura sino también a cualquier fracción de la altura de pico que deseemos (Cameron y Moffatt, 1984). En el mismo sentido la digitalización de los espectros ha facilitado el desarrollo de algoritmos que permiten sustraer espectros, restando de esta forma la contribución del solvente.

2.6.1. Desconvolución de Fourier.

Cualquier banda de absorción del espectro de infrarrojo se puede expresar como la convolución de un punto del mismo (función delta de Dirac) y de una curva (gaussiana, lorentziana o mezcla de ambas). Esta convolución se puede hacer también en el espacio de Fourier, donde la transformada de la función delta de Dirac, que es una función coseno, y la transformada de una curva lorentziana (una función exponencial decreciente) originan una *función coseno con caída exponencial*. La velocidad de caída de esta exponencial es inversamente proporcional a la anchura de la banda. Si logramos disminuir la velocidad de caída de la exponencial conseguiremos una banda más estrecha. Esto se consigue multiplicando la función coseno por una función exponencial creciente, resultando una nueva función coseno con una caída exponencial más lenta (**Fig. 11**).

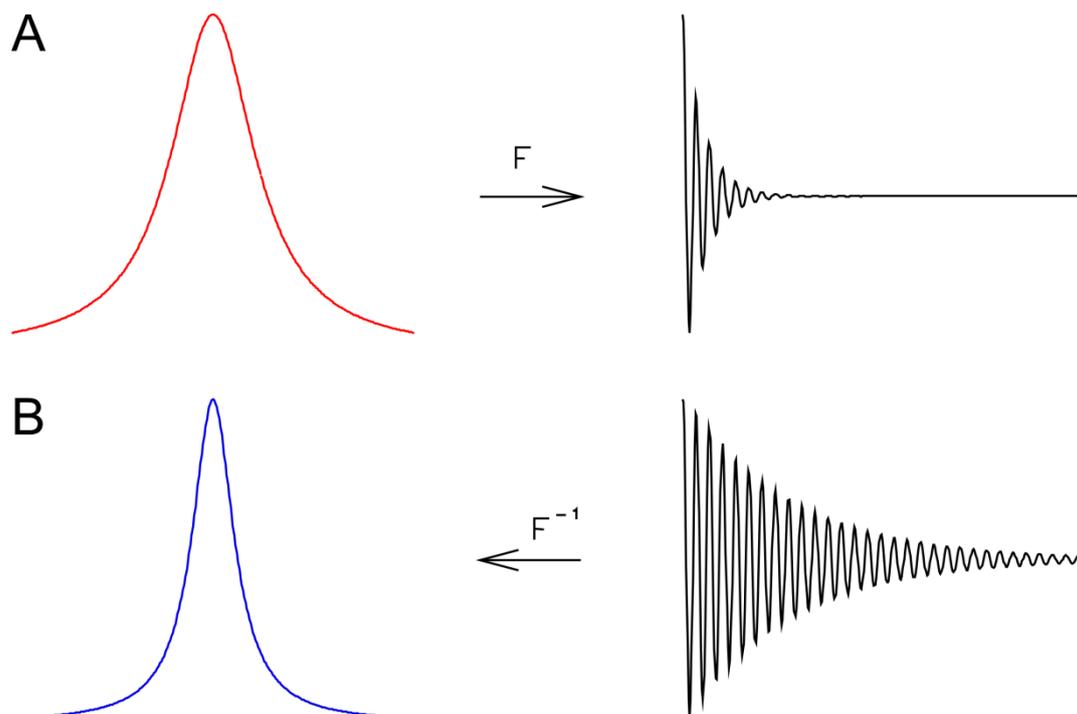


Fig.11. Desconvolución de Fourier. La transformada de una banda ancha es una función coseno con una rápida velocidad de caída exponencial (A). Multiplicando esta función por otra función exponencial creciente se obtiene otra función coseno con menor velocidad de caída exponencial, que en el espacio real dará lugar a una banda más estrecha. Figura tomada de Arrondo y cols., 1993.

La relación entre la anchura de la banda original y la de la reducida se denomina parámetro K , o *factor de aumento de resolución*. El espectro real también contiene ruido, por lo que este también crecerá exponencialmente en el proceso de la desconvolución. Así pues, el máximo estrechamiento de banda vendrá limitado por la relación señal-ruido del espectro y por la resolución instrumental. En la práctica el valor máximo que tomemos de K será menor que el logaritmo decimal de la relación señal-ruido (Arrondo y cols., 1992). Por último la forma de banda considerada en la desconvolución es Lorentziana.

2.6.2. Derivada.

La derivación es otra herramienta ampliamente utilizada en espectroscopia y que en FT-IR complementa los datos obtenidos en la desconvolución. También se trata de un procedimiento de estrechamiento de banda que se basa en generar derivadas de orden n , y que se puede producir tanto en el espacio real (Susy y Byler, 1983; Susy y Byler, 1986) como en el espacio de Fourier (Cameron y Moffat, 1987). Cuando se realiza en el espacio real tiene lugar en dos etapas: 1) se hace la derivada por convolución de funciones con el espectro, y 2) se aplica un suavizado. El orden de las etapas puede ser alterado e incluso ambas pueden ser integradas en una función de convolución simple.

La derivación en el espacio de Fourier optimiza los resultados respecto a la derivación en el espacio real, ya que son mejores la relación señal-ruido, el estrechamiento de banda y el mantenimiento de la forma de la banda.

El gran problema de la derivación es la rápida disminución de la relación señal-ruido conforme aumenta el orden de la derivada. La derivada en el espacio de Fourier presenta la ventaja de que permite seleccionar el orden óptimo de la derivada para obtener una banda más estrecha, manteniendo la relación señal-ruido lo más grande posible. El algoritmo que se usa produce un grado de derivación intermedio entre el que produciría una 2ª y una 4ª derivada en el espacio real. Así pues, la transformada de Fourier de la derivada *n*-enésima de un espectro resulta ser el producto de la transformada del espectro y una función de compensación. Se trata de una función exponencial comparable a la utilizada en la desconvolución. Por consiguiente, tanto la derivada como la desconvolución resultan de aplicar un tipo determinado de compensación a los datos en el espacio de Fourier.

Los parámetros manejados en la derivación son la potencia de la derivada (*pw*), que para espectros de infrarrojo suele tener un valor de 3; y el punto de corte (*bp*), cuyo efecto es reducir el ruido (Cameron y Moffat, 1984).

La desconvolución distorsiona menos el perfil de la banda compleja y conserva las áreas relativas de las bandas componentes, siempre que estas tengan anchuras similares; mientras que la derivada produce una mayor separación de las bandas simples pero distorsiona mucho la banda compleja.

2.6.3. Eliminación de ruido.

La espectroscopia infrarroja puede ofrecernos información cuantitativa sobre la estructura secundaria de proteínas (Arrondo y cols., 1993), ya que como se ha dicho la banda amida I es sensible a cambios en la conformación proteica. Los métodos cuantitativos suponen extraer la información de las bandas componentes de la banda compleja amida I, lo que se hace en tres etapas: i) resolución de las bandas componentes (derivación, desconvolución), ii) asignación de cada banda componente a un motivo estructural de la proteína, y iii) ajuste de componentes a la banda amida I. Las soluciones matemáticas a este tipo de ajuste serían infinitas a menos que asumamos unos determinados parámetros iniciales en cuanto a número, posición, anchura y forma de las bandas componentes (Bañuelos y cols., 1995).

La posición y el número de bandas componentes se obtiene por desconvolución del espectro original. Ambos parámetros se ven modificados por el ruido presente en el espectro, aunque este no sea visible, introduciéndose artefactos que enmascaran los componentes reales. Se han propuesto diversos métodos para eliminar el ruido de los espectros, como el filtrado de Fourier (Kauppinen y cols., 1982) o el suavizado de Savitsky-Golay, que es un método polinomial basado en criterios de mínimos cuadrados (Savitsky y Golay, 1964). Estos métodos introducen distorsiones de la forma de banda, lo que afecta a la información cuantitativa que contiene la banda amida I de las proteínas (Echabe y cols., 1997). Los métodos de eliminación de ruido que suponen la reconstrucción del espectro empleando algoritmos de máxima entropía (DeNoyer and Dodd, 1990) son más eficaces que los dos antes mencionados ya que no modifican la forma de la banda original al eliminar el ruido, permiten distinguir si las bandas son reales o artefactos debidos al ruido presente y disminuyen considerablemente la dispersión de los datos resultantes del proceso para las bandas componentes mayoritarias (Echabe y cols., 1997).

3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los barridos de DSC o termogramas, registran la diferencia de flujo de calor entre la muestra y una referencia en función de la temperatura. Inicialmente las temperaturas de ambas aumentan linealmente con el tiempo según la velocidad de calentamiento escogida. La diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia es cero y el termograma es plano. En el valor de la transición de fase es necesario aplicar más (o menos) calor a la muestra para conseguir el mismo aumento de temperatura que en la referencia. Este exceso se observa como un pico en el termograma: positivo si la transición es endotérmica o negativo si es exotérmica (Chapman y cols., 1973). Cuando se ha completado la transición de fase se recupera la línea de base, aunque en ocasiones el calor específico de la nueva muestra es distinto en el nuevo estado y la nueva línea de base es diferente a la inicial. La transición mejor observada es la que tiene lugar entre una fase muy ordenada (gel) y una fase menos ordenada (líquido cristalino). La entalpía de esta transición es del orden de Kcal/mol.

La información que podemos obtener de un termograma es variada y se resume en la **Fig. 12**:

a) La transición de fase es un proceso continuo que ocurre en un determinado intervalo de temperatura. **La temperatura de transición** (T_c) es aquella a la que comienza la transición de fase. La **T_m** es la temperatura de máxima **capacidad calorífica**.

b) El área del pico de la transición representa la **entalpía** (ΔH). Para una transición reversible de dos estados de primer orden, la variación de la energía libre (ΔG) es nula en la T_m ; y la entropía (ΔS) se calcula a partir de:

$$\Delta S = \Delta H / T_m$$

c) La anchura del perfil de la transición de fase ($\Delta T_{1/2}$) y la velocidad de la variación del exceso de entalpía en la T_m , están relacionadas con la cooperatividad o tamaño de la unidad cooperativa ($N = \Delta H_{VF} / \Delta H_{cal}$). La entalpía de van't Hoff del cambio de fase, para un proceso de dos pasos discontinuo de primer orden, viene dado por la relación:

$$\Delta H_{VF} \approx 6.96 * T_m^2 / \Delta T_{1/2}$$

La unidad cooperativa es una medida del grado de cooperatividad entre las moléculas que experimentan la transición de fase. Para una transición de primer orden completamente cooperativa de una sustancia pura su valor es ∞ , mientras que si el proceso no es cooperativo vale 1.

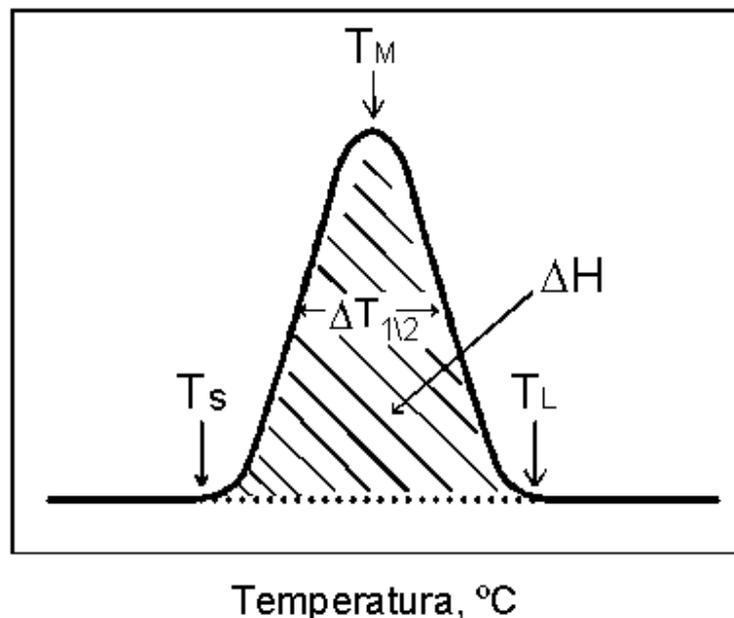


Fig. 12. Variación del exceso de calor específico con la temperatura durante un proceso endotérmico.

4. Objetivos

Los canales de K⁺ tipo *Shaker* responden a la despolarización de la membrana con la apertura de un poro acuoso y a continuación se inactivan rápidamente, con constantes de tiempo de 2-3 ms. Esta inactivación rápida (tipo N) responde a un mecanismo de bloqueo explicable por el modelo de "la bola y la cadena", que originalmente se propuso para explicar la inactivación de canales de Na⁺. En los canales tipo *Shaker*, la "bola" está constituida por los primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína.

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de las interacciones entre el péptido inactivante del canal de K⁺ ShB o el péptido no inactivante ShBL7E, con vesículas fosfolipídicas aniónicas, empleadas como un modelo de diana de la boca citoplásmica del canal abierto, que supuestamente contiene una región de carga superficial negativa (superficie de las vesículas cargada negativamente) y un bolsillo hidrofóbico (cadenas acílicas de los fosfolípidos). Se pretende estudiar en detalle las interacciones de los péptidos sintéticos y la diana modelo, tratando de extrapolar los eventos moleculares que podrían ocurrir en la inactivación del canal en condiciones fisiológicas.

Podemos definir los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Explicar la diferente capacidad funcional de los péptidos ShB y ShBL7E en términos estructurales, confrontándolos con una diana modelo que contenga elementos que imiten los sitios de unión de la bola inactivante en el canal.
- 2.- Postular un modelo estructural del péptido inactivante ShB cuando se encuentra unido a la diana modelo.
- 3.- Explorar la posible regulación de la actividad de estos péptidos, y consecuentemente de los canales de potasio que los contienen, a través de modificaciones post-traduccionales que introduzcan cambios semejantes a los que diferencian al péptido ShB del péptido mutante ShBL7E.
- 4.- Sintetizar y caracterizar adecuadamente un análogo fotoactivable del péptido ShB, diseñado para marcar covalentemente por fotoafinidad el sitio de la proteína canal al que se une la "bola" inactivante.

5. Materiales.

Todos los lípidos utilizados en este trabajo, tanto los naturales (derivados de la fosfatidilcolina de yema de huevo) fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG) y ácido fosfatídico (PA), como los sintéticos, 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (DMPG); 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC) y 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfato (DMPA), son comerciales y proceden de Avanti Polar lipids (Alabaster, AL). El 1-(*p*-azidosalicilamido)-4-(iodoacetamido)butano (ASIB) se obtuvo de Pierce (Rockford, IL). Las sondas fluorescentes **NBD**-iodoacetamida (N, N'-dimetil-N-(iodoacetil)-N'-(7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) etilendiamino), **Rho**-iodoacetamida (tetrametilrodamina-5-(*y*-6)-iodoacetamida) y **Pyr**-iodoacetamida (N-(1-pireno)iodoacetamida) son de Molecular Probes (Eugene, OR). El D₂O (99.9 % por átomo) se obtuvo de Sigma. Los diferentes péptidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados y caracterizados como se describe en la sección de Métodos. Todos los solventes utilizados tenían una pureza de grado HPLC.

6. Métodos.

6.1. Síntesis y caracterización de péptidos.

6.1.1. Síntesis de péptidos.

La síntesis de los péptidos utilizados en este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Juan Pablo Albar (Centro Nacional de Biotecnología, Unidad de Inmunología, CSIC-Pharmacia, Universidad Autónoma, Madrid) utilizando la metodología convencional en fase sólida con química Fmoc (Atherton y Sheppard, 1987; Gausepohl y cols., 1992), en un sintetizador automático de péptidos (AMS 422, Abimed, Langenfeld, Alemania). Los péptidos ShB (MAAVAGLYGLGEDRQHRKKQ), ShBL7E (MAAVAGEYGLGEDRQHRKKQ) (Hoshi y cols., 1990), ShB-21C (MAAVAGLYGLGEDRQHRKKQC) y ShBL7E-21C (MAAVAGEYGLGEDRQHRKKQC) se sintetizaron con el extremo C-terminal protegido por un grupo amida en una resina N- α -Fmoc-DMP [4-(2', 4'-dimetoxifenil-Fmoc-amino-metil)-fenoxi, (Novabiochem, La Jolla, CA)]. El péptido ShBY8(P) (MAAVAGLY(P)GLGEDRQHRKKQ) se sintetizó usando el derivado de la Fmoc-fosfotirosina: Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH como aminoácido en la síntesis química.

Los aminoácidos, protegidos por Fmoc en su extremo α -amino, se activaron *in situ* con PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidinofosfonio) en

presencia de N-metil morfolina. La desprotección del grupo α -amino en cada ciclo de elongación se llevó a cabo con un 20% de piperidina/dimetilformamida. Los grupos protectores de cadena lateral utilizados fueron: Gln (Trt), Glu (OtBu), Tyr (tBu), Asp (OtBu), Arg (pmc), His (Trt) y Lys (Boc). Para la ruptura de los péptidos de la resina se empleó ácido trifluoroacético (TFA) al 82.5 % en presencia de 5 % de fenol, 5 % de H₂O, 5% tioanisol, 2.5 % etanoditiol como secuestrantes durante 4 horas a temperatura ambiente (King y cols., 1990). Cada péptido se precipitó con metil *tert*-butil éter frío, el precipitado se centrifugó y se lavó al menos 4 veces. A continuación se extrajeron en H₂O, se liofilizaron y finalmente se purificaron por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) en fase reversa en una columna Ultrasphere ODS C₁₈ (10 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal de agua/acetonitrilo 0-70 % en TFA al 0.1 %. El grado de pureza conseguido se comprobó posteriormente por HPLC en fase reversa realizada en las mismas condiciones antes indicadas, y fue, en todos los casos, superior al 95 %. El análisis de aminoácidos confirmó la composición esperada de los diferentes péptidos y, finalmente, los datos proporcionados por la espectrometría de masas dieron unos resultados sobre su peso molecular iguales a los esperados para cada uno de ellos. Los péptidos liofilizados se sometieron posteriormente a una nueva cromatografía en una columna de Biogel P-2 (Fine) (1.5 x 15 cm), utilizando ácido acético 0.05 M como eluyente. El ácido trifluoroacético utilizado tanto en la síntesis de los péptidos como en la fase móvil del HPLC (el ion trifluoroacetato presenta una banda intensa de absorción en el espectro de infrarrojo centrada a 1670 cm⁻¹, que interfiere con la caracterización de la banda amida I, Surewicz y cols., 1993) se eliminó sometiendo a los péptidos a tres ciclos de liofilización-solubilización en HCl 10 mM (Zhang y cols., 1992). Los péptidos liofilizados se dividieron en alícuotas y se almacenaron a 4 ° C hasta su uso.

6.1.2. Análisis de aminoácidos.

Los análisis de aminoácidos se realizaron en colaboración con el Dr. F. Gavilanes (Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid) en un analizador automático Beckman 6300 que tiene como soporte cromatográfico una resina de intercambio catiónico. La hidrólisis de los péptidos (entre 10 y 50 μ g) se realizó a vacío. Para ello se introdujeron en un tubo pyrex (12 x 100 mm) al que se añadieron 0.2 ml de HCl tridestilado azeótropo, 5.9 N, conteniendo fenol al 0.1 % (v/v) con el fin de evitar la destrucción de la tirosina durante el proceso. El tubo se estira a la llama, se congela su contenido, y se hace vacío en una

bomba durante un tiempo aproximado de 10 minutos. Finalmente se cierra por la zona previamente estirada, manteniéndose el vacío. El proceso transcurre a 108 °C, durante 24 h. Los experimentos se realizaron por triplicado. Finalizada la hidrólisis las muestras se llevaron a sequedad en rotavapor. Se lavaron posteriormente 2-3 veces con un volumen de 0.2 ml de H₂O y se llevaron nuevamente a sequedad tras cada adición. Este lavado exhaustivo tenía el fin de eliminar el HCl.

Las muestras secas se disolvieron en 50 µl de tampón de aplicación (citrate sódico al 2 %, tiodiglicol al 0.5 % y ácido benzoico al 0.1 %; pH 2). A continuación se pasaron a un tubo cónico de teflón (4 x 0.3 cm) y se centrifugaron durante 5 minutos. Se analizaron entre 10 y 40 µl de muestra, la elución se realizó con un gradiente creciente de pH con tampón citrate pH 3.5, 0.2 M, pH 5.5, 0.2 M, pH 6.1, 1.0 M. Una vez separados los distintos aminoácidos, se detectaron mediante reacción con ninhidrina; midiendo de modo continuo en un espectrofotómetro a dos longitudes de onda distintas (550 y 490 nm, ver **Fig. 1**). La ninhidrina reacciona con el grupo amino de los aminoácidos dando un compuesto azul, que tiene su máximo de absorción a 550 nm, excepto la prolina, que al ser un iminoácido, da un compuesto de color amarillo cuyo máximo de absorción está a 490 nm. Una vez detectados todos los aminoácidos se identificaron según su tiempo de retención en la resina. Antes de analizar cada muestra se aplicó un patrón de norleucina para calibrar las áreas. La duración del análisis fue de 82 minutos y una vez finalizado se regeneró la resina de la columna mediante lavado con NaOH 0.3 N, EDTA 0.25 g/l. A partir de los datos obtenidos del análisis se determinó la composición de aminoácidos en % molar, calculando el número de nanomoles de cada aminoácido mediante la comparación con un patrón.

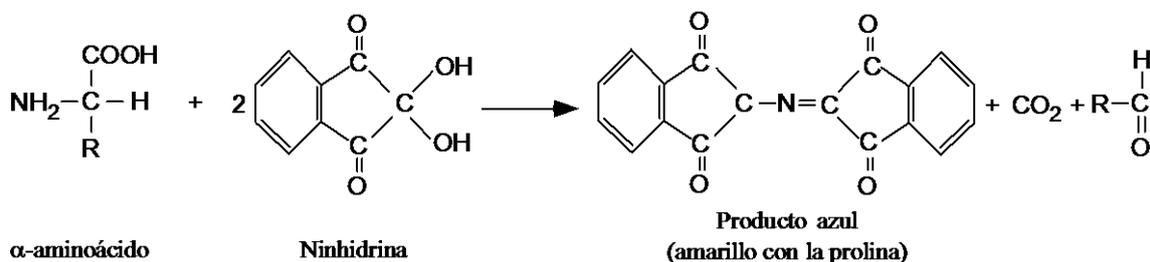


Fig. 1. Reacción de un aminoácido con la ninhidrina.

6.1.3. Espectrometría de Masas.

Los análisis de espectrometría de masas se realizaron en colaboración con los Drs. Emilio Camafeita y Enrique Mendez (Unidad de Análisis Estructural de Proteínas, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid). Las alícuotas para este análisis se liofilizaron, disolvieron en cloroformo/metanol (2:1, v/v) y se analizaron en un espectrómetro de masas Bruker (Bremen, Alemania) Reflex II MALDI-TOF, equipado con visualización óptica y láser de N₂ (337 nm). Un volumen de 20 µl de muestra se mezcló con 20 µl de una solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinnámico (Sigma) usado como matriz. 1 µl de volumen de esta mezcla se depositó en la punta de una sonda y se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos antes del análisis. El equipo se calibró con anterioridad a la adquisición de los espectros, utilizando una mezcla de angiotensina (1047 Da) e insulina (5734 Da). El espectrómetro registra en modo lineal positivo a un voltaje de aceleración de 28.5 kV y con un detector lineal de 1.4 kV. Se promediaron 40 espectros resultantes de disparos de láser simple de radiación de bajo umbral.

6.1.4. Derivatización de péptidos con la sonda fotoactivable ASIB.

Los péptidos ShB-21C y ShBL7E-21C sintetizados según se describe en el apartado 2.1.1. se derivatizaron con la sonda fotoactivable 1-(*p*-azidosalicilamido)-4-(iodoacetamido)butano (ASIB). El grupo sulfhidrilo de la Cys en C-terminal de ambos péptidos se alquiló por una reacción con ASIB, un reactivo fotoactivable que puede ser iodado, y que es capaz de reaccionar de forma específica con grupos sulfhidrilo. Se utilizó una alícuota de 1-3 mg de cada péptido liofilizado, disuelto en 0.6 ml de tampón Tris 0.5 M; pH 8.5 La reacción transcurrió durante 1 hora en la oscuridad y en atmósfera inerte. Se empleó tanto el agente reductor (DTT, 4 veces) como el agente alquilante, que previamente ha sido disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), (ASIB, 10 veces); en exceso respecto a la concentración de péptido. Esta mezcla de reacción fue posteriormente cromatografiada en una columna con Biogel P-2 (Fine) y se eluyó con acetato amónico 0.2 M. Los péptidos ShB-21C-ASIB y ShBL7E-21C-ASIB recogidos fueron de nuevo sometidos a cromatografía en el mismo tipo de columna, divididos en alícuotas, liofilizados y almacenados a -20 °C hasta su utilización. La concentración de péptido en estas muestras se determinó por análisis de aminoácidos.

La fotólisis de los péptidos ShB-21C-ASIB y ShBL7E-21C-ASIB se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo de 1 x 1 cm por irradiación con una lámpara UVGL-25 (Ultraviolet Products Inc., San Gabriel, CA) seleccionando la posición correspondiente a la longitud de onda larga y a temperatura ambiente. La distancia entre la lámpara y la cubeta fue de 1 cm.

6.2. Dicroísmo Circular.

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en el laboratorio del Dr. F. Gavilanes en un dicrógrafo Jovin Yvon Mark III equipado con un arco de Xenon de 250 W, a una velocidad de barrido de 0.2 nm/s. Se emplearon cubetas de 0.1 cm de paso óptico. El espectro se registró en el UV lejano a partir de una longitud de onda de 250 nm hasta que se desconectó el fotomultiplicador. Los espectros se tomaron un mínimo de tres veces. Siempre se utilizó como blanco una disolución de tampón Tris 10 mM, NaCl 50 mM; pH 7.0. La **elipticidad a cada longitud de onda** se expresó como elipticidad molar por residuo de aminoácido (θ_{MRW}) en unidades de grado·cm²·dmol⁻¹, y se calculó a partir del registro obtenido en el dicrógrafo según la expresión:

$$\theta_{MRW} = \frac{3300 \cdot S \cdot MRW}{l \cdot C} \cdot h$$

siendo: *S*, sensibilidad; *MRW*, masa molecular media del residuo de aminoácido, que toma un valor de 110; *l*, paso óptico en cm; *h*, altura del registro; *C*, concentración de péptido en mg/ml.

6.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.

Para estudios de la banda amida I se emplearon alícuotas liofilizadas de los péptidos sintéticos y del tipo de lípido conveniente en cada ocasión, hidratados por separado en 25 µl de tampón de D₂O (su composición se detalla en las leyendas de las figuras incluidas en RESULTADOS). Se utilizó D₂O en los tampones para eliminar la interferencia de la absorbancia del H₂O (1645 cm⁻¹, Mendelsohn y Mantsch, 1986). Los resultados obtenidos fueron idénticos con independencia de que los fosfolípidos fueran sonicados en un sonicador de baño o resuspendidos con la micropipeta. Las soluciones resultantes fueron mezcladas cuando se depositaron sobre una de las ventanas de CaF₂. A continuación se colocó un separador de teflón de 50 µm y finalmente la segunda ventana. Todo ello se acopló en una cámara desmontable (Harrick, Ossining, NY) que se ajustó a un sistema de lanzadera, el cual permite obtener

el espectro del fondo y de la muestra con el simple movimiento de la cámara. La muestra se mantuvo termostatada durante 30 minutos a 21 °C con ayuda de un baño circulante. Durante este tiempo se asegura que el intercambio isotópico H-D, del protón amídico, llegue a una situación de equilibrio, lo que ocurre cuando se consigue una absorbancia mínima constante en la banda amida II (1550 cm^{-1}). La concentración de péptido en la mezcla final varió entre 0.9 y 3 mM, mientras que la de fosfolípidos fue aproximadamente de 26 mM, resultando una razón molar fosfolípido/péptido entre 7 y 29.

Para estudios de la región del espectro entre $1500\text{-}950\text{ cm}^{-1}$, que contiene bandas de absorbancia asignadas a vibraciones de los ésteres de fosfato del ácido fosfatídico, se emplearon ventanas de ZnS e igualmente un separador de teflón de 50 μm . Las muestras se prepararon como se describe más arriba aunque utilizando un tampón acuoso (acetato sódico 10 mM, MOPS 10 mM, CAPS 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM y NaN_3 0.01%) ajustando el pH en un rango de valores entre 5.0 y 10.5 (Bhushan y McNamee, 1993). Las concentraciones de péptido y ácido fosfatídico usadas en estos experimentos fueron 14 y 58 mM, respectivamente.

Los espectros se adquirieron en un espectrómetro Nicolet 520 equipado con un detector DTGS (Castresana y cols., 1992). Los espectros tomados para estudiar la banda amida I resultaron de promediar 200 barridos, mientras que aquellos en los que se estudiaba las bandas de los ésteres de fosfato del ácido fosfatídico se adquirirían 600 barridos. En ocasiones se ha tomado una serie de 15 espectros durante un proceso de aumento escalonado de la temperatura, a intervalos de 5 °C, experimentando la muestra un incremento de temperatura de 23 a 70 °C en un tiempo de 195 minutos. Transcurridos 30 minutos, la temperatura descendió de nuevo a los 23 °C iniciales y se adquirió otro espectro que permitiera estudiar si los cambios inducidos por el aumento de la temperatura eran o no reversibles. Tanto en el experimento en que se adquirió un solo espectro como en el que se tomaba la serie de 16 espectros, el "software" que permitía su adquisición promedió los barridos, realizó su apodización utilizando la función de Happ-Genzel y finalmente aplicó la transformada de Fourier, dando una resolución de 2 cm^{-1} . Cuando fue necesario se utilizaron los procedimientos habituales de estrechamiento de banda, empleándose en la derivada un orden de 3 y un valor de 0.3 como punto de corte (Mantsch y cols., 1988; Moffatt y Mantsch, 1992). La

desconvolución se calculó utilizando una anchura de banda lorentziana de 12 cm^{-1} , con un factor de aumento de resolución de 1.8-2 y la apodización de Bessel.

El valor del pH se corrigió utilizando la función $pD = pH + 0.4$ (Gregory y Roseberg, 1986).

6.4. Calorimetría Diferencial de Barrido.

Los estudios de calorimetría diferencial de barrido se llevaron a cabo con DMPA, DMPC y DMPG. A tal efecto, se resuspendió una película de lípido seco con el tampón adecuado, distinto según el pH deseado (los detalles de su composición se encuentran en los pies de figura de la sección de RESULTADOS) hasta conseguir una concentración final de 2 mM, en términos de fósforo lipídico. Esta suspensión se mantuvo durante 90 minutos a una temperatura por encima de la de su transición de fase y en constante agitación. Los liposomas multilamelares resultantes se almacenaron durante una noche a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para asegurar su completa hidratación antes de realizar los experimentos.

Los termogramas fueron adquiridos en un calorímetro diferencial de barrido Microcal MC-2, equipado con una interfase digital DA-2 y una utilidad para la adquisición automática de los datos (Villar y cols., 1988). Cada muestra y su tampón correspondiente fueron equilibrados térmicamente en el calorímetro a $\sim 10 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 minutos, antes de iniciar el calentamiento. La velocidad de barrido empleada fue de 45 C/h . El volumen de la cubeta era de 1.3 ml. La temperatura de transición y la entalpía se calcularon ajustando la transición observada a un único componente de van't Hoff.

6.5. Medidas de fluorescencia.

6.5.1. Marcaje de péptidos derivatizados con cisteina con sondas fluorescentes.

Los péptidos ShB-21C (MAAVAGLYGLGEDRQHRKKQC) y ShBL7E-21C (MAAVAGEYGLGEDRQHRKKQC) que contienen una cisteina en su extremo C-terminal fueron marcados por alquilación con tres sondas fluorescentes diferentes: **NBD**-iodoacetamida (N, N'-dimetil-N-(iodoacetil)-N'-(7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) etilenediamino), **Rho**-iodoacetamida (tetrametilrodamina-5-(y-6)-iodoacetamida) y **Pyr**-iodoacetamida (N-(1-pireno) iodoacetamida) (Molecular Probes, Eugene, OR). Partiendo de una alícuota de 1-3 mg de cada péptido liofilizado, disuelto en 0.6 ml de tampón Tris 0.5 M; pH 8.5 La reacción transcurrió durante 1 hora en la oscuridad y en atmósfera inerte. Tanto el agente reductor (DTT) como el agente alquilante, es decir, las

distintas sondas fluorescentes rodamina, NBD y pireno, se hallaban presentes en exceso en el medio de reacción. Transcurrido el tiempo de reacción se sometió la mezcla resultante a una cromatografía en una columna con Biogel P-2 (Fine) y se eluyó con acetato amónico 0,2 M. Los péptidos recogidos fueron de nuevo cromatografiados en el mismo tipo de columna, divididos en alícuotas, liofilizados y almacenados a 4 °C hasta su utilización. La concentración de péptido en estas muestras se determinó por análisis de aminoácidos. El grado de derivatización de los péptidos se estimó a partir de la razón molar carboximetilcisteína/péptido. El método se basa en alquilar con iodoacetamida los grupos sulfhidrilo libres, es decir, los que no han reaccionado con la sonda. Posteriormente se someten a hidrólisis ácida y se detectan mediante análisis de aminoácidos como carboximetilcisteínas (Gavilanes y cols., 1983). Tanto los péptidos ShB-21C y ShBL7E-21C, como sus **NBD**-, **Rho**- y **Pyr**-derivados presentan conformaciones similares a las de los péptidos ShB y ShBL7E, respectivamente, a juzgar por la forma de la banda amida I del espectro de infrarrojo.

6.5.2. Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

Para llevar a cabo los estudios de fluorescencia se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con el fin de minimizar el fenómeno de dispersión de la luz ("light-scattering"). Se emplearon los fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidilglicerol (PG) y ácido fosfatídico (PA) de yema de huevo, que por consiguiente tenían una misma composición de ácidos grasos. Los fosfolípidos liofilizados se disolvieron en cloroformo, se dividieron en las alícuotas y se secaron con N₂. Posteriormente se liofilizaron durante 2-3 horas. La película de lípidos secos resultante se resuspendió en el tampón adecuado hasta conseguir una concentración de 5 mM, en términos de fósforo lipídico, para los estudios de unión de péptidos a liposomas, y de 3 mM para los estudios de transferencia de energía de fluorescencia por resonancia y de formación de excímeros de pireno.

6.5.3. Ensayo de unión de péptidos a vesículas lipídicas.

Se parte de vesículas unilamelares pequeñas (PA, PG y PC) de distintas concentraciones 0.05, 0.5 y 5 mM, a partir de las cuales tomando pequeñas alícuotas se podrá conseguir un amplio rango de relaciones lípido-péptido. Para cada una de ellas se preparan las muestras por triplicado. Al correspondiente péptido derivatizado con NBD, a concentración 0.1 μM, se añadió alícuotas de SUV para alcanzar distintas

relaciones lípido-péptido en un volumen final de 2.5 ml. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. La intensidad de fluorescencia se midió inmediatamente después de la mezcla lípido-péptido en un espectrofluorímetro SLM 8000. La longitud de onda de excitación fue de 470 nm (máximo de excitación del NBD) y la de emisión de 530 nm. Para considerar la contribución de los lípidos ("scattering") a la señal de fluorescencia total, se restó a cada lectura de la titulación la intensidad de fluorescencia correspondiente a la mezcla de lípido-péptido no marcado de la misma concentración de péptido, sin sonda fluorescente, más la correspondiente concentración de lípido. Las constantes de unión se analizaron como un equilibrio de partición (Peled y Shai, 1993), de acuerdo con la expresión:

$$X_b^* = K_p^* \cdot C_f$$

donde X_b^* se define como la relación molar del péptido unido al 60 % del lípido total (asumiendo que el péptido se reparte en principio únicamente sobre la hemicapa externa de la vesícula), K_p^* es el *coeficiente de partición*, y C_f representa la concentración de péptido libre (no unido) en el equilibrio. F_∞ , es decir, la señal de fluorescencia que se obtendría si todo el péptido se uniera al lípido, se obtiene por extrapolación a partir de la relación doble inversa de F , la intensidad de fluorescencia observada, frente a la concentración total de lípido. Conociendo F y F_∞ podemos calcular F_0 , es decir la fluorescencia del péptido libre (no unido):

$$F_0 = F_\infty - F$$

Así podremos calcular la fracción de **péptido unido a membrana** (f_b) utilizando la siguiente expresión:

$$f_b = \frac{(F - F_0)}{(F_\infty - F_0)}$$

Una vez conocidos los valores de f_b para cada punto experimental de las curvas de unión puede calcularse fácilmente tanto C_f como X_b^* . Finalmente, el coeficiente de partición K_p^* se calcula como la pendiente de la recta que pasando por el origen se

ajusta a los puntos del tramo inicial de la representación de C_f vs X_b^* (Ver **Apéndice I**).

6.5.4. Ensayo de transferencia de energía de fluorescencia.

La preparación de las muestras para los experimentos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia se llevó a cabo a partir de soluciones preparadas de los péptidos marcados con la sonda fluorescente y vesículas unilamelares pequeñas de ácido fosfatídico (PA) en tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM; pH 7, consiguiendo un volumen final de 1.5 ml. Se mantuvieron constantes tanto la concentración del donador (péptido ShB-NDB o péptido ShBL7E-NBD) como la del aceptor (péptido ShB-Rho o péptido ShBL7E-Rho) en 0.1 μ M y 0.2 μ M, respectivamente. La concentración de liposomas de PA se varió en un rango de 15 μ M a 1.5 mM. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron a temperatura ambiente en un espectrofluorímetro SLM 8000, con una longitud de onda de excitación a 450 nm. Aunque la longitud de onda del máximo de excitación para el NBD se encuentra a 470 nm se eligió una longitud de onda de excitación menor para minimizar la excitación directa del aceptor (péptidos marcados con Rho). La **eficacia** de la transferencia de energía (E) se determinó experimentalmente a partir de la razón de intensidades de fluorescencia de emisión a 530 nm (máximo de emisión del donador, derivados de NBD) en presencia (I_{da}) y en ausencia (I_d) del aceptor (derivados de Rho). Para considerar la contribución de la señal de emisión de fluorescencia de las vesículas lipídicas se corrigió I_d restando la señal obtenida al añadir a los péptidos no marcados con sonda fluorescente (en una concentración igual a la suma de donador y aceptor) las vesículas lipídicas. Igualmente, I_{da} fue corregida para descartar la propia energía de emisión del aceptor (en ausencia de transferencia) restando la señal de fluorescencia de los liposomas más el aceptor solo, es decir, en ausencia del correspondiente donador. El porcentaje de E se calculó por:

$$E = \left(\frac{1 - I_{da}}{I_d} \right) \cdot 100$$

6.5.5. Ensayo de formación de excímeros de pireno.

La preparación de las muestras para estudiar la formación de excímeros de pireno se llevó a cabo de igual forma que se ha descrito en el apartado **2.7.4.** pero utilizando los péptidos ShB-21C y ShBL7E-21C marcados con pireno. La concentración final de péptidos fue 0.3 μM y la de vesículas unilamelares pequeñas de ácido fosfatídico varió entre 30 μM y 1.5 mM. Los espectros de emisión de fluorescencia de estas muestras se obtuvieron excitando al máximo de excitación del pireno (345 nm). El espectro de emisión del pireno fue corregido restando la señal observada al añadir a 0.3 μM de péptido no marcado la cantidad correspondiente de liposomas de PA.

6.6. Estudios de criofractura.

Las muestras para los estudios de criofractura se prepararon añadiendo los péptidos ShB y ShBL7E (90 μM) a una disolución de vesículas unilamelares pequeñas de fosfatidilcolina (PC) y ácido fosfatídico (PA) de huevo a una concentración final de 0.7 mM, en términos de fósforo lipídico, en tampón Hepes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pH 7. Las mezclas péptido/liposoma se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se ultracentrifugaron a 55.000xg en un rotor Kontron TFT-70 durante 6 horas y, descartando el sobrenadante, se fijó el sedimento añadiendo 1 ml del tampón inicial que además contenía un 1 % de glutaraldehído y 1 % de paraformaldehído, durante 30 minutos. Estas muestras ya fijadas fueron enviadas al Dr. Luis Miguel García Segura (Instituto Cajal. CSIC. Madrid) que continuó el proceso. Las muestras fijadas se lavaron varias veces con el tampón inicial, se mantuvieron durante 2 horas en glicerol al 20 %, se cubrieron con alcohol polivinilo, se congelaron en Freon 22 enfriado con nitrógeno líquido, se fracturaron a $-110\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se sombrearon con platino/carbón en un aparato Balzers 400 D. De cada muestra se prepararon entre 3 y 6 réplicas. Se tomaron fotografías en un microscopio electrónico Jeol 100B.

6.7. Hidrólisis con tripsina de complejos péptido-liposoma.

Se mezcló el péptido ShB (3.4 mM) con vesículas unilamelares pequeñas de ácido fosfatídico (54 mM) en un volumen final de 7 ml en tampón Hepes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pH 7 (y también pH 7.5). Se incubó la muestra durante 10 minutos para permitir la formación de los complejos péptido/liposoma. Se añadió a estos complejos péptido/liposoma tripsina inmovilizada en una resina inerte (TPCK-tripsyn, Pierce, Rockford. IL), que previamente había sido lavada 3 veces en el tampón de la

mezcla de reacción, y se incubó durante una noche a 37 °C. La tripsina inmovilizada fue decantada de esta mezcla de digestión y el resto de la muestra se sometió a ultracentrifugación en un rotor Kontron TFT-70 durante 30 minutos, en el tampón de reacción, para eliminar el péptido no unido a los liposomas. La muestra se sometió a dos ciclos de resuspensión-centrifugación más y el sedimento final fue resuspendido y se dividió en dos alícuotas para hacer FTIR y espectrometría de masas, respectivamente. Como muestras control se prepararon, de forma idéntica, una muestra de péptido/liposoma sin tripsina y otra con liposomas y la enzima.

6.8. Registros electrofisiológicos: "Patch-clamp" en células CHO.

Estos registros han sido realizados por el Dr. Antonio Molina (Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla). El ADNc que codifica para el canal de K⁺ ShBΔ6-46 (Hoshi y cols., 1990; López-Barneo y cols., 1993), que carece de inactivación rápida, se expresó de forma transitoria en células de ovario de hamster chino (CHO) utilizando un vector p513 (Stratagene) (Green y cols., 1988) previo proceso de transfección de las células por electroporación. Las células fueron electroporadas utilizando un electroporador *Gene Pulser* cuyos parámetros óptimos fueron los siguientes: condensador de 125 μF y pulsos de 350 V, 3 μg de ADN plasmídico, tampón fosfato con sacarosa 272 mM, 7 mM KCl, 1 mM de MgCl; pH 7.4 y un volumen de 400 μl de células por cubeta de electroporación. Los valores de las constantes de tiempo del pulso (τ) estuvieron típicamente entre 22 ms y 28 ms. Tras la electroporación se sembraron las células en placas de Petri que contenían el medio de cultivo y los cubres de vidrio a los que se adherían las células, manteniéndose a 37 °C y 5 % de CO₂. A las 4 o 6 horas de la transfección se lavó el medio para eliminar restos de células muertas, sustituyéndolo por medio nuevo. Estas células pudieron usarse para los experimentos electrofisiológicos durante al menos 2 días a partir del primer día de la transfección.

El registro electrofisiológico de los canales expresados en las células CHO se realizó utilizando la técnica de "patch-clamp" en su configuración de "whole-cell" (Hamill y cols., 1981; López-Barneo, 1991) en un amplificador *List EPC7*. Para ello se establece un **sello** de alta resistencia eléctrica (del orden de GΩ) entre el electrodo de registro y la membrana plasmática. Ejerciendo la suficiente presión negativa dentro del electrodo se puede romper el área de membrana aislada por el electrodo, quedando el

citoplasma en contacto con la solución de dicho electrodo. Tras dializarse el citoplasma (2 o 3 minutos después de romper el área de membrana aislada por el electrodo) se puede considerar como solución citoplasmática la **solución interna** del electrodo (KCl 80 mM, glutamato potásico 30 mM, KF 20 mM, MgCl₂ 4 mM, ATP 4 mM, EGTA 10 mM y Hepes 10 mM; pH 7.2). Los péptidos se disolvían en la solución de la pipeta a una concentración de 500 μM.

Al iniciar los experimentos, el cubreobjetos con las células CHO transfectadas adheridas se depositó en la cámara de registros manteniéndose siempre bañado por un flujo constante de **solución externa** (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 4 mM y Hepes 10 mM; pH 7.4). El electrodo, con la solución interna adecuada, se colocó en el portaelectrodos del "headstage" (Sakmann y Neher, 1996). El portaelectrodos es una placa de metacrilato que permite la conexión eléctrica de la solución de la pipeta con la entrada negativa del convertidor I/V mediante un hilo de Ag-AgCl. También permite aplicar presión positiva o negativa al interior de la pipeta a través de un pequeño tubo flexible (Hamill y cols., 1981). Con la ayuda del micromanipulador y bajo el control visual del microscopio, se acerca la pipeta a la célula deseada a la vez que se ejerce una suave presión positiva en su interior para evitar que se ensucie la punta. El proceso de aproximación a la célula se monitoriza aplicando continuamente a la entrada positiva del amplificador operacional un pulso control de amplitud y duración prefijadas. Este pulso se utiliza para medir la resistencia de la pipeta (R_e) cuando ésta está conectada a tierra a través del baño.

$$R_e = \frac{(V_{ref} \cdot R_r)}{(V_{ref} - V_{out})}$$

donde V_{ref} es el voltaje del pulso control aplicado, R_r es el valor de la resistencia de retroalimentación del convertidor I/V y V_{out} es el voltaje a la salida del amplificador, que es medido por el osciloscopio. Utilizando el programa *Pulse PulseFit* el valor de R_e se obtiene automáticamente. Cuando la pipeta, estando en el baño, contacta con la membrana plasmática de la célula se produce un aumento de la resistencia (R_e), observado en el osciloscopio. Entonces se aplica una suave presión negativa en el interior de la pipeta observando un nuevo aumento en la resistencia de la misma; queda así establecido el sello, cuya resistencia eléctrica fue de 5 a 10 GΩ. Establecido el sello se procede a cancelar los transientes capacitivos generados por la carga y

descarga del condensador formado por la pipeta, a tal efecto se suma a la entrada negativa del amplificador operacional una señal igual pero de polaridad opuesta. Aplicando ahora la suficiente presión negativa se rompe el área de la membrana aislado por la pipeta, obteniéndose, entonces, la configuración de "whole cell". Aparecen entonces nuevos transientes capacitivos debidos a la carga del condensador formado ahora por la bicapa lipídica de la membrana plasmática y que también son compensados. Las células CHO poseen pocos canales dependientes de voltaje endógenos, aunque sí pueden tener canales de Na⁺ que llegan a dar corrientes de una amplitud considerable (más de 150 pA), en cuyo caso son descartadas.

6.9. Ensayos de fosforilación y desfosforilación *in vitro*.

Los experimentos de fosforilación y desfosforilación *in vitro* fueron realizados en colaboración con el Dr. Antonio V. Ferrer-Montiel (Departamento de Biología. Universidad de California. San Diego, La Jolla, USA) según se describe en Sathyamoorthy y DasGusta (1985). La reacción de fosforilación del péptido ShB se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 20-40 μ l que contenía MgCl₂ 20 mM, EGTA 1 mM, Hepes 20 mM; pH 7.4 y 3-6 unidades de quinasa *Src* (Upstate Biotechnology, Inc.), ATP 0.1 mM y 4 μ Ci de [γ -³²P] ATP (3.000 Ci/mmol). La concentración de péptido ShB fue de 100 nM. La muestra control de péptido no fosforilado contiene todo lo anterior salvo que carece de la quinasa *Src*. La reacción transcurrió durante 1 hora a 30 °C y fue detenida al añadir el tampón de muestra para la electroforesis SDS-PAGE o 200 μ M de péptido A (Peninsula Laboratories), un inhibidor específico de la *Src*. Las muestras fosforiladas se sometieron a una electroforesis de SDS-PAGE en gel al 12 %, se tiñó el gel con azul de coomassie R-250, se destiñó, se secó y se expuso a una película de rayos X Kodak X-Omat AR. La estequiometría de la fosforilación se estudió realizando geles al 10 % para minimizar la contribución de la propia quinasa (Ferrer-Montiel y cols., 1991). Para comprobar que la fosforilación ocurre de forma específica en el residuo de tirosina se realiza una "inmunodetección", por electrotransferencia de las bandas de proteína a una membrana de nitrocelulosa, utilizando seroalbúmina bovina al 3% como agente bloqueante y un anticuerpo anti-P-tirosina (Upstate Biotechnology, Inc.). Para el revelado se utiliza un sistema ECL, que se basa en la utilización de un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de caballo (Amersham, UK) (Ferrer-Montiel y cols., 1995). La reacción de desfosforilación se llevó a cabo en un volumen de 15 μ l y partiendo de 100 nM de péptido ShB fosforilado y utilizando 50 ng de fosfatasa

PTP-1B-agarosa (Upstate Biotechnology, Inc.). La reacción transcurrió durante 1 hora a 37 °C y se detuvo centrifugando la mezcla de reacción a 14.000 r.p.m. durante 1 minuto. El grado de desfosforilación se comprobó haciendo el correspondiente gel de electroforesis SDS-PAGE y la autorradiografía.

7. Resultados.

7.1. Estudios conformacionales de los péptidos en solución acuosa.

En la Fig. 1 se muestran espectros de dicroísmo circular (CD) de los péptidos ShB y ShBL7E utilizando mezclas de trifluoroetanol/H₂O como solvente.

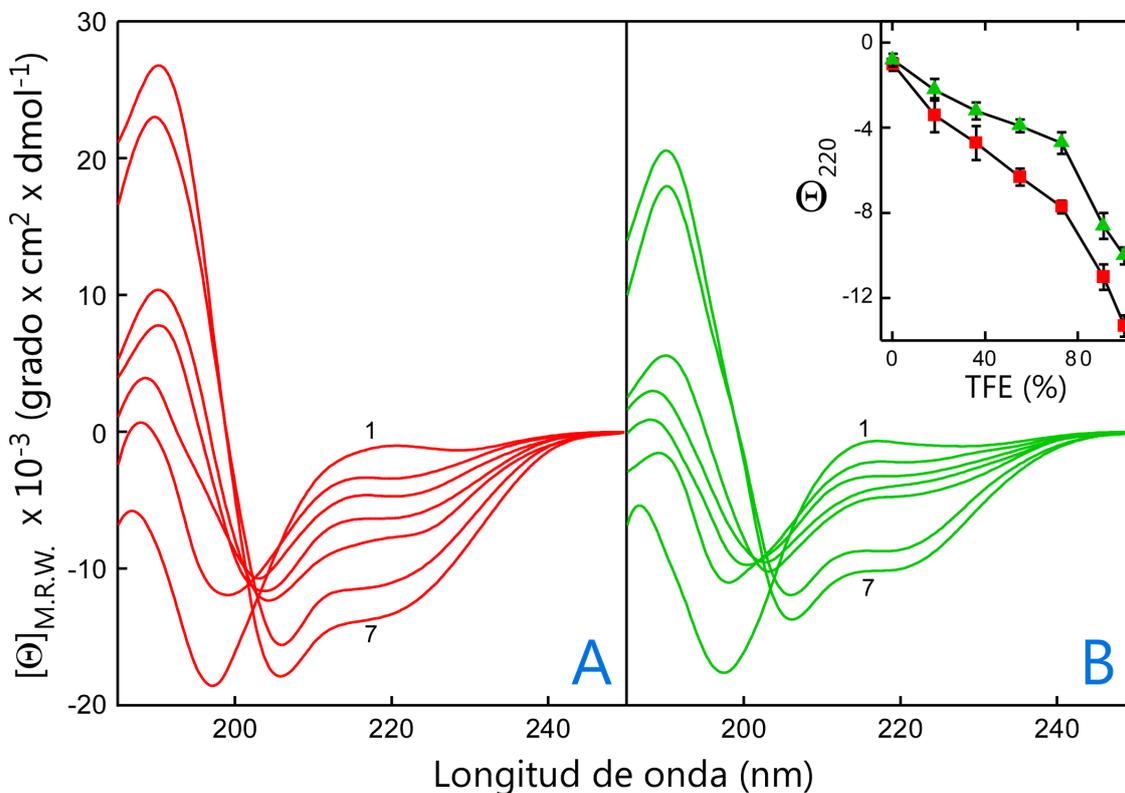


Fig. 1. Espectros de dicroísmo circular de los péptidos ShB (panel A) y ShBL7E (panel B). Las trazas 1 y 7 representan los espectros tomados en H₂O y trifluoroetanol (TFE), respectivamente, mientras que las trazas intermedias corresponden a espectros tomados en mezclas TFE/H₂O. El inserto en el panel B representa el cambio en la elipticidad molar a 220 nm para el péptido ShB (■) y para el péptido ShBL7E (▲) frente al porcentaje de TFE en la mezcla TFE/H₂O. La concentración de cada péptido en estos experimentos fue de 0.1 mg/ml, determinada por análisis de aminoácidos.

En agua, ambos péptidos presentan un espectro casi idéntico, que claramente indica un comportamiento no ordenado (aperiódico). Incrementando el porcentaje de trifluoroetanol resulta un espectro para ambos péptidos característico de la estructura helicoidal, con elipticidades negativas a ~205 y 220 nm y una banda positiva cerca de 190 nm (Dyson y Wright, 1991). Estos resultados son similares a los publicados por Lee y cols. (1993), aunque hay que tener presente la conocida tendencia del TFE a inducir estructura helicoidal en una gran variedad de péptidos y proteínas (Reddy y Nagaraj, 1989; Sönnichsen y cols., 1992; Rohl y cols., 1996). A pesar de las limitaciones impuestas por el uso del TFE, estos experimentos son interesantes ya que sugieren una capacidad de estructuración potencialmente diferente para ambos péptidos, como se deduce del

hecho de que al incrementarse el porcentaje de TFE el péptido ShB alcanza un mayor contenido de estructura helicoidal que el péptido ShBL7E.

En la Fig. 2 se muestra la región del espectro de infrarrojo original (**A**) y desconvoluto (**B**) de los péptidos ShB y ShBL7E disueltos en soluciones de D₂O con diferente fuerza iónica y composición. El espectro de ambos péptidos es prácticamente igual y tiene un máximo de absorbancia centrado en torno a 1645 cm⁻¹, que es característico de conformaciones no ordenadas. La única diferencia a considerar entre los espectros de ambos péptidos bajo estas condiciones es que la banda de 1711 cm⁻¹ es más prominente en el péptido ShBL7E. Esta banda ha sido asignada a vibraciones del grupo carboxilo protonado de la cadena lateral del ácido glutámico, que es la única posición que diferencia a ambos péptidos (Muga y cols., 1990). Utilizando la derivada y la desconvolución, como procedimientos de estrechamiento de banda (Mantsch y cols., 1988; Moffatt y Mantsch, 1992), se encuentra que la banda amida I del espectro de infrarrojo presenta máximos a 1627, 1638, 1660 y 1675 cm⁻¹ debidos a vibraciones del grupo carbonilo del enlace peptídico de diferentes motivos de estructura secundaria. Así, vibraciones comprendidas entre 1623-1636 son asignadas a estructuras β, la banda de 1660 cm⁻¹ a hélices y la banda de 1675 cm⁻¹ que incluye tanto contribuciones de giros como de vibraciones de estructura β (0, β) (Byler y Susi, 1986; Arrondo y cols., 1987; Surewicz y Mantsch, 1988). Se han encontrado otras bandas componentes a 1613, 1605 y 1586 cm⁻¹ asignadas a diferentes vibraciones de cadenas laterales de aminoácidos (Chirgadze y cols., 1975; Muga y cols., 1990).

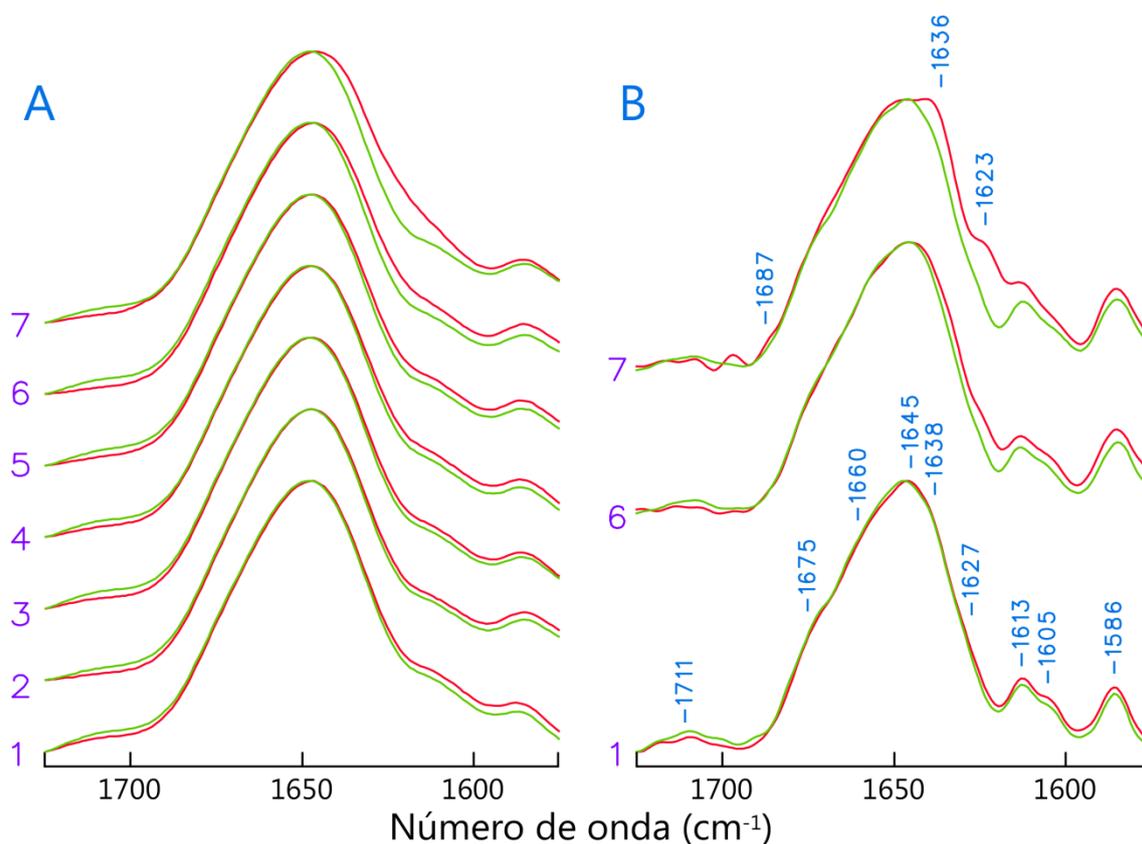


Fig. 2. Región que contiene a la banda amida I del espectro de infrarrojo original (**A**) y desconvuelto (**B**) de los péptidos ShB (—) y ShBL7E (—) en D₂O (trazas 1) o en diferentes tampones: Hepes 10 mM; pD 7.8 (trazas 2); Hepes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7.4 (trazas 3); Hepes 5 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 115 mM, KCl 2 mM, pD 7.4 (trazas 4); y Hepes 10 mM, pD 7.8, que contiene NaNO₃ 100 (trazas 5), 200 (trazas 6) y 300 mM (trazas 7). Tanto en ésta como en las demás figuras recogidas en esta Memoria que contienen espectros de infrarrojo se presenta el espectro de la muestra resultante de restar el correspondiente espectro del tampón solo. Los números situados sobre los espectros en el panel B representan los números de onda de los componentes más característicos detectados tras la desconvolución. La temperatura se mantuvo a 20 °C.

El aumento de la fuerza iónica produce un cambio en el espectro de infrarrojo del péptido ShB a frecuencias bajas respecto al del péptido ShBL7E (ver **Fig. 2A**). La desconvolución de ambos espectros revela que el cambio se corresponde fundamentalmente con la aparición de un componente a 1636 cm⁻¹ y otro a 1623 cm⁻¹, más pequeño, de estructura β, cuyas intensidades aumentan al incrementarse la fuerza iónica (ver **Fig. 2B**). En otros experimentos realizados con tampones con gran concentración de K⁺ o Na⁺ (ver **Fig. 2A**, trazas **3** y **4**), tratando de imitar los medios "intracelular" y "extracelular", respectivamente, se obtienen espectros sin diferencias significativas respecto a los obtenidos en tampón Hepes/NaNO₃ de fuerza iónica comparable (ver **Fig. 2A**, traza **5**).

En la **Fig. 3**, se muestra el efecto del pD sobre el espectro de infrarrojo de los péptidos ShB y ShBL7E. Como puede observarse el espectro de ambos péptidos es prácticamente igual en el rango de pD 3.4-7.4. A partir del pD 8.4 encontramos un pequeño cambio en la banda amida I del péptido ShB a bajas frecuencias, cambio similar al observado como consecuencia del aumento de la fuerza iónica (ver **Fig. 1A**, trazas **6** y **7**). Por otra parte, el espectro del péptido ShBL7E apenas experimenta cambios en todo el rango de pD estudiado, salvo el hecho de la desaparición de la vibración del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico (1711 cm^{-1}), lo que ocurre a un valor de pD inusualmente alto. Además, aparece una banda centrada a 1565 cm^{-1} a partir de pD superior a 7.4, que ha sido asignada a vibraciones del grupo carboxilo desprotonado de la cadena lateral del ácido glutámico (Muga y cols., 1990). Dado que esta interconversión entre las formas protonada y desprotonada del ácido glutámico ocurre sólo en el péptido ShBL7E, parece razonable asumir que se trata de la titulación del Glu en posición 7, ya que el es único aminoácido diferente en la secuencia del péptido mutante. En cualquier caso, la independencia del pD de la conformación de ambos péptidos sugiere que tanto la neutralización de residuos ácidos como básicos de la secuencia de los péptidos no influye en su capacidad de adopción de estructura en solución acuosa.

En disolución acuosa en presencia de colato sódico a concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica se observan pequeños cambios en el espectro de ambos péptidos. Sin embargo, la presencia de micelas de detergente (concentraciones superiores a 14 mM) determina que el péptido ShB se estructure, a juzgar por la aparición de un hombro a aproximadamente 225 nm en el espectro de dicroísmo circular (no se presenta figura) y dos componentes en la banda amida I del espectro de infrarrojo indicativos de adopción de estructura β , uno de baja frecuencia a 1633 cm^{-1} y otro de alta frecuencia a 1687 cm^{-1} , así como un componente a 1615 cm^{-1} (ver **Fig. 4B**), que se ha atribuido a la presencia de puentes de hidrógeno de hojas β intermoleculares (Muga y cols., 1990). Por el contrario, el péptido ShBL7E permanece con una conformación predominantemente no ordenada (ver **Fig. 4B**) cuando se encuentra en las mismas condiciones experimentales.

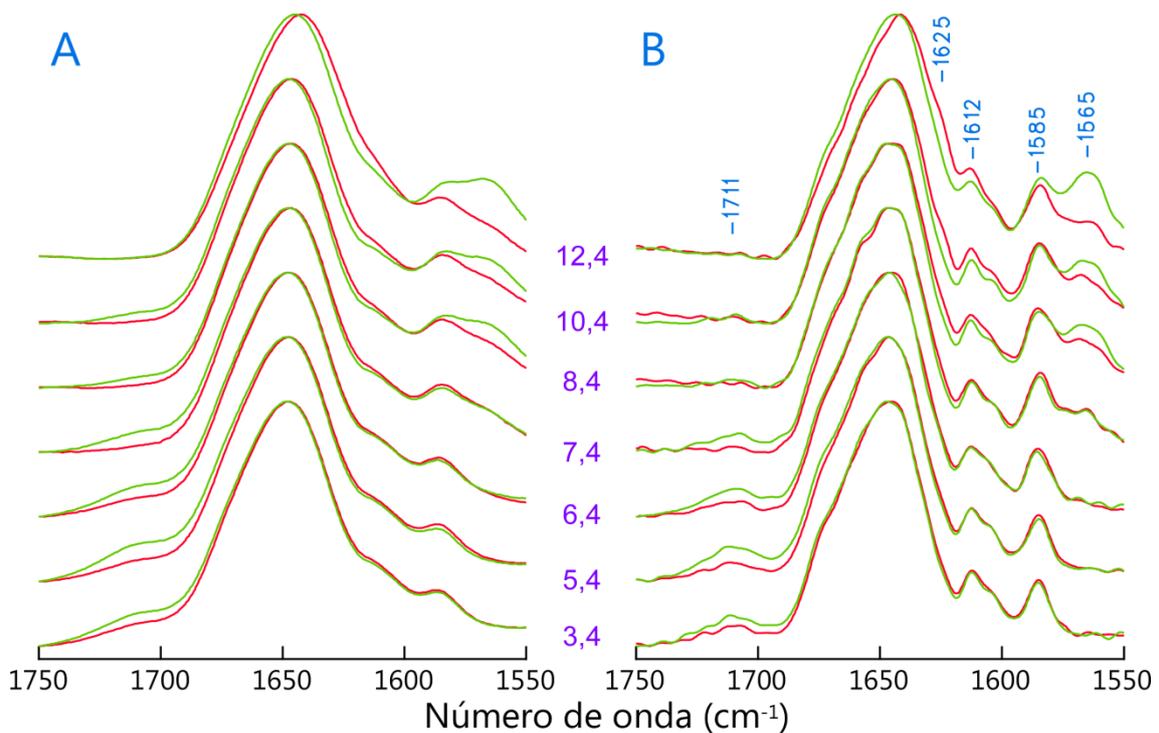


Fig. 3. Banda amida I del espectro de infrarrojo original (A) y desconvuelto (B) de los péptidos ShB (—) y ShBL7E (—) en tampones de D₂O con fosfato 10 mM, 130 mM KCl, 20 mM NaCl; a los valores de pD indicados (3,4-12,4).

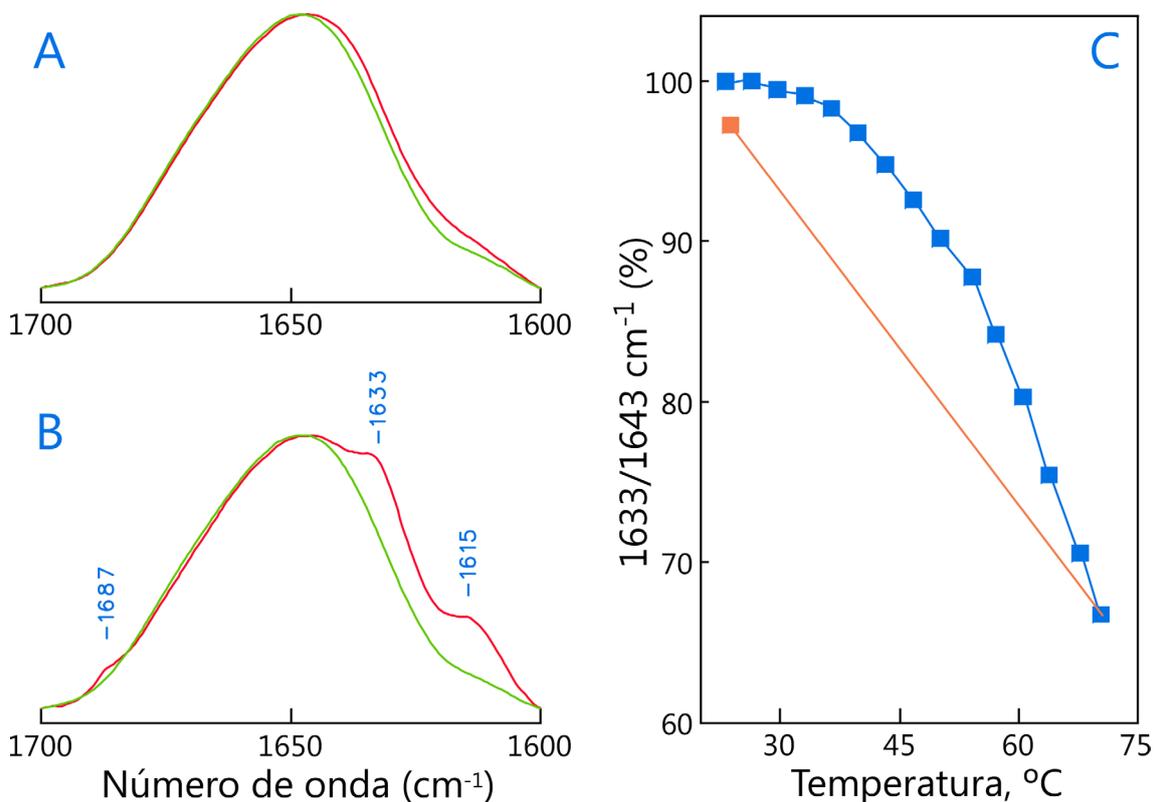


Fig. 4. Efecto del colato 5 mM (A) y 20 mM (B) sobre la banda amida I del espectro original de los péptidos ShB (—) y ShBL7E (—) en tampones de D₂O de Hepes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7.4. (C) Dependencia de la temperatura de la razón de absorbancias entre 1633/1643 cm⁻¹ (cuadrados blancos) que se observa durante un proceso de desnaturalización térmica (en el que se toman espectros en un rango de temperaturas de 23,1-70,1 °C y la recuperación posterior de la temperatura inicial del péptido ShB en el tampón anterior con colato 20 mM).

La estabilidad de los componentes de estructura β observados en el espectro del péptido ShB en presencia de micelas de detergente se ha estudiado sometiendo a la muestra a un progresivo aumento de temperatura que produce la pérdida de la estructura adoptada por el péptido, lo que puede seguirse midiendo las alteraciones en la banda amida I (Fernández-Ballester y cols., 1992). Se puede observar una progresiva disminución de dichos componentes con la temperatura (ver Fig. 4C) que, no obstante, recuperan su absorbancia inicial cuando se enfría la muestra que había sido calentada. Esto indica que la desnaturalización térmica del péptido ShB supone un proceso reversible de pérdida de estructura.

El tratamiento con proteasas como la tripsina supone una pérdida de la capacidad inactivante del péptido ShB (Zagotta y cols., 1990). En su secuencia primaria existen cuatro puntos potenciales de hidrólisis por tripsina tanto en el péptido ShB como en el ShBL7E, situados en las posiciones 14, 17, 18 y 19 de su secuencia primaria. Los cromatogramas de HPLC en fase reversa en una columna Ultrasphere ODS C_{18} (10 x 150 mm) y un gradiente lineal de agua/acetonitrilo 0-70 % en TFA al 0.1 % de los péptidos ShB y ShBL7E antes y después de su hidrólisis con tripsina se muestran en la **Fig. 5**. Como corresponde a su mayor hidrofobicidad, el péptido ShB presenta un mayor tiempo de retención que el ShBL7E (aprox. 5 minutos) y en estas condiciones de cromatografía aparecen a un tiempo de 34 y 39 minutos, respectivamente. Como resultado de la hidrólisis se detecta un único pico mayoritario (residuos 1-14) en ambos péptidos y, a su vez, aparecen con un retardo de 5 minutos en el cromatograma, es decir, a 39 y 44 minutos, respectivamente. El espectro de infrarrojo de la mezcla de péptidos resultante de la proteólisis del péptido ShB, así como de la del péptido ShBL7E (ver **Fig. 6**, trazas **2**) en presencia de vesículas fosfolipídicas cargadas negativamente presenta una banda amida I que carece de los componentes típicos de la adopción de estructura β que pueden observarse en la situación control (péptido no hidrolizado) (ver **Fig. 6**, trazas **3**). Igualmente, el espectro de infrarrojo del fragmento mayoritario (residuos 1-14) resultante de la hidrólisis en ambos péptidos carece de los componentes propios de estructura β a 1623 y 1687 cm^{-1} (ver **Fig. 6**, trazas **1**).

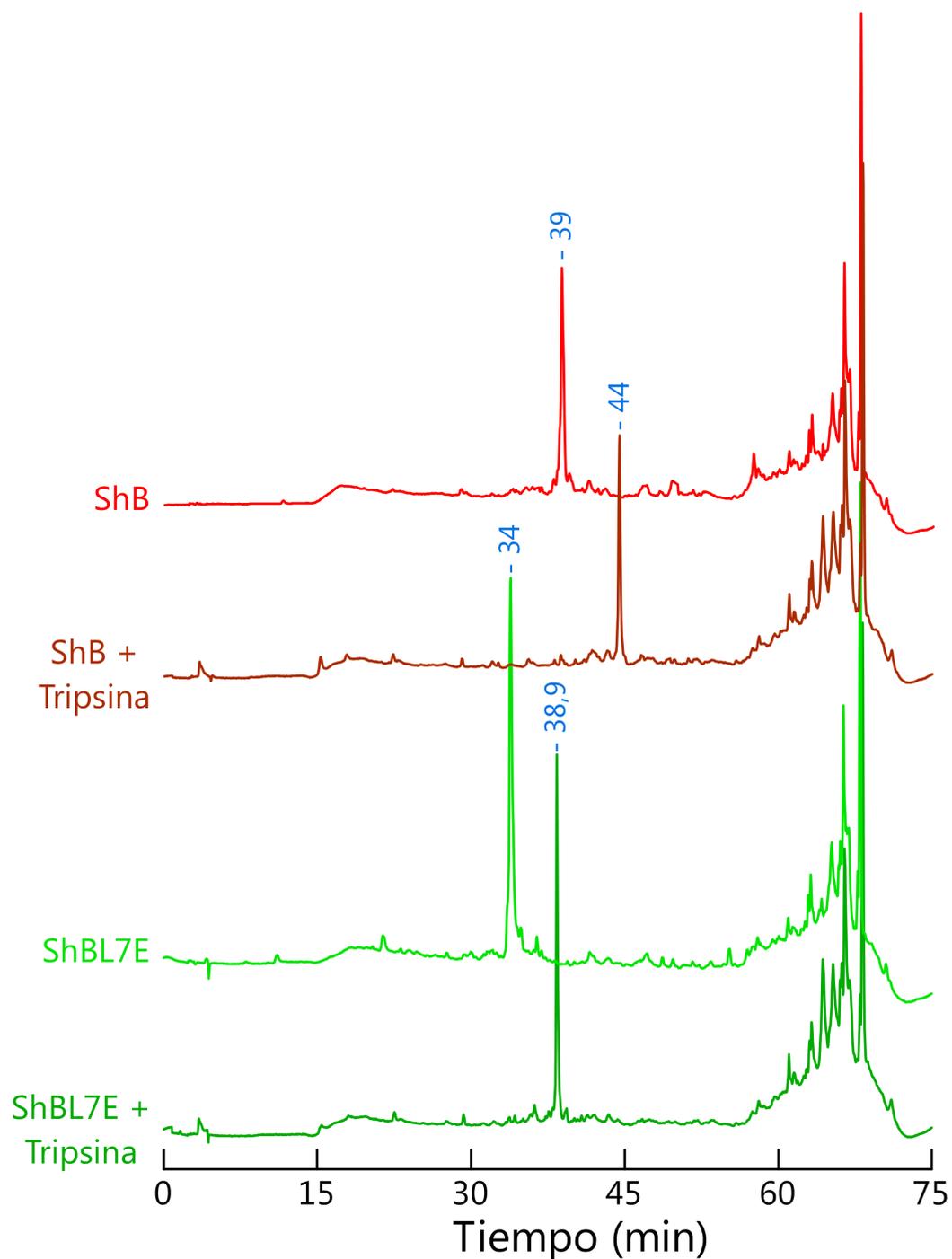


Fig. 5. Cromatogramas de HPLC en fase reversa en una columna Ultrasphere ODS C₁₈ (10 x 150 mm) y un gradiente lineal de agua/acetonitrilo 0-70 % en TFA al 0.1 % de los péptidos ShB y ShBL7E, así como de las muestras resultantes de la hidrólisis con tripsina de los mismos.

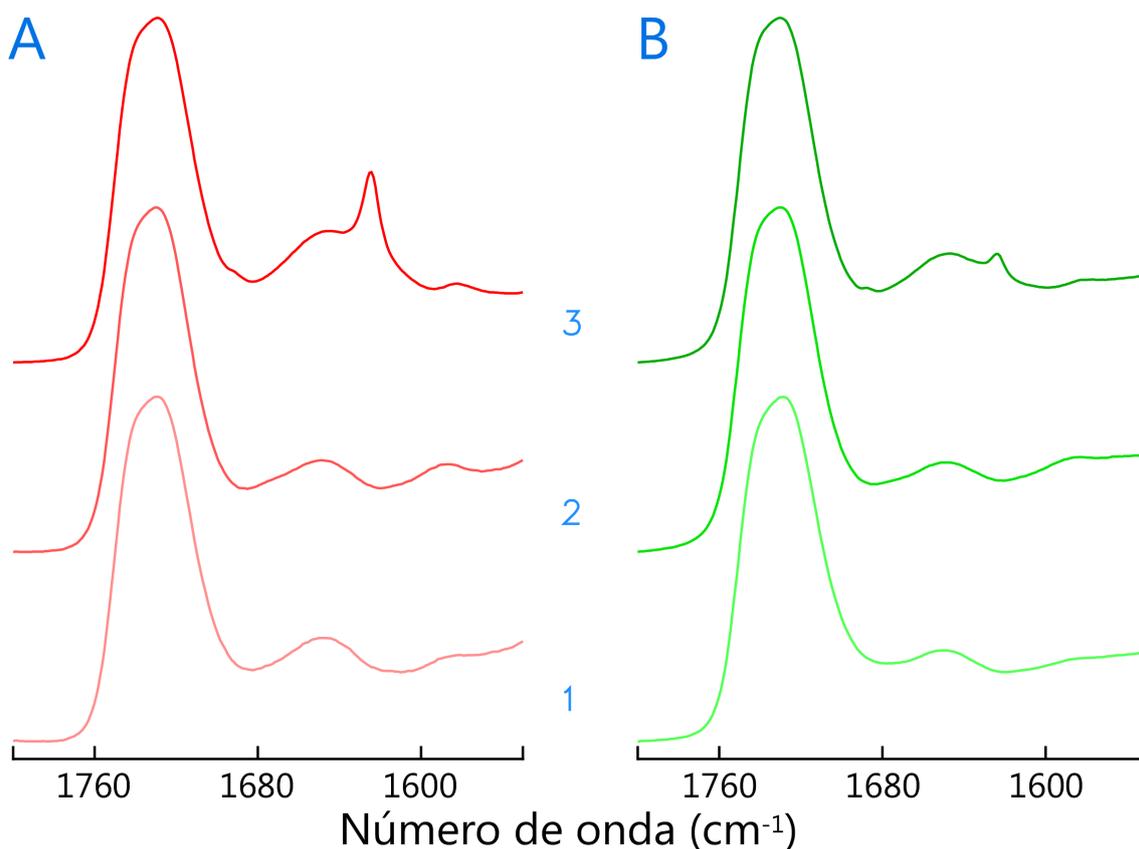


Fig. 6. Efecto de la tripsina sobre la banda amida I del espectro de infrarrojo de los péptidos ShB (**A**) y ShBL7E (**B**) a una concentración de 2,5 mg/ml en tampón de D₂O de Hepes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4 y en presencia de vesículas de fosfatidilglicerol (25 mg/ml). Las trazas superiores (3) corresponden a los espectros de los péptidos control (sin tratar), las medias (2) a las de los péptidos digeridos por la tripsina y las inferiores (1) a las de los fragmentos mayoritarios (residuos 1-14) purificados por HPLC.

En la **Fig. 8** se muestra la banda amida I del espectro de infrarrojo de los péptidos ShB y ShBL7E en presencia de vesículas de diferentes tipos de fosfolípidos. Ambos péptidos en presencia de vesículas de PC (ver **Fig. 8, A y B**) (al igual que ocurría en el tampón solo en ausencia de lípidos) presentan una banda amida I con un máximo centrado a 1645 cm^{-1} característico de una estructura proteica no ordenada. Esta similitud entre los espectros de los péptidos en solución acuosa y en presencia de vesículas zwitteriónicas de PC concuerda, como se verá más adelante, con la falta de unión entre los péptidos y estas vesículas. Por el contrario, el espectro del péptido ShB en presencia de vesículas formadas a partir de fosfolípidos aniónicos como PA o PG presenta una banda prominente centrada a 1623 cm^{-1} y otra más pequeña centrada a 1689 cm^{-1} (ver trazas inferiores en la **Fig. 8, C y E**), que han sido relacionadas con la adopción de una estructura β estable (Demel y cols., 1990; Hunt y cols., 1997a, Hunt y cols., 1997b). Ambos componentes están siempre presentes en el caso del péptido ShB, manteniendo su importancia relativa (la relación de absorbancias $1623/1643\text{ cm}^{-1}$

permanece constante) en el rango de concentraciones de péptido (1.2-10 mg/ml) y de fosfolípido (25 mg/ml) utilizados (ver **Fig. 9, A y B**), indicando que su presencia no es dependiente de concentración. Por el contrario, el péptido ShBL7E únicamente adopta dichos componentes espectrales cuando las condiciones son muy favorables y además no sólo son menos prominentes sino que su aparición es dependiente de la concentración de péptido y del tipo de fosfolípido usado (sólo están presentes con vesículas de PG) (ver **Fig. 9, C y D**). En experimentos realizados a pD 8.9 (ver **Fig. 10, H**), al que el grupo carboxilo del ácido glutámico en posición 7 debe estar totalmente desprotonado (ver **Fig. 1B**), se observa la completa desaparición de los componentes de estructura β en el espectro del péptido ShBL7E frente a vesículas de PG (ver **Fig. 10, D**). De esta forma podemos pensar que las dificultades que encuentra el péptido ShBL7E para adoptar estructura β a $pD \geq 8.9$ están relacionadas con la presencia de una carga neta negativa (Glu7) en su dominio N-terminal.

Otra característica diferencial que pone de manifiesto las distintas preferencias estructurales de los péptidos ShB y ShBL7E es la estabilidad de la estructura β formada. En este sentido, aunque los espectros del péptido ShB en presencia de vesículas de PG y PA son bastante similares puede observarse que la estabilidad del componente de 1623 cm^{-1} a la desnaturalización térmica es claramente distinta, sin olvidar que el péptido ShBL7E únicamente adopta esta estructura en presencia de vesículas de PG. A $70 \text{ }^\circ\text{C}$ su absorbancia (ShB/PG) no es inferior al 65 % de la observada a temperatura ambiente, mientras que en presencia de vesículas de PA disminuye mucho más como consecuencia del aumento de la temperatura (ver **Fig. 8, C y E**, trazas medias). En el caso del péptido ShBL7E y bajo similares condiciones prácticamente desaparece a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (ver **Fig. 8, F**, traza media), sin recuperarse cuando se vuelve a la temperatura inicial (ver **Fig. 8, F**, traza superior). El seguimiento de ShB en otras situaciones experimentales revela que 1) hay una recuperación de la forma del espectro, casi total, después de la renaturalización de la muestra previamente calentada (ver **Fig. 8, C y E**, trazas superiores), 2) es prácticamente insensible al aumento de la fuerza iónica, a menos que las vesículas lipídicas sean preincubadas antes de añadir el péptido con una gran concentración de sal (NaCl 1M) (ver **Fig. 7**, traza **3**), 3) es insensible a bajas concentraciones de detergentes no aniónicos como el octilglucósido, salvo que la concentración de detergente utilizada sea superior a la concentración micelar crítica

(ver **Fig. 7**, traza **4**), **4**) es insensible a la presencia de EDTA en concentraciones milimolares (ver **Fig. 7**, traza **2**).

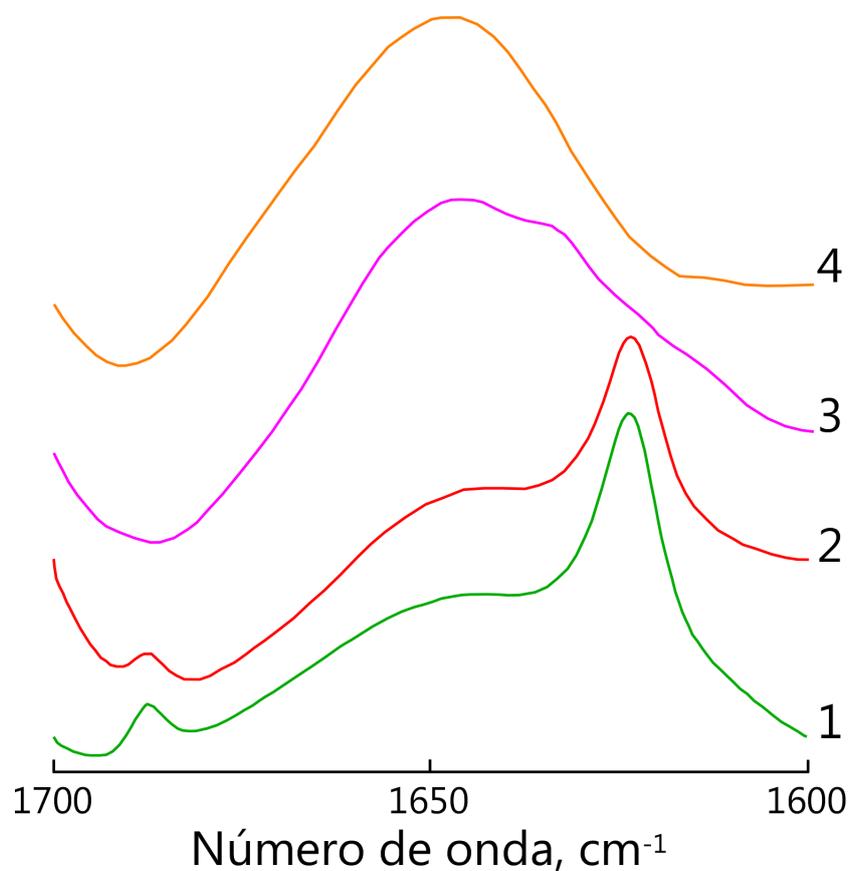


Fig. 7. Banda amida I del espectro de infrarrojo del péptido ShB en presencia de vesículas de PG en tampón de D₂O de Hepes 10 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7.4 Control (**1**), 100 mM EDTA (**2**), 1 M NaCl (**3**) y 2 % n-octil- β -glucopiranosido (**4**). La concentración de péptido es 4 mM y la de lípido 32 mM.

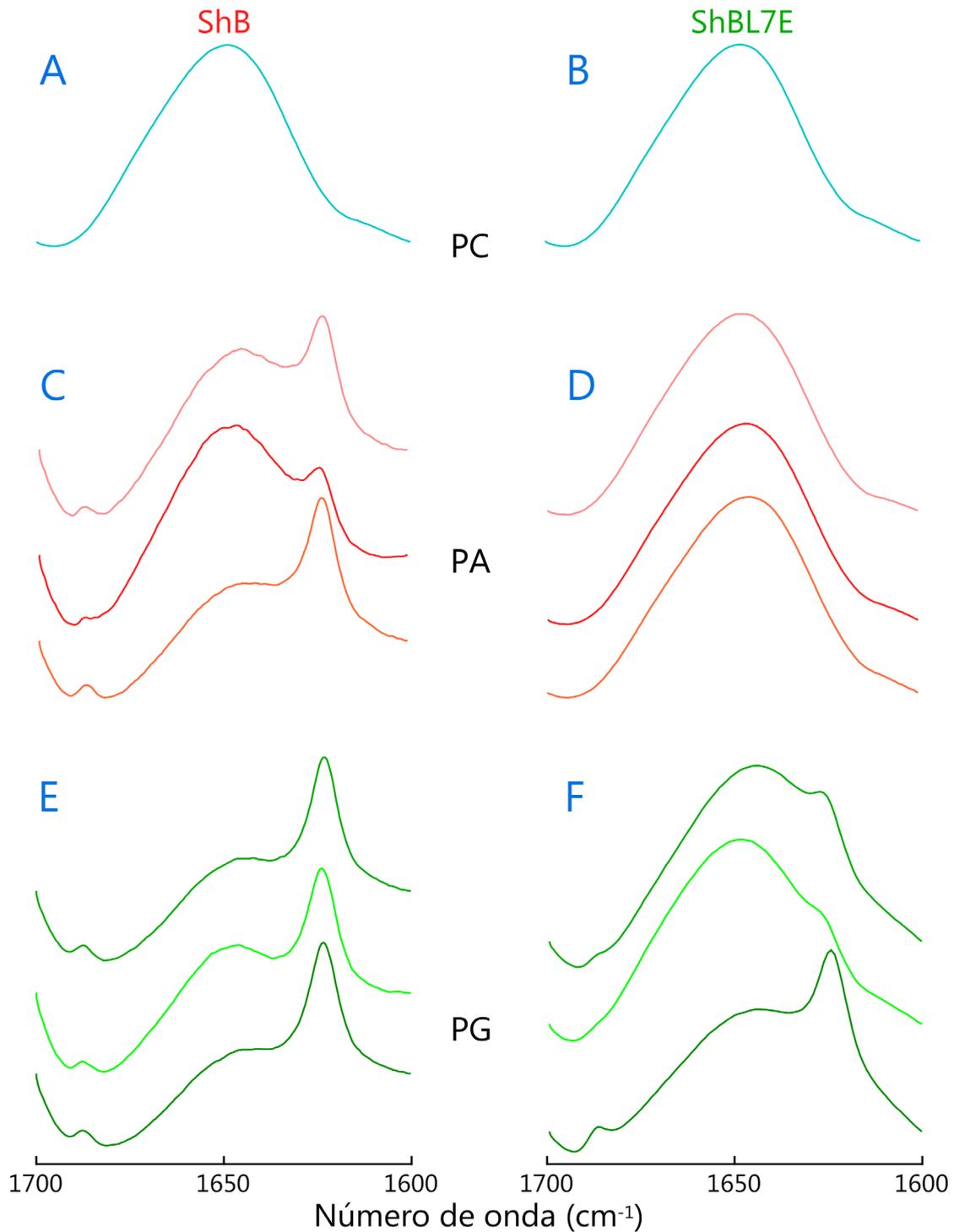


Fig. 8. Banda amida I del espectro de infrarrojo original de los péptidos ShB (A, C y E) y ShBL7E (B, D y F) en presencia de vesículas de PC (A y B), PA (C y D) y PG (E y F) resuspendidos en tampón de D_2O de Hapes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4 La concentración final de ambos péptidos en todas las muestras es $\sim 4,5$ mM y la de fosfolípido varía entre 32 y 35 mM, dependiendo del tipo. Los tres espectros que se muestran en los paneles C, D, E y F corresponden a una misma muestra, tomando a 20 °C (traza inferior), 70 °C (traza media) y después de la renaturalización a 20 °C.

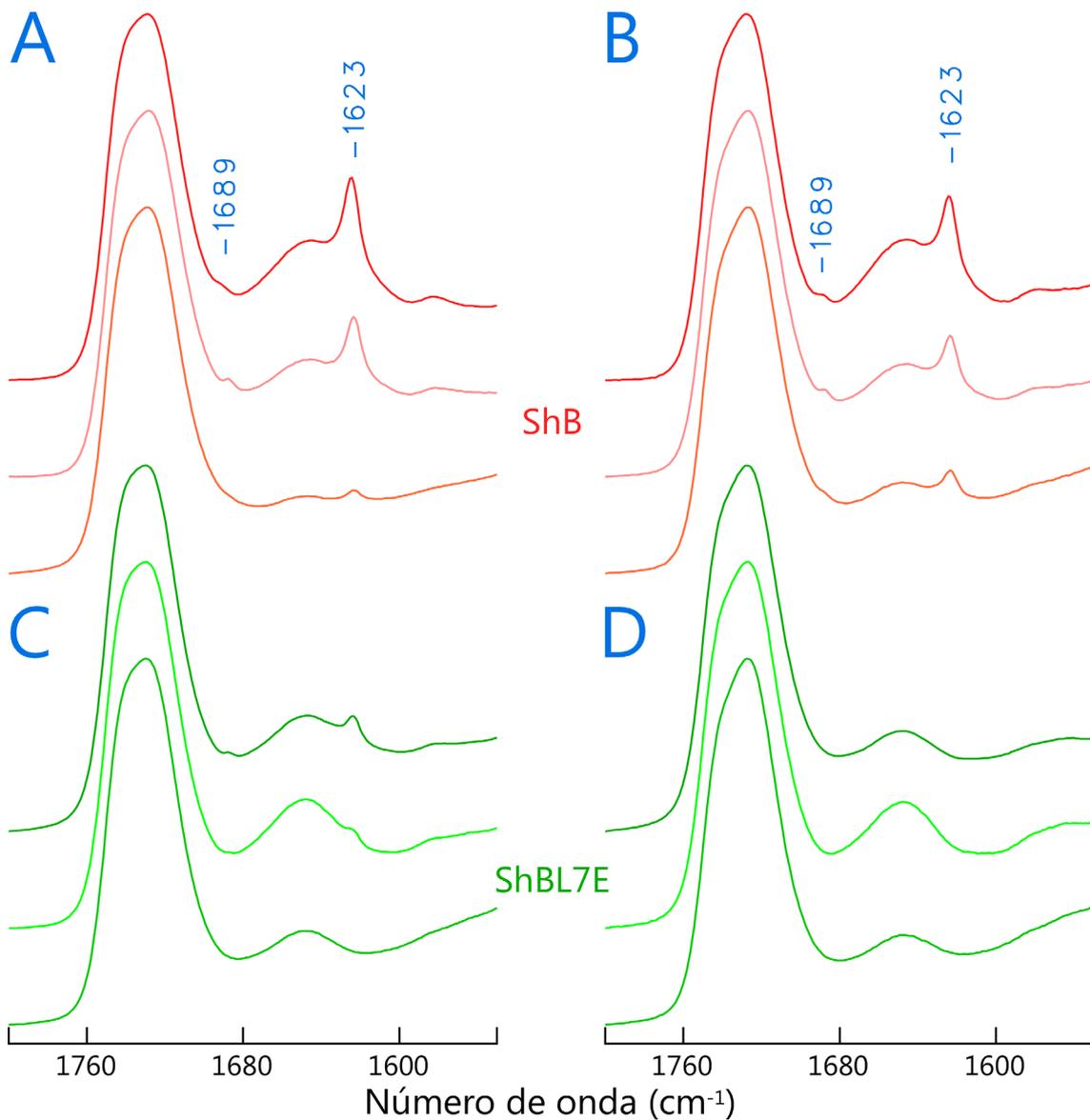


Fig. 9. Región comprendida entre 1550 y 1800 cm^{-1} del espectro original de los péptidos ShB (**A** y **B**) y ShBL7E (**C** y **D**) en presencia de vesículas de fosfatidilglicerol (**A** y **C**) y ácido fosfatídico (**B** y **D**) en tampón de D_2O de HEPES 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4 En todos los experimentos de esta figura la concentración de fosfolípido se mantiene a 25 mg/ml. La concentración de cada péptido en todos los paneles es de 5 mg/ml (traza superior), 2,5 mg/ml (traza media) y 1,25 mg/ml (traza inferior).

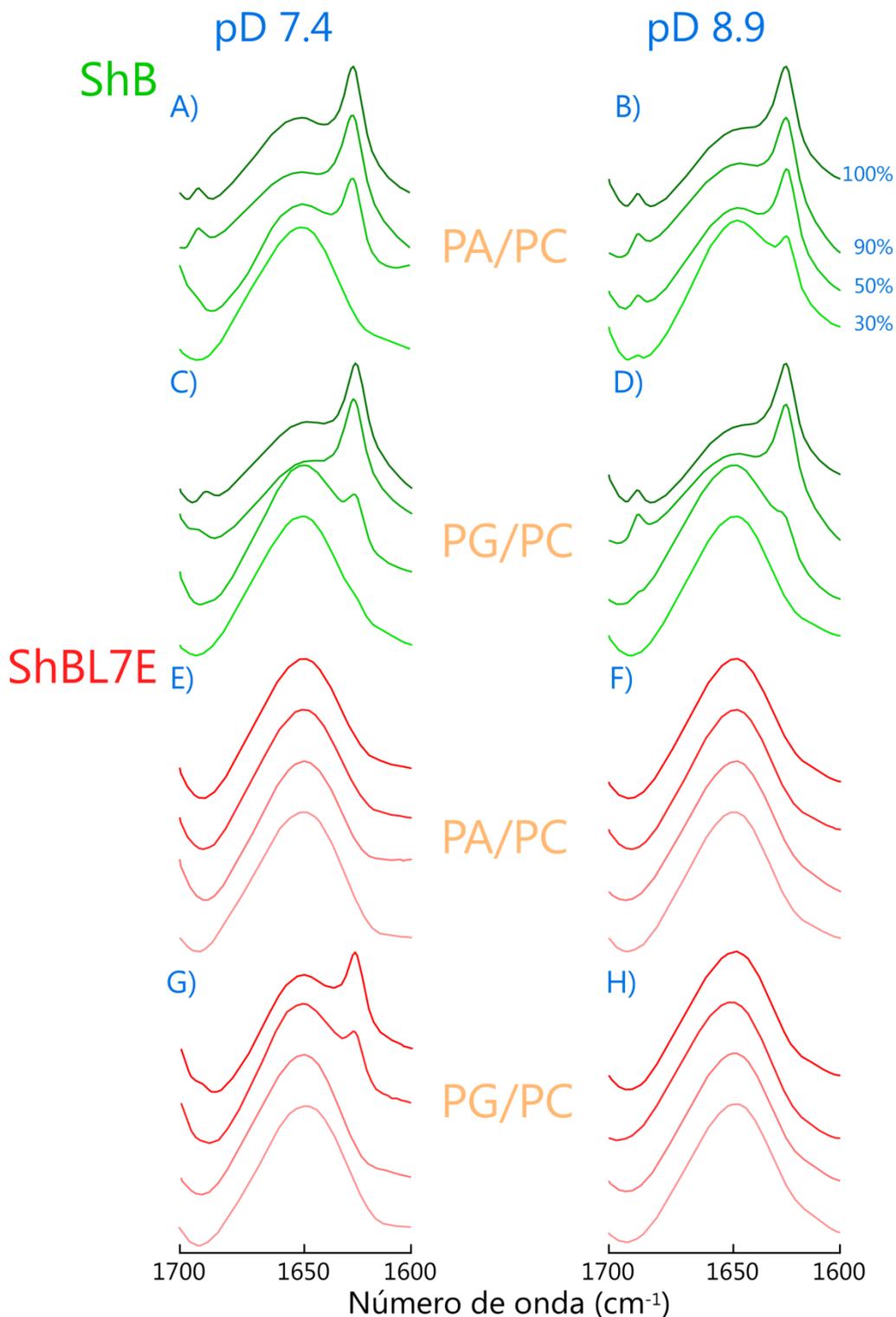


Fig. 10. Banda amida I del espectro de infrarrojo de los péptidos ShB (A-D) y ShBL7E (E-H) en presencia de vesículas hechas a partir de mezclas PA/PC (A, B, E y F) o PG/PC (C, D, G y H). Los espectros de la columna izquierda (A, C, E y G) han sido tomados a partir de muestras disueltas en tampón de D₂O de Hepes 10 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7.4 y los de la columna derecha (B, D, F y H) en tampón de D₂O de Epps 10 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 8.9. En cada panel los espectros corresponden a diferentes muestras en las que el porcentaje de fosfolípido ácido (PA o PG) de las mezclas fosfolípido ácido/PC se hicieron empleando el 30 %, 50 %, 90 % y 100 % (desde la traza inferior a la superior de cada panel, respectivamente). Las concentraciones de péptido y fosfolípido son aproximadamente las mismas que las empleadas en la Fig. 8.

Teniendo presente los experimentos de unión de los péptidos marcados con sondas fluorescentes, que se describen más adelante, a vesículas lipídicas cabe esperar que para las relaciones lípido/péptido utilizadas en los experimentos de FTIR sólo parte del péptido añadido se una al lípido. De esta forma la banda amida I (ver **Fig. 8**) resulta de las contribuciones tanto del péptido unido como del libre. Tomando el espectro a partir del sedimento resultante de ultracentrifugar una mezcla, previamente incubada, de péptido ShB/vesículas de PG, en la que en principio solamente parte del péptido presente debe encontrarse unido al lípido, podemos observar una banda a 1623 cm^{-1} más prominente como consecuencia de la menor contribución del componente no ordenado, ya que habremos eliminado el péptido libre que estaba contribuyendo de forma mayoritaria a dicho componente (ver **Fig. 11**).

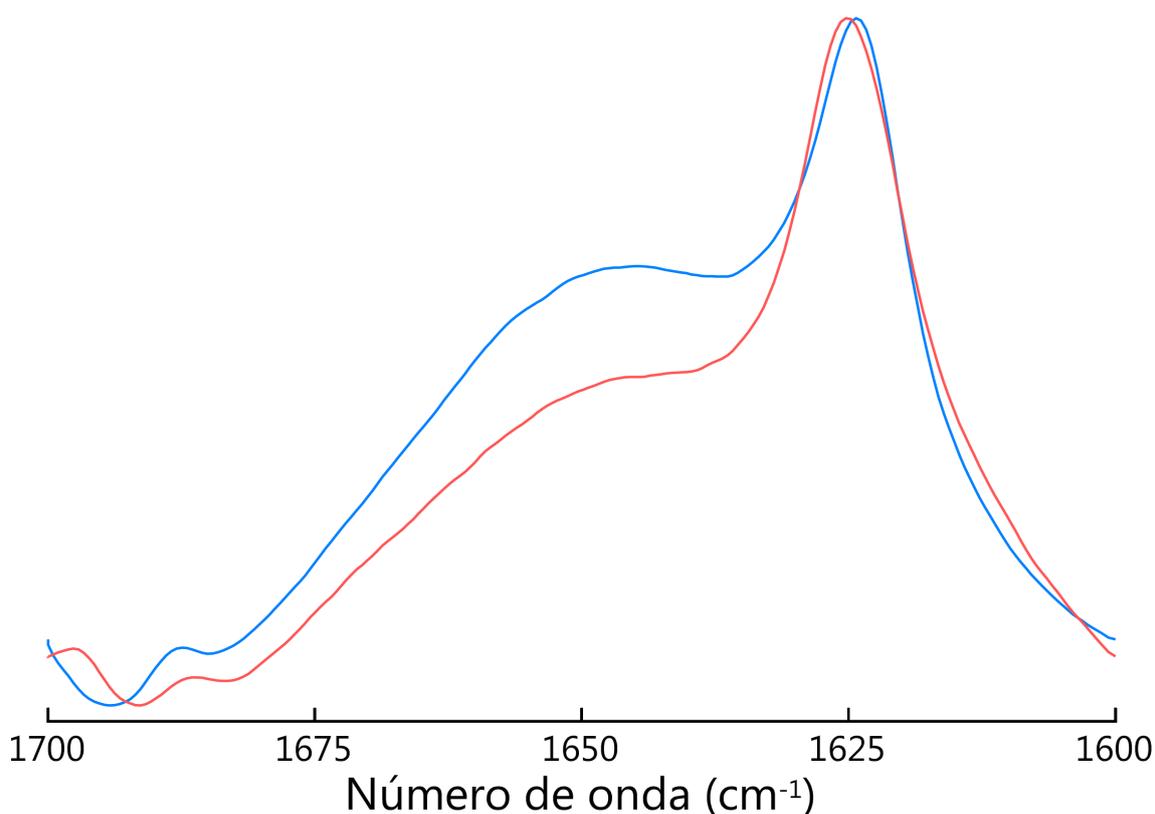


Fig. 11. Banda amida I del espectro de infrarrojo del péptido ShB en presencia de vesículas de PG con () y sin () ultracentrifugación de la mezcla péptido/lípido previamente incubada. La muestra que no es centrifugada se resuspende en un tampón de D_2O de Hepes 10 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4 y la que se centrifuga se encuentra inicialmente en el mismo tampón acuoso (pH 7,0) para realizarse posteriormente el intercambio de H_2O a D_2O por ultracentrifugación. Las concentraciones de péptido y fosfolípido son aproximadamente las mismas que las empleadas en la **Fig. 8**.

Dado que la adopción de estructura β por parte del péptido ShB ocurre sólo en presencia de vesículas fosfolípídicas aniónicas pero no en vesículas de PC, se han realizado experimentos utilizando mezclas de fosfolípidos aniónicos (PA y PG) y PC para determinar la cantidad mínima de PA o PG necesaria para inducir dicha estructuración en el péptido, siguiendo, fundamentalmente, la aparición del componente a 1623 cm^{-1} . En la **Fig. 10, A y C**, se muestra que para que aparezca dicho componente a 1623 cm^{-1} en el espectro de infrarrojo del péptido ShB se requiere un porcentaje alto ($\sim 50\%$) del componente aniónico, tanto PA como PG, de la mezcla. Se han llevado a cabo experimentos similares a pD 8,9 (pensando en que la desprotonación del PA monoaniónico ocurre a un $\text{pK}_a \sim 8$) para estudiar el posible papel del aumento de la carga superficial de estas vesículas en el fenómeno de adopción de estructura β en el péptido ShB. A pD 8,9, la mayoría de las moléculas de PA deben encontrarse en forma dianiónica confiriendo una carga superficial negativa neta a las vesículas de PA/PC considerablemente mayor que la correspondiente para vesículas PG/PC. En estas condiciones, el componente a 1623 cm^{-1} del espectro del péptido ShB aparece a porcentajes de PA en las vesículas PA/PC más bajos ($\sim 30\%$) (ver **Fig. 10 B**) y ello a pesar de que a este valor de pD los grupos básicos del péptido se encontrarán desprotonados. Respecto al péptido mutante ShBL7E, el componente de 1623 cm^{-1} sólo aparece en vesículas de PG/PC y para porcentajes altos de PG (ver **Fig. 10 G**). El aumento del pD a 8,9 supone la completa desaparición de dicho componente (ver **Fig. 10 H**).

La adopción de estructura β por parte del péptido ShB también se ha estudiado utilizando vesículas lipídicas preparadas a partir de fosfolípidos sintéticos de DMPA y DMPG. Como puede observarse en la **Fig. 12** la aparición del componente típico a 1623 cm^{-1} ocurre a temperaturas superiores a la temperatura de transición de fase gel a líquido cristalino, tanto para el DMPG ($T_m \approx 50\text{ C}$) como para el DMPA ($T_m \approx 19\text{ C}$). Esto sugiere que el péptido ShB tiene acceso al interior hidrofóbico de la membrana, probablemente posibilitado en este caso por la mayor fluidez de la fase líquido cristalino. La inserción del péptido se ha estudiado con más detalle por técnicas de DSC y criofractura, como se describe más adelante en esta Memoria.

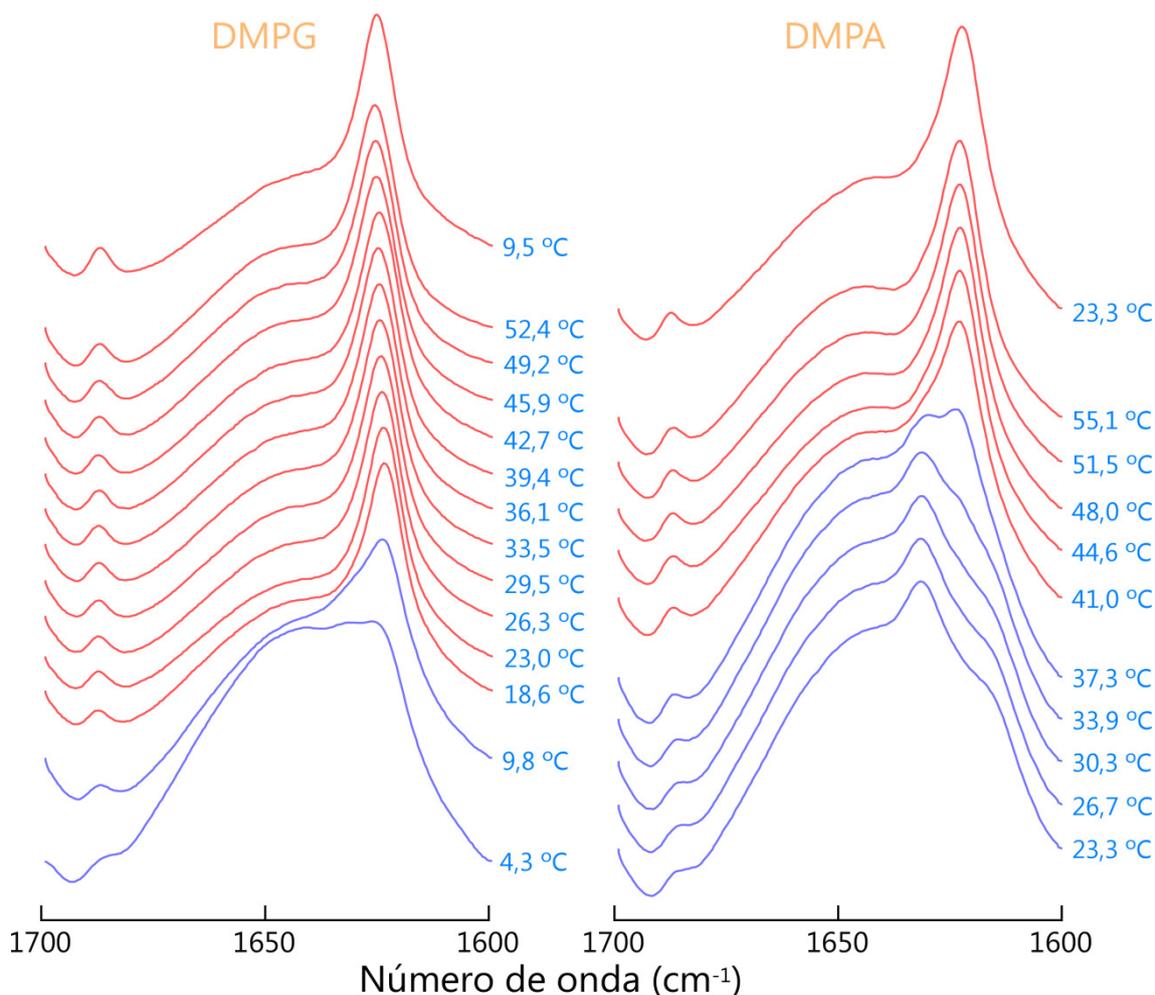


Fig. 12. Banda amida I del espectro de infrarrojo del péptido ShB en presencia de vesículas de DMPG (A) y DMPA (B) en un tampón de D₂O de Hepes 10 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7.4 Las concentraciones de péptido y fosfolípido son aproximadamente las mismas que las empleadas en la Fig. 8.

7.2. Unión de péptidos a vesículas fosfolipídicas.

Para estudiar la unión de los péptidos sintéticos a diferentes tipos de membranas fosfolipídicas se han obtenido derivados fluorescentes por alquilación con NBD-iodoacetamida del grupo sulhidrilo de la Cys añadida en el extremo C-terminal de ambos (ver **Tabla II**, más adelante). El NBD es una sonda fluorescente sensible a la hidrofobicidad del entorno, de forma que si se sitúa en un medio hidrofóbico aumenta considerablemente su rendimiento cuántico y cambia ligeramente la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia. Esto nos permite disponer de un método con gran sensibilidad y altamente reproducible que ha sido utilizado para estudiar la unión de una amplia gama de péptidos a vesículas fosfolipídicas (Peled y Shai, 1993).

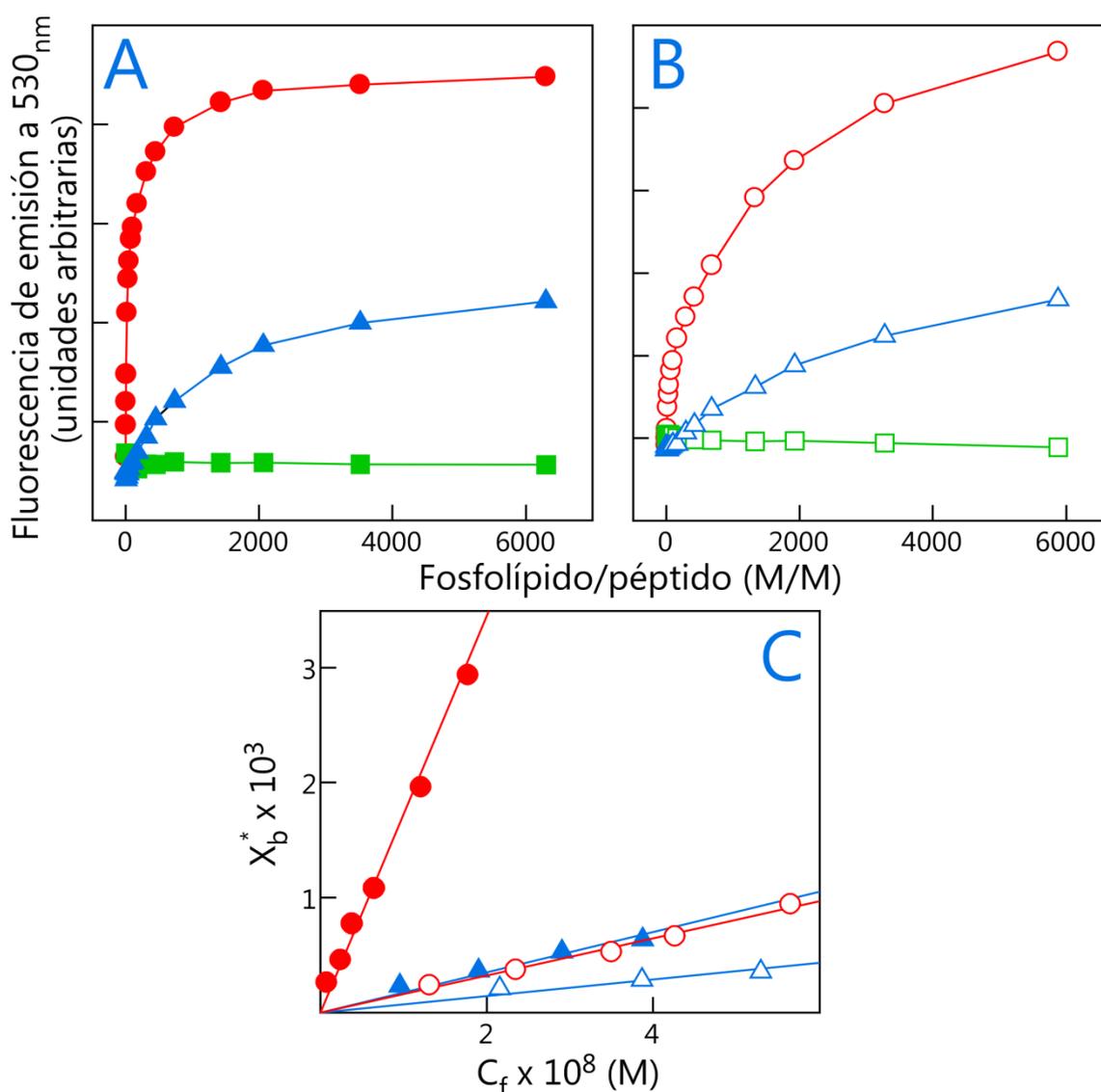


Fig. 13. Representación del cambio de fluorescencia de emisión de disoluciones 1 μM de péptido ShB (A) y ShBL7E (B) cuando se realiza una titulación con vesículas de PC (■, □), PG (▲, △) y PA (●, ○) a las relaciones molares fosfolípido/péptido indicadas. (C) Representación de X_b^* versus C_f para las muestras incluidas en los paneles A y B, que es usado para determinar el coeficiente de partición superficial (K_p^*) que se presenta en la **Tabla I**. El tampón utilizado en estos experimentos es Hepes 10 mM, NaCl 100 mM; pH 7,0.

El experimento se lleva a cabo de forma que se añaden pequeños volúmenes con vesículas fosfolípídicas unilamelares pequeñas de concentración creciente a alícuotas con una concentración fija de péptido-NBD, resultando un aumento de la intensidad de fluorescencia con el aumento de la relación molar fosfolípido/péptido (ver **Fig. 13**). El análisis de los datos de variación de la intensidad de fluorescencia, que se realiza con la metodología descrita por Peled y Shai (1993), permite determinar el *coeficiente de partición superficial* (K_p^*) (ver **Apéndice II**), asumiendo que el péptido se reparte únicamente sobre la hemicapa externa de los diferentes tipos de vesículas fosfolípídicas (ver **Tabla I**).

Tabla I: Máximos de emisión de fluorescencia (λ_{\max}) y coeficiente de partición superficial que presentan los péptidos marcados con NBD en presencia de vesículas de fosfolípido.

Nombre del péptido	pH	tampón	λ_{\max} (nm)			$K_p^* \times 10^{-4}$ (M^{-1})		
			PC	PA	PG	PC	PA	PG
ShB -NBD	7	555	551	531	531	no unión	77,1±11,6	2,80±1,1
ShBL7E -NBD	7	554	551	533	534	no unión	3,05±1,45	0,72±0,2
ShB -NBD	8.5	552	---	530	536	---	1,95±0,65	0,64±0,09
ShBL7E -NBD	8.5	553	---	536	552	---	0,62±0,025	<0,05

A pH 7.0 ni el péptido ShB ni el ShBL7E se unen a vesículas de PC. Sin embargo, ambos péptidos se unen con gran eficiencia y de forma saturable a vesículas de PA y, en menor medida, de PG. Los valores del K_p^* que se observan en estas condiciones experimentales para la unión del péptido ShB a vesículas de PA y PG ($\sim 8 \times 10^5$ y $\sim 0,3 \times 10^5 M^{-1}$, respectivamente) son superiores o comparables a los encontrados para la unión a vesículas fosfolipídicas zwitteriónicas de i) péptidos similares a segmentos transmembrana de proteínas, ii) diversos péptidos señal, iii) péptidos que forman poros en la membrana. Los valores de K_p^* que se obtienen para el péptido ShBL7E y vesículas de PA y PG son siempre mucho más bajos que los correspondientes para el péptido ShB en idénticas condiciones experimentales.

La posición de los máximos de emisión de fluorescencia que presentan los péptidos derivatizados con NBD cuando se unen a vesículas lipídicas también proporcionan información sobre la localización en las vesículas del extremo C-terminal de los péptidos, al cual se encuentra unido el NBD, que como se ha dicho es sensible al entorno hidrofóbico. Los péptidos ShB-21C-NBD y ShBL7E-21C-NBD en solución acuosa presentan máximos de emisión a 554-555 nm, que reflejan el ambiente hidrofóbico en el que se encuentra el NBD (Rajaratnam y cols., 1989). Frente a vesículas de PC presentan máximos de emisión similares (ver **Tabla I**). Sin embargo, la unión de los péptidos a vesículas de PA o PG supone un desplazamiento hacia el azul en el máximo de emisión de fluorescencia que indica que se ha producido una relocalización del NBD a un ambiente más hidrofóbico. La magnitud del cambio observado para ambos péptidos (531-533 nm y 531-534 nm frente a vesículas de PA y PG, respectivamente) sugiere que la penetración del extremo C-terminal del péptido en el ambiente hidrofóbico de la bicapa no es profunda si tenemos en cuenta datos

publicados para polipéptidos formadores de poros, donde se alcanzan máximos de emisión de 518-526 nm (Rapaport y Shai, 1992; Gazit y Shai, 1993). Más bien parece que el NBD se localiza en la superficie de la membrana o muy cerca de ella (Chattopadhyay y London, 1987; Rajarathnam y cols., 1989; Pouny y cols., 1992).

La interacción de los péptidos ShB y ShBL7E con vesículas aniónicas de PA también se ha estudiado a partir de las bandas del espectro de infrarrojo centradas a 1180 y 980 cm^{-1} , que se asignan a diferentes vibraciones de tensión de las formas monoaniónica y dianiónica, respectivamente, del grupo fosforilo del PA (Sánchez-Ruiz y Martínez-Carrión, 1986; Bhushan y McNamee, 1993). Se ha seguido la dependencia del pH de estas bandas en vesículas de PA solo, lo que ha permitido calcular un $pK_a \sim 8,0$ correspondiente a la desprotonación del grupo fosforilo monoaniónico para dar la forma dianiónica (ver **Fig. 14**).

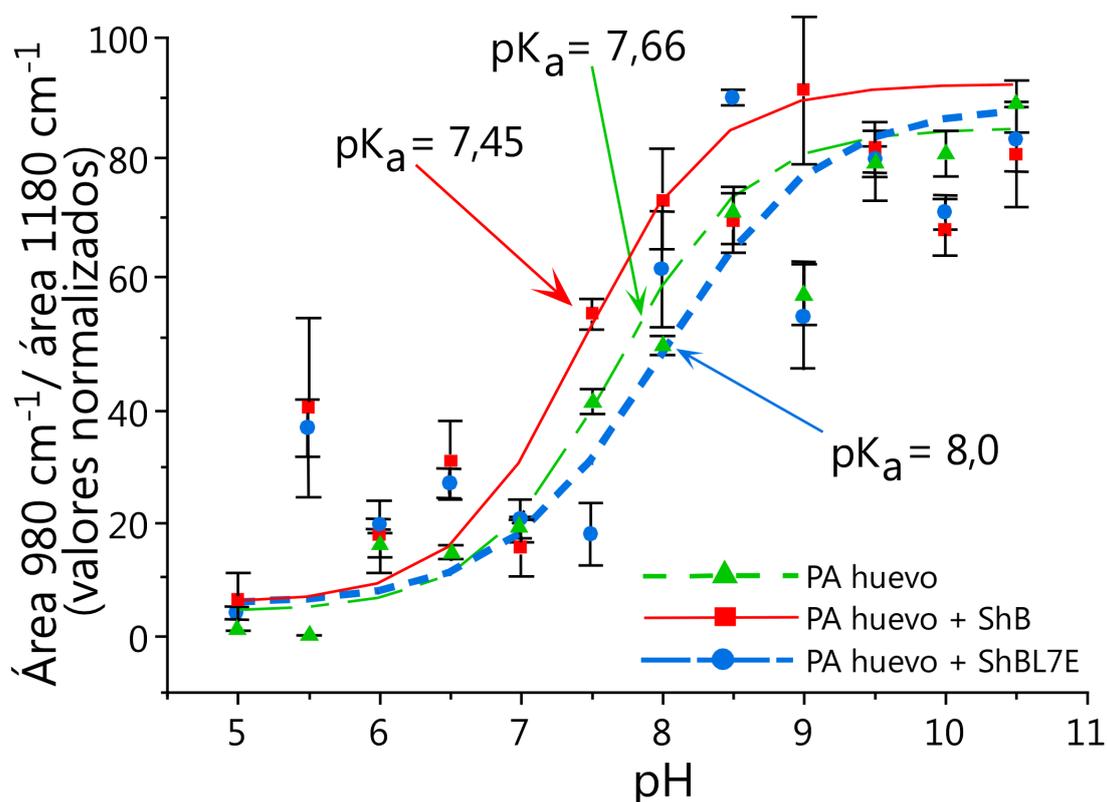


Fig. 14. Curva de valoración del grupo fosforilo monoaniónico del ácido fosfatídico de huevo (PA) y efecto de la presencia de los péptidos ShB y ShBL7E. Las concentraciones de los péptidos y ácido fosfatídico usadas en estos experimentos fueron 14 y 58 mM, respectivamente. Las muestras se encuentran en tampones de acetato sódico 10 mM, MOPS 10 mM, CAPS 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM y NaN_3 0,01% a los distintos pH. $n=3$.

Estas mismas bandas se han utilizado para estimar el pK_a para la desprotonación del grupo fosforilo en presencia de los péptidos. En las muestras péptido ShB/vesículas PA el pK_a cambia a $\sim 7,4$ para la razón péptido/lípido usada en estos experimentos. Esto

nos indica que el péptido ShB estabiliza la forma dianiónica del PA, y por consiguiente que el grupo fosforilo del fosfolípido está implicado en la unión al péptido ShB. El cambio en el pK_a observado en presencia del péptido ShBL7E es pequeño ($pK_a \sim 7,7$), como cabría esperar si tenemos en cuenta el *coeficiente de partición superficial* estimado para la unión del péptido ShBL7E a vesículas de PA, que es mucho menor que el correspondiente para el péptido ShB.

7.3. Estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

7.3.1. Inserción del péptido ShB en bicapas lipídicas.

Para estudiar la implicación del dominio hidrofóbico de las bicapas fosfolipídicas en su interacción con los péptidos se ha empleado la calorimetría diferencial de barrido y se han utilizado distintos dipalmitoil fosfolípidos sintéticos con transiciones de fase a temperaturas de 23.5 °C, 23.3 °C y 49.6 °C, que corresponden al DMPC, DMPG y DMPA, respectivamente. La inserción de un péptido en una bicapa lipídica y, por consiguiente, su interacción con las cadenas acílicas de los fosfolípidos, impide que parte de estas moléculas experimenten la característica transición de fase de un fosfolípido puro y hace que disminuya la entalpía asociada a la transición de fase de una manera dependiente de la concentración de péptido (Papahadjopoulos y cols., 1975). Los péptidos ShB y ShBL7E no causan efecto alguno ni sobre la temperatura de transición ni sobre la entalpía de vesículas de DMPC (datos no presentados). El péptido ShB si provoca una disminución de la entalpía de transición de fase de forma dependiente de concentración, en vesículas fosfolipídicas aniónicas (ver **Fig. 15, A y B**), que es más pronunciada en las vesículas de DMPG que en las de DMPA, sin modificar la temperatura de transición de fase. A partir de la representación de los cambios en la entalpía de transición de fase frente a la relación molar péptido/fosfolípido (ver **Fig. 15 C**) se predice que cada molécula de péptido ShB impide que un promedio de 3 o 4 moléculas de fosfolípido aniónico experimenten la transición de fase. Los efectos del péptido mutante ShBL7E sobre las entalpías de transición de fase del DMPA o el DMPG son despreciables en comparación con los que ejerce el péptido ShB (ver **Fig. 15, A y B**).

Las vesículas de DMPG se han usado también para estudiar la dependencia del pH de la inserción del péptido ShB en la bicapa fosfolipídica. Para este estudio se ha elegido el DMPG por que carece de grupos químicos que puedan ser titulados en el rango de pH que nos interesa y que podrían interferir con el fenómeno de inserción del

péptido. En la **Fig. 16** se muestra que la capacidad del péptido ShB de insertarse en el dominio hidrofóbico de la bicapa aniónica es claramente dependiente de pH. La disminución máxima de la entalpía de transición de fase del DMPG en presencia del péptido ShB ocurre a pH 6.0, mientras que a $\text{pH} \geq 8.5$ el péptido pierde la capacidad de insertarse. A pesar de la falta de capacidad de inserción en estas condiciones, el péptido se une eficazmente a las vesículas aniónicas a este pH, aunque con mucha menor afinidad (ver **Tabla I**). El efecto del péptido mutante ShBL7E sobre la entalpía de transición de fase del DMPG a cualquier pH explorado es despreciable (ver **Fig. 16**).

7.3.2. Estudios de separación de fases.

Utilizando mezclas de DMPA y DMPC, que a pH 6.0 forman una mezcla ideal, se ha estudiado la capacidad del péptido ShB de inducir la separación de fases lipídicas en estas vesículas (ver **Fig. 17**). Dependiendo de los dos fosfolípidos utilizados en la mezcla se observa una amplia endoterma que tiene una temperatura de transición de fase intermedia a las que corresponden a los fosfolípidos por separado. La adición del péptido ShB sobre estas mezclas, a una razón molar péptido/fosfolípido de 0.1, reduce la entalpía hasta un ~70 % del valor inicial pero no promueve la aparición de endotermas características de los componentes de la mezcla como cabría esperar si se produjera la segregación de dominios lipídicos.

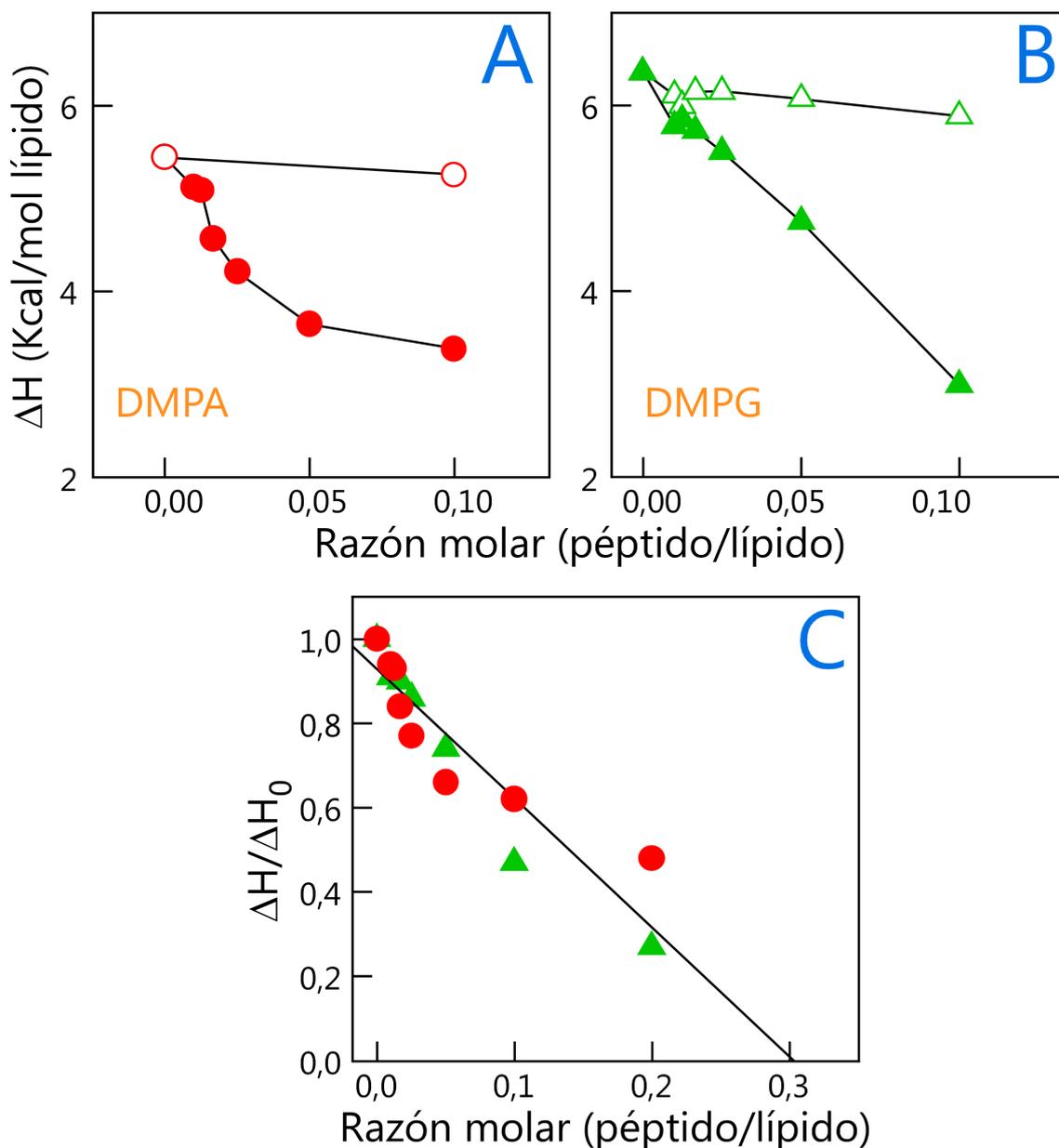


Fig. 15. Cambios en la entalpía de transición de fase gel a líquido cristalino de vesículas multilamelares grandes de DMPA (A, \circ , \bullet) y DMPG (B, \triangle , \blacktriangle) en presencia de cantidades crecientes de péptido ShB (\bullet , \blacktriangle) y ShBL7E (\circ , \triangle), calculadas a partir de los termogramas de calorimetría diferencial de barrido de las mezclas fosfolípido/péptido en tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM; pH 7,0. Las barras de la desviación estándar, para $n=3$, son inferiores al tamaño de los símbolos empleados en el gráfico. En ausencia de péptidos, las entalpías de transición de fase estimadas para vesículas de DMPA o DMPG puros fueron 5,4 y 6,5, respectivamente. En C se presenta la razón $\Delta H/\Delta H_0$ (entalpías de transición del DMPA (\bullet) o del DMPG (\blacktriangle) determinadas en presencia (ΔH) y en ausencia (ΔH_0) del péptido ShB) versus razón molar péptido ShB/fosfolípido. A pesar del incremento en la dispersión que supone la utilización de datos de muestras de DMPA y DMPG juntos, si extrapolamos la recta de ajuste podemos estimar que para una razón molar péptido/fosfolípido de $\sim 0,3$ se anula totalmente la transición cooperativa del fosfolípido.

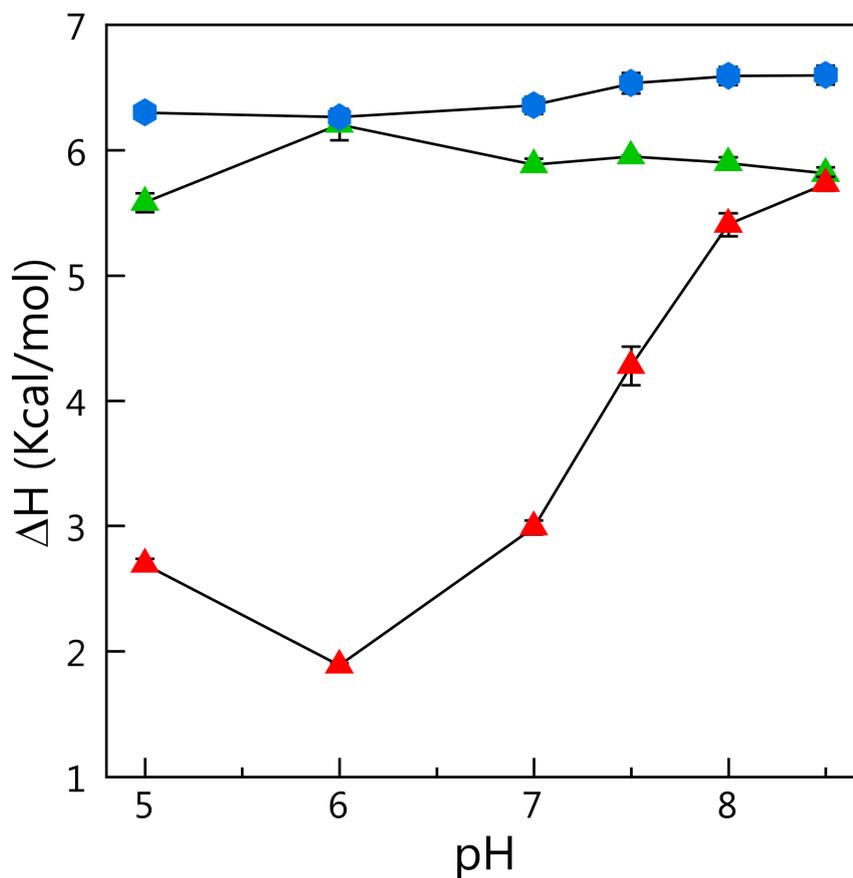


Fig. 16. Dependencia del pH de la entalpía de transición de fase gel a líquido cristalino de vesículas multilamelares grandes de DMPG, calculada a partir de los termogramas de calorimetría diferencial de barrido. Los diferentes símbolos corresponden a vesículas de DMPG solo (●) y en presencia de los péptidos ShB (▲) y ShBL7E (▲) para una relación molar fosfolípido/péptido de 0,1 en ambos casos. Los tampones utilizados en cada caso a los pH indicados en cada caso fueron: pH 5,0: 25 mM citrato, 50 mM fosfato, 20 mM NaCl, 130 mM KCl; pH 6,0: Mes 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 130 mM; pH 7,0: fosfato 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 130 mM; pH 7,5: fosfato 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 130 mM; pH 8,0: Epps 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 130 mM; pH 8,5: Epps 10 mM, NaCl 20 mM, KCl 130 mM.

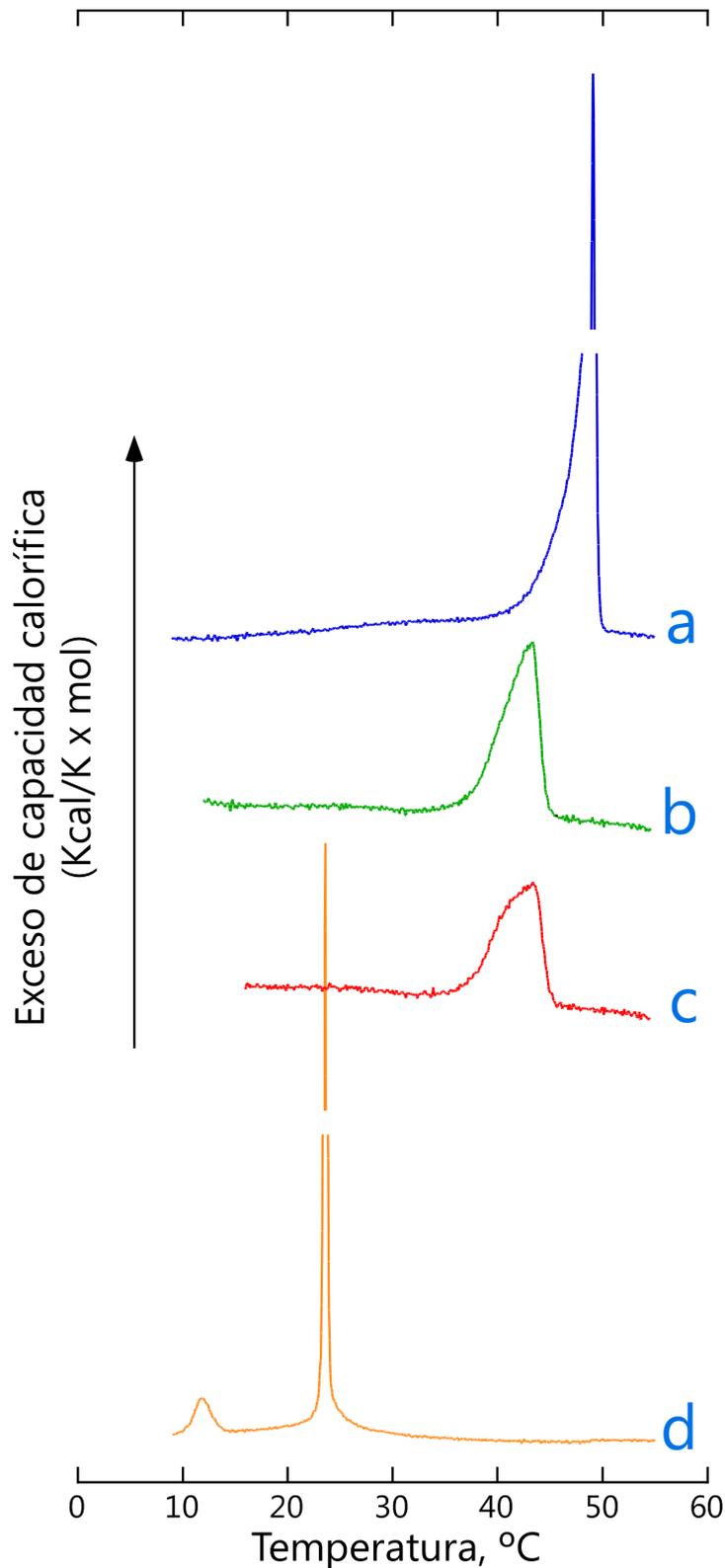


Fig. 17. Efecto de la adición del péptido ShB sobre una mezcla ideal de DMPA y DMPC a pH 6,0 Para los experimentos presentados en la figura se prepararon vesículas multilamelares grandes partiendo de mezclas DMPA:DMPC (60:40, molar) en tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM; pH 6,0 Los termogramas que se presentan fueron tomados a partir de muestras de vesículas lipídicas a concentración 2 mM de fosfolípidos, en ausencia (scan **b**) y en presencia (scan **c**) de péptido ShB para una razón molar péptido/fosfolípido de 0,1 Las trazas **a** y **d** representan los termogramas correspondientes a vesículas de DMPA y DMPC, respectivamente.

7.4. Estudios de agregación de péptidos.

7.4.1. Transferencia de energía por resonancia.

Como ya se ha puesto de manifiesto (ver apartado **1.2.**), los derivados fluorescentes (NBD-derivados) de los péptidos ShB y ShBL7E se unen eficazmente y de forma saturable a vesículas fosfolipídicas aniónicas. Por otra parte, la alquilación del grupo sulfhidrilo de la Cys del péptido ShB-21C da lugar a derivados en los que no se altera de forma significativa ni sus propiedades conformacionales ni su capacidad de restaurar la inactivación rápida en los canales de K⁺ mutantes ShB Δ 4-46 (ver apartados **2.2.** y **2.3.**). Teniendo esto presente, se han realizado estudios de transferencia de energía por resonancia utilizando diferentes derivados peptídicos marcados con NBD como donadores de energía y con Rho como aceptores (ver **Tabla II**), para examinar la posible agregación de los péptidos en presencia de vesículas de PA. Para optimizar la fracción de péptido unido a las vesículas lipídicas se utiliza una relación molar péptido/fosfolípido que corresponde a una región en las isotermas de unión entre las zonas "exponencial" y de plato (ver apartado **1.2.**). En la **Fig. 18** se presentan los espectros de emisión resultantes de añadir los péptidos ShB-21C-Rho (panel **A**) y ShBL7E-21C-Rho (panel **B**) a disoluciones con ShB-21C-NBD (panel **A**) y ShBL7E-21C-NBD (panel **B**), respectivamente, que habían sido previamente incubadas en presencia de vesículas unilamelares pequeñas de PA. Se puede observar un apagamiento de la fluorescencia de emisión del donador y un aumento en la emisión del aceptor, lo que pone de manifiesto que ocurre la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Los experimentos control realizados en ausencia de vesículas de PA revelan la práctica inexistencia de fluorescencia de emisión de los péptidos derivatizados con NBD (datos no presentados), ya que tienen un bajo rendimiento cuántico en el medio acuoso (Peled y Shai, 1993). Para determinar la eficacia del proceso de transferencia de energía observado se calcula previamente la cantidad de aceptor unido a las vesículas lipídicas (en este caso el péptido derivatizado con Rho) a partir de las isotermas de unión de los péptidos marcados con NBD (ver apartado **1.2.**). En el panel **C** de la **Fig. 18** se representa el porcentaje de energía de transferencia para los pares donador/aceptor, calculado a partir de los datos experimentales, frente a la razón molar péptido-Rho unido/fosfolípido. También se incluye en la **Fig. 18 C** la curva que representa las eficacias de transferencia esperadas para una distribución aleatoria de los péptidos fluorescentes monoméricos en la superficie de los liposomas,

asumiendo un valor de R_0 de 51 Å (Fung y Stryer, 1978). El valor de R_0 , que se define como la distancia a la que tiene lugar un 50 % del proceso de transferencia de energía, para el par donador/aceptor NBD/Rho es 51 Å (Peled y Shai, 1993). Puede observarse que las eficacias de transferencia calculadas experimentalmente entre los péptidos derivatizados con NBD y Rho son similares a las esperadas para una distribución al azar de los péptidos como monómeros para todas las relaciones péptido aceptor unido/fosfolípido estudiadas. La oligomerización de otros péptidos unidos a membrana, determinada por esta misma técnica, da lugar a incrementos en la eficacia de transferencia de ~6-7 veces sobre la esperada para una distribución aleatoria del péptido monomérico (Peled y Shai, 1993). Por consiguiente, se puede concluir que el péptido ShB se distribuye aleatoriamente como monómero, en las membranas de PA. Por otra parte, parece que la eficacia de transferencia para los péptidos derivados de ShBL7E, marcados con NBD y Rho, es ligeramente superior a la esperada para una distribución al azar de los mismos sobre la membrana de las vesículas de PA. Ello sugiere que el péptido mutante ShBL7E tiene una pequeña tendencia a oligomerizar en estas condiciones, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que la relación de absorbancias 1623/1643 cm^{-1} para los espectros de infrarrojo de este péptido en presencia de vesículas de PG (ver **Fig. 9 C**) es dependiente de concentración.

Tabla II: Secuencia de aminoácidos de derivados del péptido ShB (con el extremo C-terminal amidado) y sus análogos marcados con una sonda fluorescente.

#	nombre del péptido	grado de marcaje	secuencia del péptido																				
			1	5	10	15	20																
1	ShB		M	A	A	V	A	G	L	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	
2	ShBL7E		M	A	A	V	A	G	E	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	
3	ShB-21C		M	A	A	V	A	G	L	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	C
4	ShBL7E-21C		M	A	A	V	A	G	E	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	C
5	ShB-21C-NBD	89 %	M	A	A	V	A	G	L	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	C-NBD
6	ShBL7E-21C-NBD	88 %	M	A	A	V	A	G	E	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	C-NBD
7	ShB-21C-Rho	76 %	M	A	A	V	A	G	L	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	C-Rho
8	ShBL7E-21C-Rho	73 %	M	A	A	V	A	G	E	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	C-Rho
9	ShB-21C-Pyr	75 %	M	A	A	V	A	G	L	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	C-Pyr
10	ShBL7E-21C-Pyr	94 %	M	A	A	V	A	G	E	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q	C-Pyr

7.4.2. Formación de excímeros de pireno.

La posibilidad de agregación de los péptidos ShB y ShBL7E en presencia de vesículas aniónicas de PA se ha estudiado también examinando los espectros de emisión de fluorescencia de los péptidos derivatizados con pireno (Pyr) (ver **Tabla II**)

para determinar la razón monómero/excímero (ver **Fig. 19**). Al igual que ocurría con los péptidos derivatizados con NBD, estos péptidos-Pyr tienen un bajo rendimiento cuántico en solución acuosa, de modo que en ausencia de vesículas de PA apenas hay emisión de fluorescencia. Esto indica que la fluorescencia observada en presencia de dichas vesículas resulta mayoritariamente de la población de los péptidos-Pyr asociada a los lípidos. Si tuviera lugar una agregación de los péptidos-Pyr que se han unido a las vesículas aniónicas ocurriría una dimerización del pireno (formación de excímeros) que se traduciría en la aparición de un componente en el espectro de emisión de fluorescencia con un máximo a 480 nm. Este máximo daría cuenta de una razón de emisión de fluorescencia monómero/excímero de 0.5 o superior (Morris y cols., 1988). En nuestro caso, se puede observar que la adición tanto del péptido ShB-21C-Pyr como del péptido ShBL7E-21C-Pyr a vesículas de PA, para razones molares péptido/fosfolípido iguales a las empleadas en los experimentos de transferencia de energía de resonancia, no da lugar a la formación de excímeros (ver **Fig. 19**). De hecho, las razones de emisión de fluorescencia monómero/excímero para ambos péptidos son iguales o inferiores a 0,05, lo que está de acuerdo con la predominancia casi absoluta de monómeros de pireno.

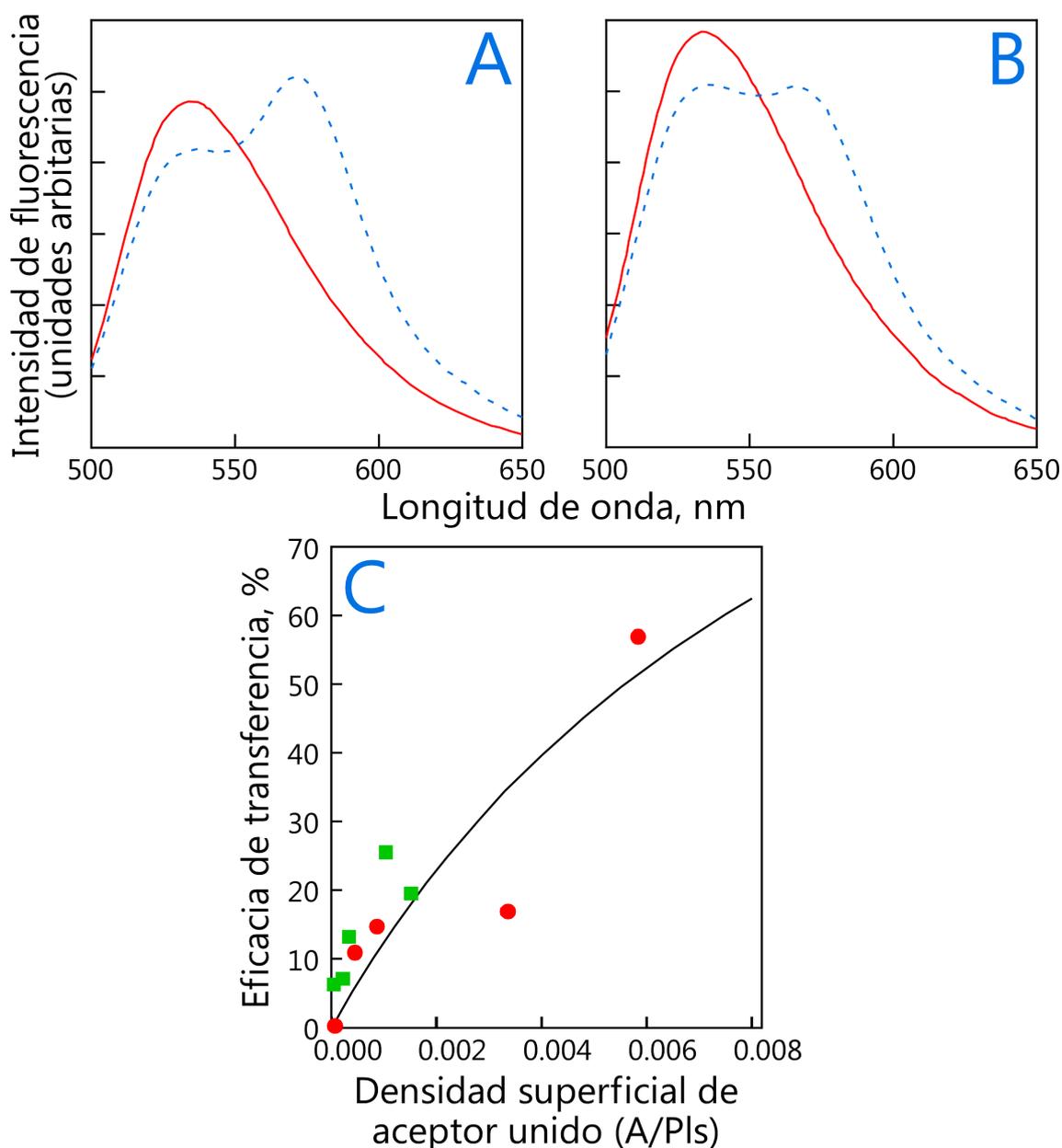


Fig. 18. Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia entre los péptidos derivatizados con NBD y Rho en presencia de vesículas unilamelares pequeñas de PA. Ejemplos de transferencia de energía entre los péptidos ShB-21C-NBD y ShB-21C-Rho (panel **A**) y los péptidos ShBL7E-21C-NBD y ShBL7E-21C-Rho (panel **B**). La concentración de PA fue de 150 μ M, manteniendo una concentración molar péptido/fosfolípido de 1:500. La línea continua, en ambos paneles, corresponde con la emisión de fluorescencia del péptido marcado con NBD solo que actúa como donador, mientras que la línea discontinúa corresponde a la fluorescencia de emisión del par donador/aceptor. En el panel **C** se representa la eficacia de energía de transferencia calculada experimentalmente para los pares de péptidos ShB-21C-NBD y ShB-21C-Rho (círculos) y los péptidos ShBL7E-21C-NBD y ShBL7E-21C-Rho (cuadrados), frente a la razón molar péptido aceptor unido/fosfolípido. La línea continua en este panel representa la eficacia de energía de transferencia esperada para una distribución al azar de monómeros en la superficie de péptido fluorescente, asumiendo un R_0 de 50 Å (Fung y Stryer, 1978).

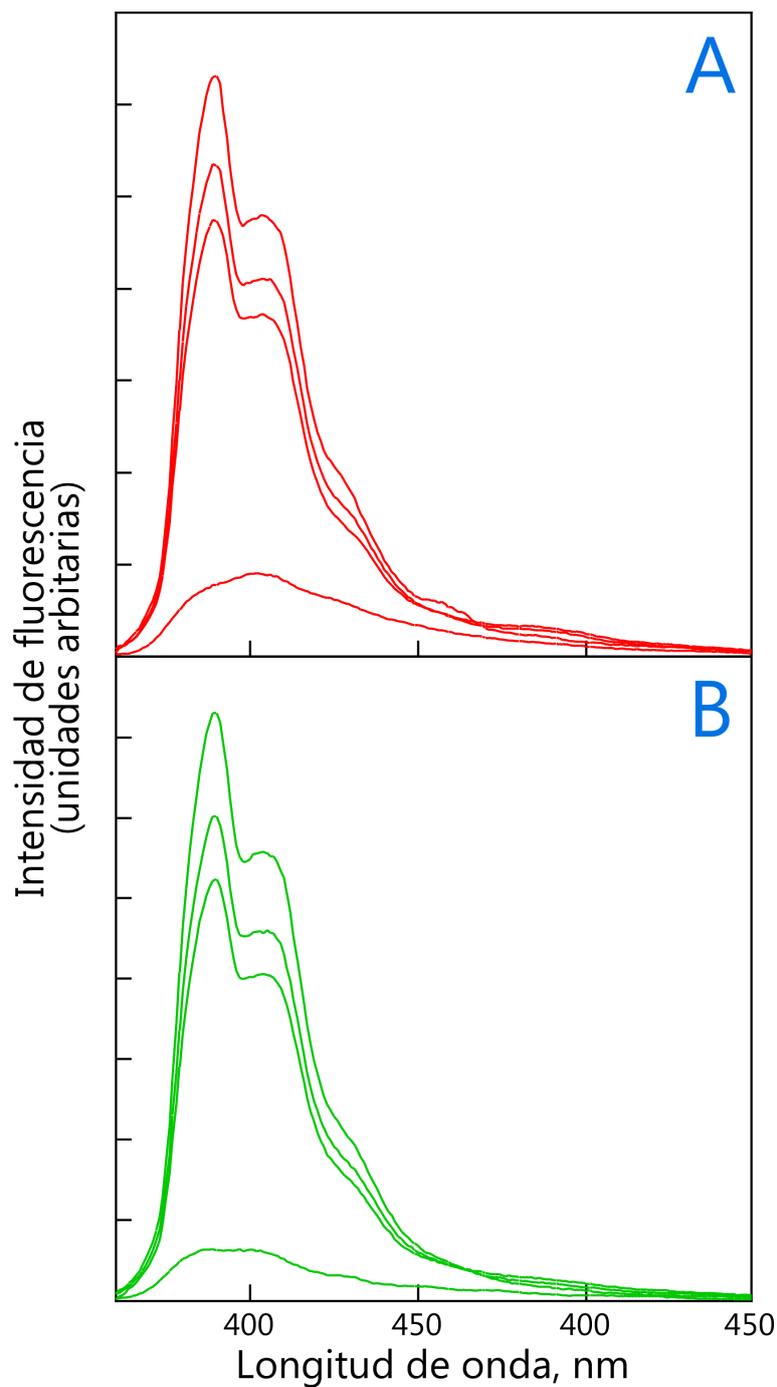


Fig. 19. Espectros de fluorescencia de emisión de disoluciones 3 μM del péptido ShB-21C-Pyr (panel **A**) y ShBL7E-21C-Pyr (panel **B**) en ausencia (traza inferior de cada panel) o en presencia de cantidades crecientes de vesículas unilamelares pequeñas de PA (15, 30 y 150 μM , para cada una de las tres trazas en ambos paneles). La longitud de onda de excitación fue 345 nm.

7.5. Estudios de criofractura de la inserción del péptido ShB en membranas fosfolipídicas.

Utilizando la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se ha puesto de manifiesto (ver apartado **1.3.1.**) que el péptido ShB se inserta en el dominio hidrofóbico de bicapas fosfolipídicas, lo que no le ocurre al péptido mutante ShBL7E. Sin embargo, estos estudios no nos informan de la profundidad con la que se inserta en la bicapa dicho péptido. Para intentar responder a esta cuestión se realizaron estudios de microscopía electrónica sobre réplicas de crio-fractura. En estos experimentos las muestras fueron preparadas partiendo de vesículas unilamelares previamente formadas a las que se añadió el péptido, manteniendo una relación molar péptido/fosfolípido que permitiera que la fracción de péptido unido a la cara externa de las vesículas lipídicas fuera lo más grande posible.

El análisis de las réplicas de crio-fractura obtenido tanto para las vesículas de PC como de PA de huevo, en presencia o ausencia de los péptidos ShB o ShBL7E, mostró la presencia de partículas intramembrana globulares (IMP) únicamente en las muestras de péptido ShB/vesículas de PA (ver **Fig. 20**). El número de partículas intramembrana encontradas en las caras exoplásmica y protoplásmica de las vesículas de PA fue aproximadamente la misma (17 ± 2 y 20 ± 2 IMP/ $10 \mu\text{m}^2$, respectivamente). El hecho de encontrar una densidad similar de IMPs en ambas hemicapas de las réplicas de criofractura sugiere que el péptido ShB se inserta profundamente en la membrana de las vesículas de PA, implicando a ambas hemicapas cada vez que se produce una inserción. El diámetro promedio de las partículas intramembrana fue de $5,4 \pm 1,6$ nm (diámetro medio \pm desviación estándar; $n=85$). Por otra parte, la distribución normal de tamaños observada (ver **Fig. 20 C**) sugiere la formación de una única estructura como consecuencia de la inserción del péptido en la bicapa de PA. Las muestras que contienen únicamente fosfolípidos nunca presentan IMPs, al igual que las muestras preparadas tanto con ShB como con ShBL7E en presencia de vesículas de PC, o ShBL7E en presencia de vesículas de PA. Estos datos están en concordancia con los aportados por la calorimetría diferencial de barrido (ver apartado **1.3.1.**).

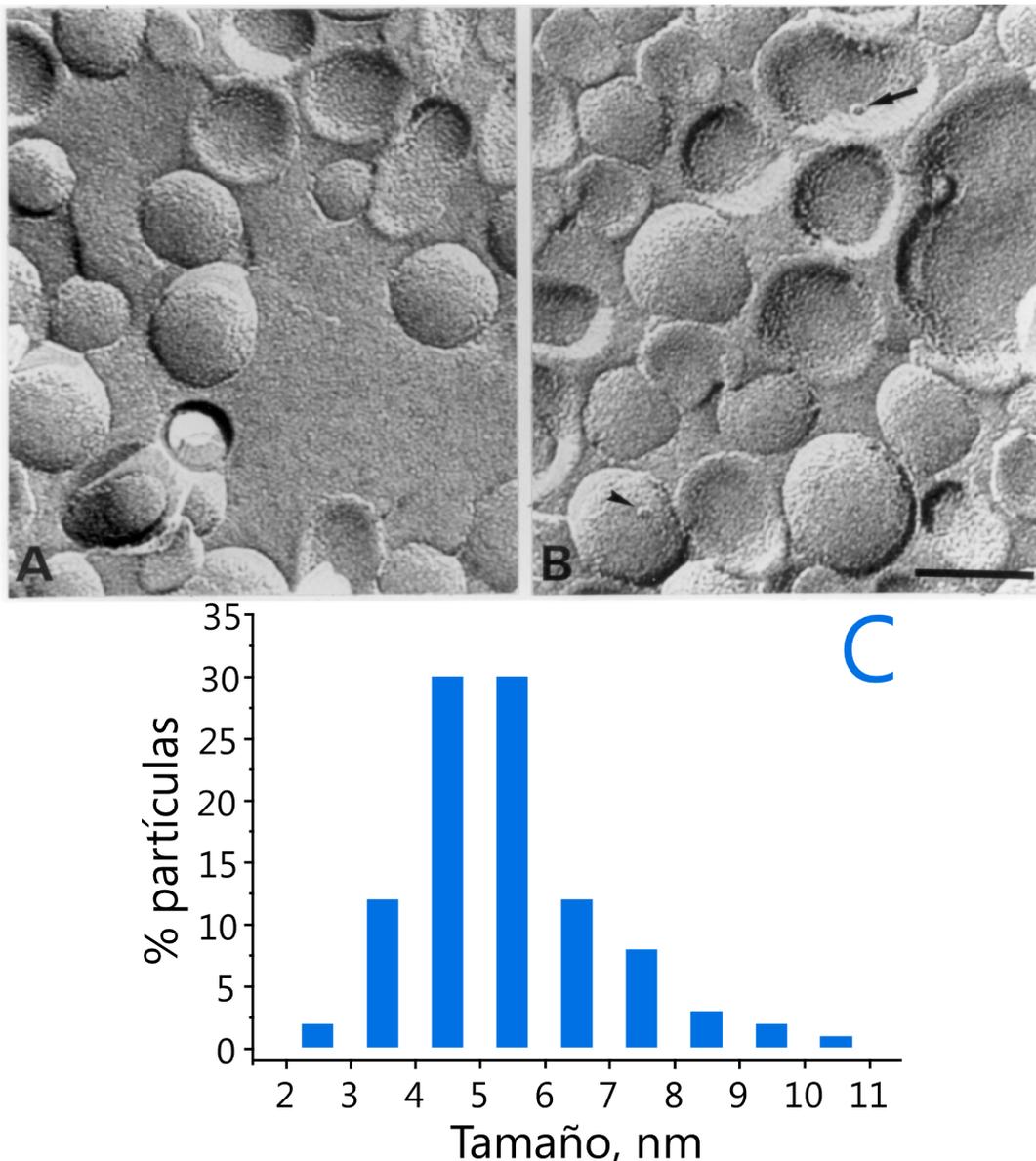


Fig. 20. Micrografías electrónicas tomadas a la misma escala (barra de escala, 50 nm) de réplicas de criofractura realizadas a partir de vesículas unilamelares pequeñas de **PA** (panel **A**) y de las mismas vesículas en presencia del péptido **ShB**, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos (panel **B**). Las flechas incluidas en el panel B indican la presencia de partículas intramembrana (IMPs) tanto en la hemicapa interna como en la externa. En el panel **C** se presenta la distribución de IMPs observadas en estas muestras (n=85). El número de partículas se estimó utilizando rejillas calibradas sobre las que se superimponía la placa fotográfica de la réplica de la criofractura. El tamaño de las partículas intramembrana se midió utilizando un portaobjetos calibrado. El diámetro se midió como la longitud de la base de la sombra triangular proyectada por la partícula, perpendicular a la dirección de la sombra. Dependiendo de la curvatura de la superficie de fractura el sombreado con platino puede introducir cambios en el tamaño aparente de las partículas, por esta razón fueron seleccionadas únicamente regiones planas de la membrana para realizar los análisis cuantitativos.

7.6. Hidrólisis con tripsina del péptido ShB insertado en vesículas de ácido fosfatídico (PA).

El péptido ShB contiene cuatro puntos potenciales de hidrólisis por tripsina cerca de su extremo C-terminal (R14, R17, K18 y K19). La hidrólisis de dicho péptido en

solución acuosa elimina los residuos de 15 a 20, dando lugar a un péptido ShB1-14 incapaz de adoptar la característica estructura β cuando se pone en presencia de vesículas aniónicas (ver sección **1.1**). Ahora se utiliza la hidrólisis por tripsina como un herramienta que permita explorar cuáles de sitios potenciales de hidrólisis permanecen accesibles a la proteasa cuando el péptido ShB se inserta en vesículas de PA. Nuevamente, las muestras usadas en estos experimentos se han preparado añadiendo el péptido ShB a vesículas unilamelares pequeñas de PA, de forma que la razón molar péptido/fosfolípido fuera lo suficientemente baja como para optimizar la fracción de péptido unido a las vesículas. Después del tratamiento con tripsina, esta se decanta y el sobrenadante se ultracentrífuga para eliminar el péptido que pueda permanecer libre en la disolución. En estos experimentos se eligen unas condiciones de pH neutro porque al pH 8, al cual presenta una actividad óptima la tripsina, no ocurre la inserción del péptido ShB en las vesículas de PA (ver **Fig. 16**).

En la **Fig. 21** se muestra el espectro de infrarrojo del péptido ShB insertado en vesículas de PA, así como las alteraciones que experimenta como consecuencia de exponer la muestra a la tripsina a pH neutro. La principal alteración es la reducción del característico componente de estructura β centrado a 1623 cm^{-1} . Además, la gran estabilidad térmica que en condiciones normales presenta el péptido insertado en las vesículas, así como su capacidad de recuperar casi totalmente dicha conformación después del proceso de calentamiento, se pierden en gran medida como consecuencia del tratamiento con tripsina (ver **Fig. 21**, trazas medias y superiores). Estos resultados permiten pensar que el péptido insertado expone al medio acuoso una porción de su extremo C-terminal considerable, con lo que alguno o todos los cuatro sitios potenciales de hidrólisis por tripsina deben permanecer accesibles a la acción de la proteasa, de donde se sigue que es la porción N-terminal del péptido la que se inserta más profundamente en el dominio hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica.

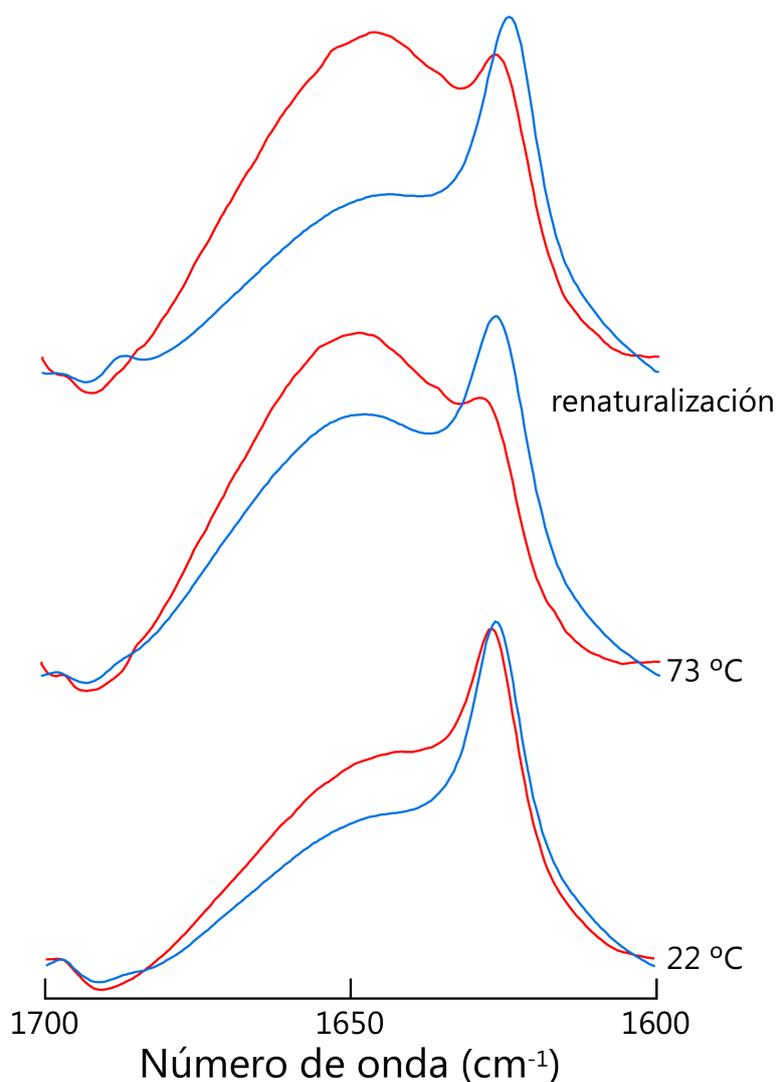


Fig. 21. Efecto de la hidrólisis por tripsina sobre la banda amida I' del espectro de infrarrojo del péptido **ShB** insertado en vesículas unilamelares pequeñas de **PA**. Se presenta los espectros "control", en trazo azul, que corresponden a muestras no hidrolizadas y los espectros de las muestras tratadas con tripsina (trazo rojo) tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las trazas inferiores representan espectros tomados a 20 °C, mientras que las trazas medias y superiores corresponden a los espectros de las muestras calentadas hasta 70 °C en la celda del espectrómetro de FTIR y renaturalizadas a 20 °C, respectivamente. En todos los casos se ha restado al espectro de la muestra el espectro del tampón correspondiente.

Los intentos iniciales para identificar el fragmento mayoritario resultante de la hidrólisis (presumiblemente el péptido ShB1-14) utilizando técnicas convencionales de HPLC en fase reversa o análisis de aminoácidos fueron infructuosos debido a la gran cantidad de lípido presente en las muestras que interfería en los análisis cromatográficos. Por esta razón, se recurrió a la espectrometría de masas para tratar de identificar los productos de hidrólisis en base a su masa molecular. En la muestra control de péptido ShB/vesículas de PA en ausencia de tripsina se encuentra un único componente con una masa molecular de 2226, que corresponde al péptido ShB entero (masa molecular esperada de 2227,6). Adicionalmente, otras muestras control con

vesículas fosfolipídicas solamente no presentan ningún componente en el rango de masas moleculares de 1000-2500. Por el contrario, las muestras de péptido ShB/vesículas que habían sido incubadas con tripsina (ver sección **2.9.** en Materiales y Métodos) permiten encontrar dos componentes con similar importancia relativa, de masas moleculares 1420 y 2226, respectivamente. El componente de 2226 se corresponde con el péptido ShB entero, mientras que el de 1420 debe ser el péptido ShB1-14 (masa molecular esperada de 1421,7). Dichos resultados indican que el residuo R14 (y por ende, también los situados desde esta posición hasta el extremo C-terminal) en la secuencia del péptido permanece accesible a la tripsina después de la inserción del péptido en la matriz lipídica.

7.7. Síntesis de un análogo fotoactivable del péptido inactivante del canal de K⁺ Shaker B.

7.7.1. Síntesis de los péptidos derivatizados con ASIB.

La reacción entre el ASIB y los péptidos ShB-21C y ShBL7E-21C, que contienen cisteína en el extremo C-terminal, tiene lugar en dos etapas, la reducción con DTT del grupo sulfhidrilo de la Cys y su posterior alquilación empleando un exceso de ASIB, a pH 8.5; lo que produce el correspondiente péptido derivatizado con ASIB (ver **Fig. 22A**). La separación de los diferentes péptidos derivatizados del exceso de sonda libre se lleva a cabo por una cromatografía de exclusión, se mide a continuación la cantidad de proteína recuperada y se liofiliza hasta su empleo posterior. La eficacia de marcaje con ASIB se establece determinando la relación molar carboximetilcisteína/péptido de las muestras por análisis de aminoácidos cuantitativo y en todos los casos se encontraba entre el 94-95 %.

En la **Fig. 22B** se presenta el espectro de absorbancia de los péptidos ShB-21C-ASIB y ShBL7E-21C-ASIB en un tampón acuoso. El máximo de absorbancia para ambos péptidos se encuentra a 272 y 310 nm, respectivamente, y es muy similar al que presenta el ASIB libre disuelto en DMSO. El coeficiente de extinción molar para ambos péptidos es aproximadamente de $9000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se calculan a partir del máximo de absorbancia que ambos péptidos presentan a 310 nm para evitar la interferencia de la absorbancia característica de la porción peptídica en el máximo a 272 nm. Los péptidos ShB y ShBL7E poseen un coeficiente de extinción molar calculado a partir del máximo de absorbancia a 280 nm de aproximadamente $1300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El espectro de infrarrojo de los péptidos marcados con ASIB presenta una banda a 2115 cm^{-1} característica de

las azidas aromáticas, que desaparece cuando son irradiados con luz ultravioleta (ver **Fig. 23**). Esto indica que el grupo azida no se altera como consecuencia del proceso de derivatización del péptido.

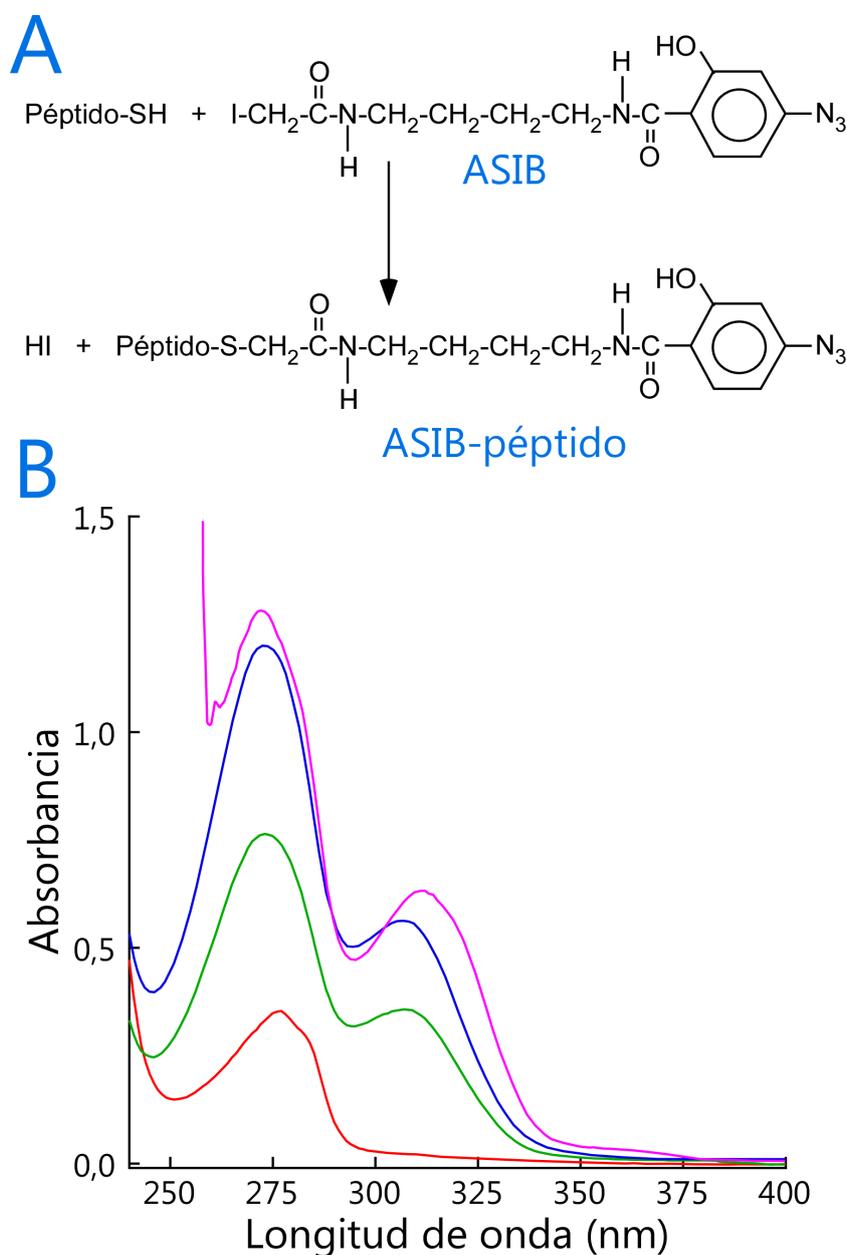


Fig. 22. El panel **A** presenta el esquema de reacción entre el 1-(*p*-azidosalicilamido)-4-(iodoacetamido)butano (ASIB) y un péptido que contenga cisteína para dar lugar a un péptido derivatizado con ASIB. El panel **B** presenta los espectros de absorbancia del ASIB (67 μM en DMSO) (—), del péptido ShB-21C-ASIB (38 μM en 0,05% ácido acético) (—) y del péptido ShBL7E-21C-ASIB (61 μM en 0,05% ácido acético) (—). Se incluye el espectro del péptido ShB (250 μM en 0,05% ácido acético) (—) para ilustrar la contribución del péptido al máximo de absorbancia a 272 nm.

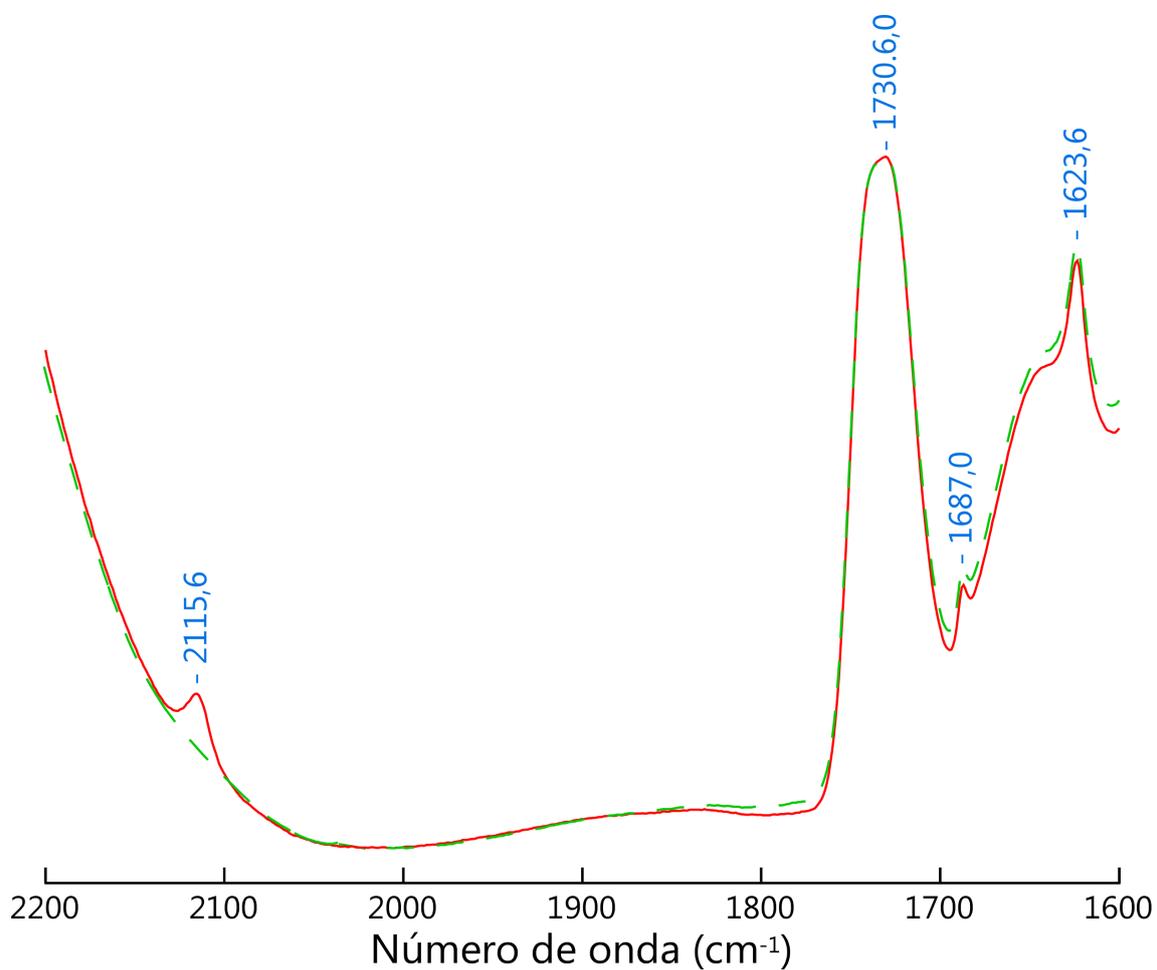


Fig. 23. Espectro de infrarrojo del péptido ShB-21-ASIB antes (—) y después (—) de ser irradiado con luz ultravioleta en tampón de D_2O de Hepes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4.

7.7.2. Estudios de inactivación del canal de potasio ShB Δ 4-46 por diferentes péptidos derivados del péptido inactivante ShB.

La capacidad de los péptidos derivatizados con ASIB de inducir la inactivación de los canales de K⁺ se ha evaluado estudiando los efectos de los péptidos en la recuperación de la inactivación rápida en un canal mutante derivado del *Shaker B*, conocido como ShB Δ 4-46, que no inactiva debido a una delección cerca del extremo N-terminal, que hace que la proteína carezca del dominio inactivante, que de forma constitutiva se encuentra presente en canal silvestre (Hoshi y cols., 1990; López-Barneo y cols., 1993). En la **Fig. 25** se presentan registros de corrientes macroscópicas provocadas en respuesta a pulsos despolarizantes en células CHO que expresan de forma transitoria los canales ShB Δ 4-46, los cuales carecen de inactivación rápida (ver **Fig. 25A**). La adición tanto del péptido ShB como del péptido ShB-21C-ASIB permite la recuperación de la inactivación rápida (tipo N) del canal de forma prácticamente indistinguible, con unas constantes de tiempo para la inactivación (τ) que varían entre 137 \pm 11 ms (media \pm desviación estándar, n=9) y 130 \pm 9 ms (n=10), respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto que el péptido derivatizado con ASIB se comporta como un análogo funcional del péptido ShB y que la presencia tanto del residuo de cisteína en posición 21 como la unión covalente a esta del ASIB no hacen que pierda su capacidad de inducir la inactivación rápida del canal. Por otra parte, el péptido mutante ShBL7E no inactivante, así como su correspondiente derivado marcado con ASIB, el péptido ShBL7E-21C-ASIB, no presentan ningún efecto ni i) en la recuperación de la inactivación rápida (ver **Fig. 25B**), ni ii) modifica la cinética de la inactivación lenta (tipo C) que presenta de forma natural el canal ShB Δ 4-46 (ver **Fig. 25C**) (López-Barneo y cols., 1993).

Algunas de las células que expresaban los canales ShB Δ 4-46 con niveles moderadamente bajos (con amplitudes del pico de corriente a -20 mV entre 0,8 y 1,2 nA) fueron utilizadas para estudiar la dependencia de voltaje de la velocidad de activación. En un rango de potenciales de membrana entre -20 y +40 mV ninguno de los péptidos utilizados en estos experimentos (ShB, ShB-21C-ASIB, ShBL7E, ShBL7E-21C-ASIB) alteraba la velocidad de activación que presentaba el canal en ausencia de los péptidos (ver **Fig. 24**).

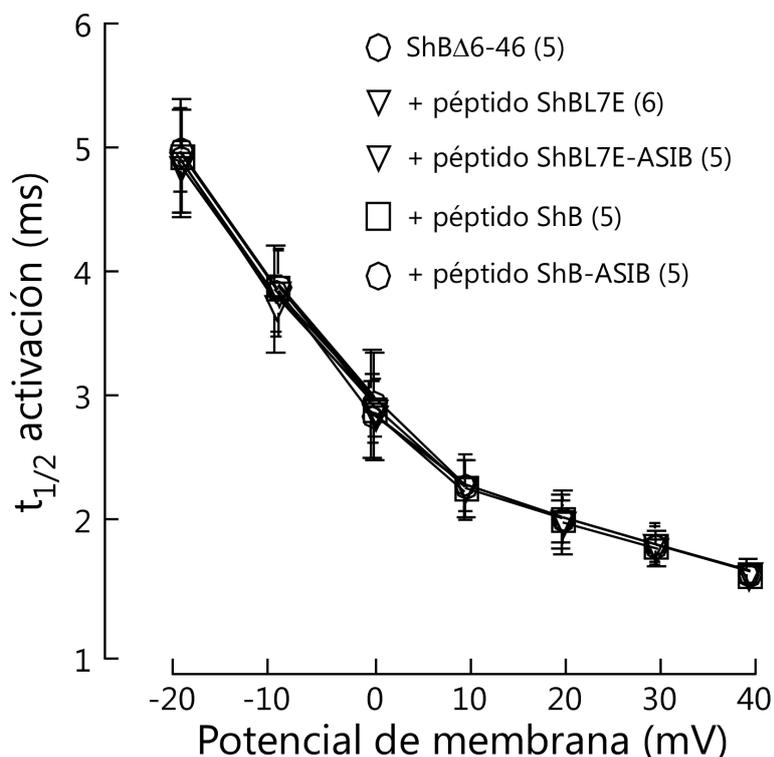


Fig. 24. Efecto de diferentes péptidos sobre el curso temporal de la activación de la corriente a través de canales ShBΔ4-46 expresados en células CHO, a diferentes potenciales de membrana entre - 20 y + 40 mV. Se mide el tiempo necesario para alcanzar $\frac{1}{2}$ de la amplitud máxima de la corriente a cada potencial. (n) número de células.

7.7.3. Propiedades estructurales del péptido inactivante derivatizado con ASIB.

Como puede observarse en la **Fig. 26** tanto el péptido ShB como el péptido ShB-21C-ASIB adoptan una conformación similar cuando se ponen en presencia de vesículas de fosfatidilglicerol, presentando, en ambos casos, un componente mayoritario a 1623 cm^{-1} en su banda amida I, y otro menor a 1687 cm^{-1} (**A, B**) característicos de la adopción de una estructura β . No obstante, la intensidad relativa del componente de 1623 cm^{-1} de los espectros de ambas muestras tomados durante un proceso de aumento escalonado de la temperatura (**C, D**) experimenta una mayor disminución en el péptido derivatizado con ASIB, lo que implica que la estructura β formada es menos estable.

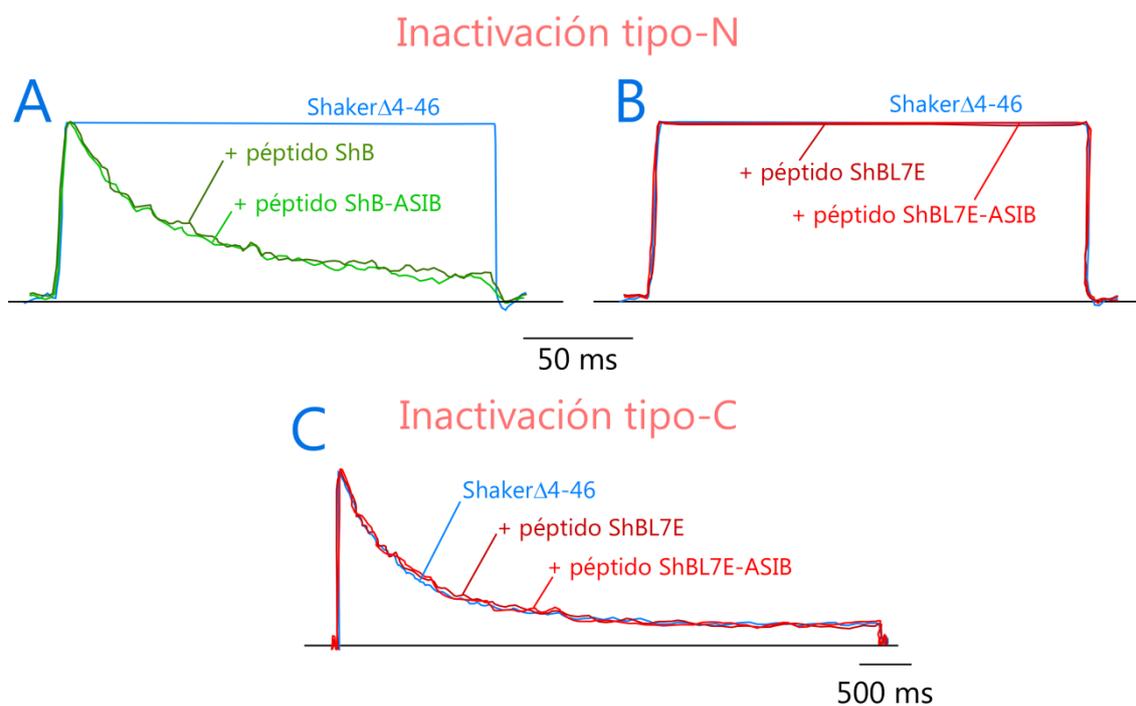


Fig. 25. Efectos de diferentes péptidos sobre las corrientes de potasio, a través de canales ShB Δ 4-46 expresados en células CHO, provocadas por pulsos despolarizantes. Los registros fueron adquiridos utilizando la técnica de "patch-clamp" en configuración de célula entera. Los péptidos fueron siempre disueltos en la solución de la pipeta de registro a una concentración de 500 μ M. En **(A)** se compara el efecto de los péptidos ShB y ShB-21C-ASIB en la corriente provocada por la aplicación de un pulso despolarizante que cambia el potencial inicial de -80 mV a +20 mV. La duración del pulso es de 200 ms. Ambos péptidos presentan un efecto inactivante similar. En **(B)** se compara el efecto de los péptidos ShBL7E y ShBL7E-21C-ASIB utilizando el mismo protocolo experimental. Se observa que carecen de capacidad inactivante. **(C)** Los péptidos no inactivantes no modifican el curso temporal de la inactivación lenta tras la aplicación durante 5 s de un pulso despolarizante que lleva el potencial de membrana a +20 mV desde un potencial inicialmente fijado a -80 mV.

7.7.4. Fotólisis de los péptidos derivatizados con ASIB en solución acuosa.

La fotólisis de los péptidos derivatizados con ASIB en solución acuosa por irradiación con luz ultravioleta de longitud de onda larga conlleva cambios espectrales similares a los que ocurren en idénticas condiciones de irradiación del ASIB libre disuelto en DMSO (ver **Fig. 27**). Conforme aumenta el tiempo de fotólisis decrece la absorbancia tanto del máximo de 272 como del de 310 nm. Los dos puntos isobésticos que se encuentran a aproximadamente 250 y 325 nm se mantienen durante la fase inicial de la fotólisis (hasta ~300 s de irradiación para los péptidos derivatizados y hasta ~100 s en el ASIB libre), lo que sugiere que la fotólisis conduce a la formación de un único producto inicialmente, aunque se formen más subproductos conforme aumenta el tiempo de irradiación. Como consecuencia de la irradiación en el espectro de infrarrojo de los péptidos derivatizados con ASIB desaparece por completo la banda a 2115 cm^{-1} característica de las azidas aromáticas. La irradiación de los

péptidos no derivatizados en condiciones similares no supone cambios apreciables en su espectro UV-visible, lo que hace pensar que la parte peptídica de los derivados no sufre daños de importancia como consecuencia de la irradiación. El tiempo medio de fotólisis de los péptidos derivatizados fue aproximadamente de 110 s frente a los 64 s del ASIB libre disuelto en DMSO.

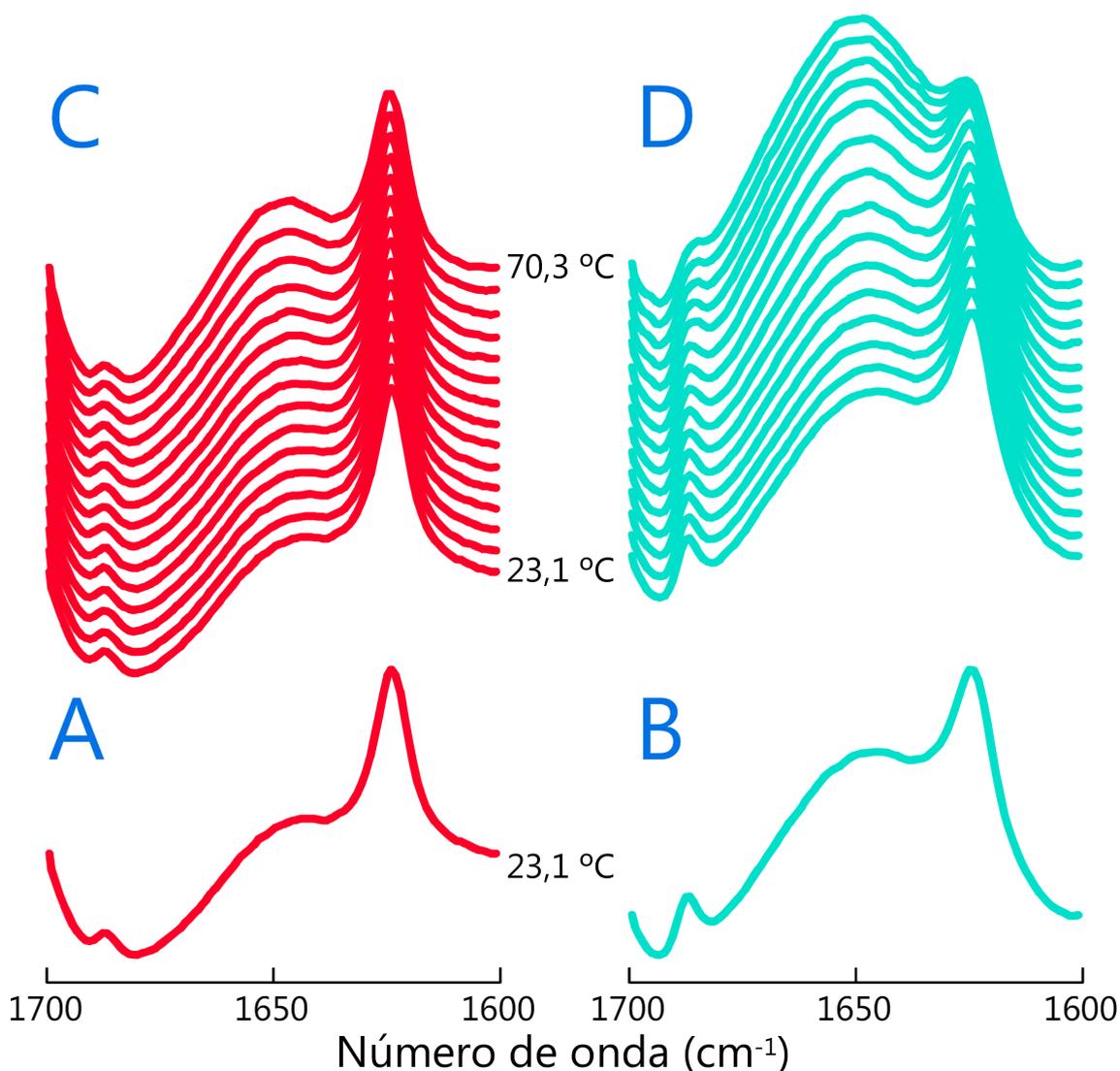


Fig. 26. Banda Amida I del espectro de infrarrojo original del péptido ShB (**A**, **C**) y del péptido ShB-21C-ASIB (**B**, **D**) en presencia de vesículas de ácido fosfatídico. Los espectros **A** y **B** se han tomado a temperatura ambiente. Los espectros de los paneles **C** y **D** ilustran los cambios inducidos por el aumento de la temperatura en la banda Amida I del espectro de infrarrojo de ambos péptidos, que han sido tomados a la temperatura (C) indicada. Las muestras se encuentran en tampón de D₂O de Hepes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4. La concentración final de cada péptido en la muestra es de aproximadamente 4,5 mM, mientras que la de fosfolípido es de 32,5 mM.

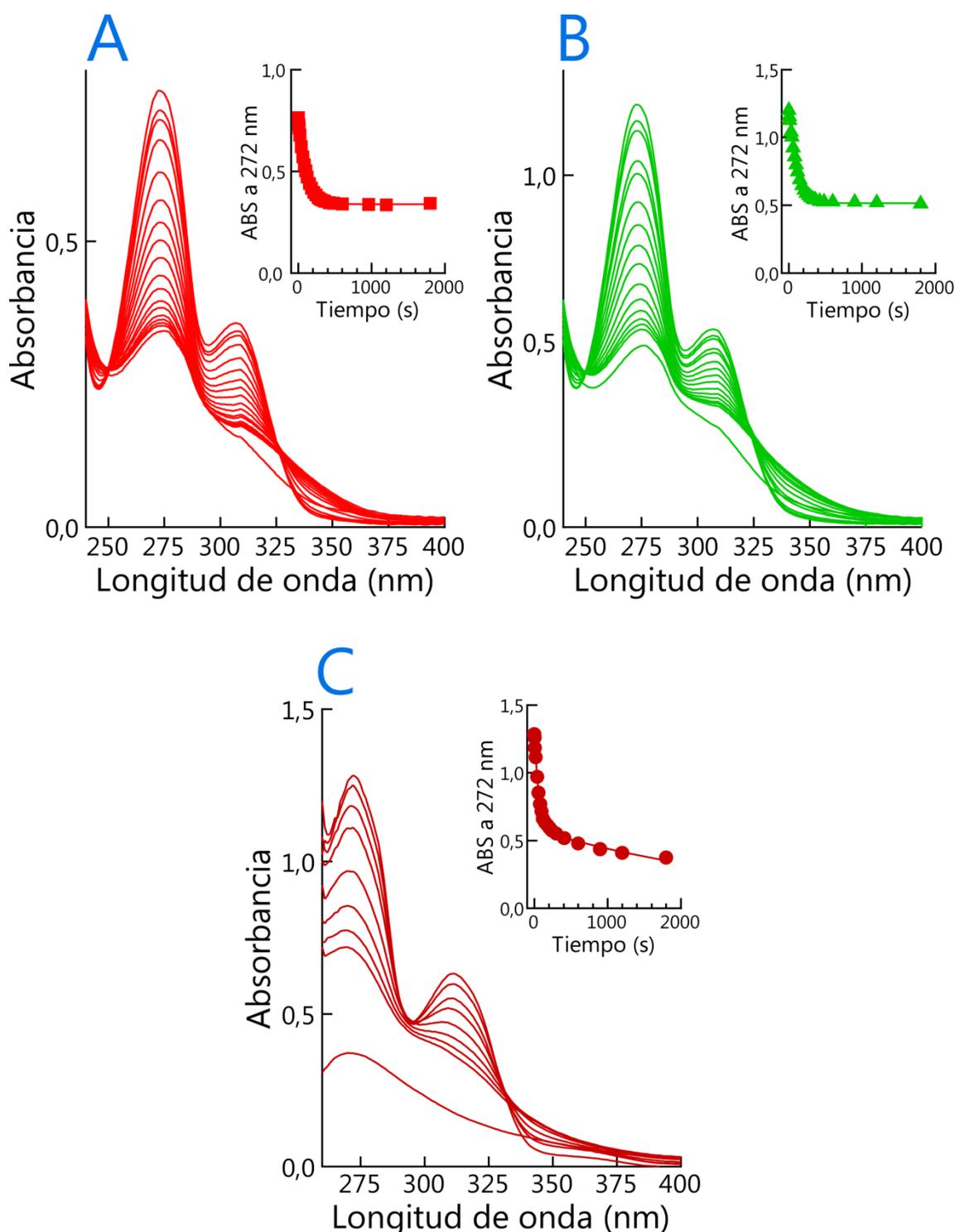


Fig. 27. Cambios en el espectro de absorbancia en función del tiempo de irradiación con luz UV. Fotólisis de los péptido ShB-21C-ASIB (panel **A**) y ShBL7E-21C-ASIB (panel **B**) a concentración 38 y 61 μM , respectivamente, disueltos en ácido acético al 0.05 %. En el panel **C** se presenta la fotólisis del ASIB (67 μM) libre disuelto en DMSO. Los espectros con mayor y menor absorbancia en los tres paneles se corresponden con las muestras sin irradiar e irradiadas 30 minutos, respectivamente. Los insertos en cada panel representan la absorbancia en el máximo a 272 nm frente al tiempo de irradiación.

7.8. Propiedades estructurales y funcionales del péptido ShB fosforilado en Y8.

7.8.1. El péptido ShB como sustrato de la quinasa Src y de la tirosin-fosfatasa 1B.

La incubación del péptido ShB en presencia de la quinasa Src y de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durante 60 min supone una incorporación de ^{32}P en el mismo, dependiente del tiempo. La cuantificación de la fosforilación se hace mediante densitometría con un analizador de imágenes sobre el autorradiograma (ver **Fig. 28**). A los ~15 min se produce aproximadamente el 50 % de la incorporación máxima. A saturación, la estequiometría de la fosforilación es aproximadamente de 0,9 moles de ^{32}P por mol de péptido. El “inmunoblot” con el anticuerpo monoclonal anti-P-tirosina específico muestra la presencia de fosfotirosina en una banda de peso molecular similar al esperado para el péptido fosforilado. A su vez, el péptido fosforilado por la quinasa Src es sustrato de la tirosin-fosfatasa 1B (datos no presentados).

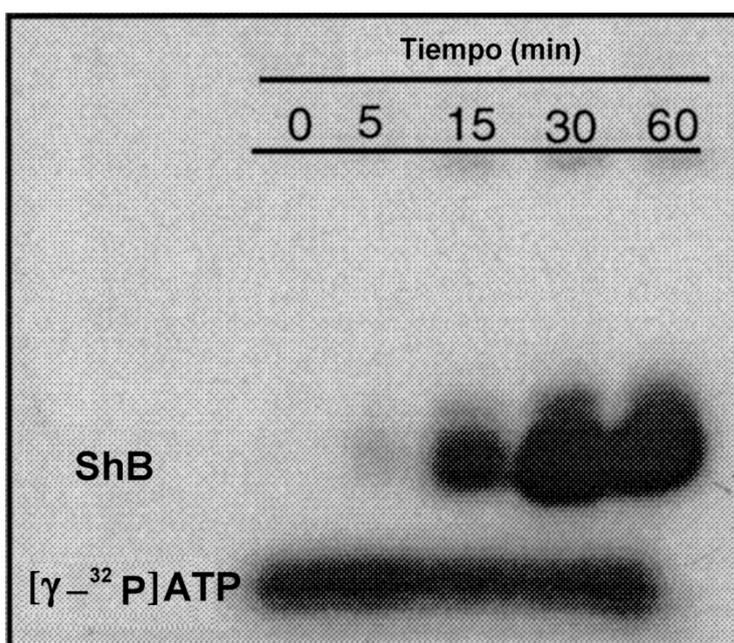


Fig. 28. Cinética de fosforilación del péptido ShB por la quinasa Src, estudiada a partir del grado de incorporación de ^{32}P . Se presenta el autorradiograma resultante de exponer el gel correspondiente a una película, como se describe en la sección 2.11. de Materiales y Métodos.

7.8.2. El péptido ShB-Y8(P) pierde su capacidad de inducir la inactivación rápida al canal ShBΔ4-46.

Para estudiar la capacidad del péptido ShB-Y8(P) de modificar la cinética de inactivación de un canal de K^+ , nuevamente se ha utilizado el canal mutante derivado del *Shaker* B (*Shaker* BΔ4-46) que por presentar una delección del extremo N-terminal, carece de inactivación rápida (Hoshi y cols., 1990; López-Barneo y cols., 1993). En la **Fig. 29** se presentan registros de corrientes macroscópicas provocados por canales *Shaker* BΔ4-46 expresados en células CHO sometidas a un pulso despolarizante. La adición del

péptido ShB permite que se recupere la inactivación rápida de la corriente de K^+ . La constante de tiempo para la inactivación (t) es de 215 ± 48 (media \pm desviación estándar, $n=6$) (ver **Tabla III**). Por el contrario, el péptido ShB-Y8(P), tanto el sintetizado químicamente como el resultante de la fosforilación por la quinasa Src (90-95 % de incorporación de P), no permite la recuperación de la inactivación rápida, al igual que ocurría con el péptido mutante ShBL7E (ver **Fig. 25**).

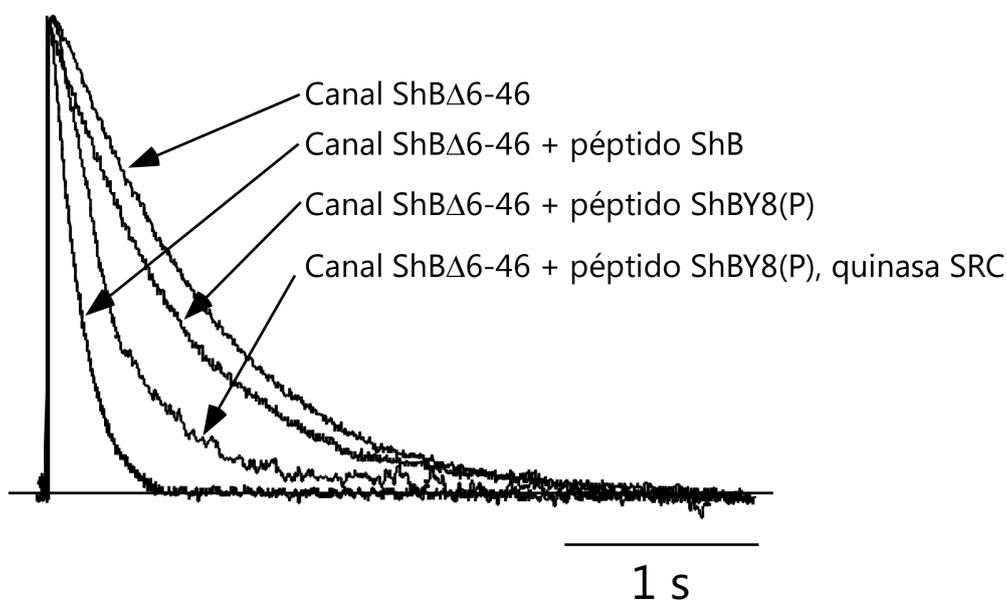


Fig. 29. Comparación del efecto de distintos péptidos N-terminal sobre el curso temporal de la activación e inactivación de corrientes de K^+ en el canal *Shaker* B Δ 4-46, expresado en células CHO. Los registros fueron adquiridos utilizando la técnica de "patch-clamp" en configuración de célula entera. Los péptidos siempre fueron disueltos en la solución de la pipeta de registro a una concentración de $500 \mu\text{M}$. La corriente es provocada por la aplicación de pulsos despolarizantes que cambian el potencial de membrana inicial de -80 mV a $+20 \text{ mV}$, 0 mV y -20 mV , respectivamente. La duración del pulso es de $3,5 \text{ s}$. La corriente se ha filtrado a 10 kHz y para posibilitar su comparación se han autoescalado.

La variación de la velocidad de activación es dependiente del voltaje pero no se ve afectada por la presencia del péptido, esté o no fosforilado, en el rango de potenciales de membrana entre -20 y $+40 \text{ mV}$. Esto mismo ocurría con otros péptidos utilizados en el trabajo presentado en esta Memoria (ver **Fig. 24**).

Tabla III: Efecto de diferentes péptidos N-terminal sobre el curso temporal de la activación e inactivación de corrientes de K^+ en canales ShB Δ 6-46. La constante de activación ($t_{1/2}$) se mide como el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de la amplitud máxima de la corriente a diferentes potenciales: -20 mV, 0 mV and +20 mV. El valor de la constante de inactivación (t) se estima ajustando el tramo de disminución de la corriente a una función exponencial de caída simple. Los datos representan la media \pm desviación estándar de un número de experimentos indicado entre paréntesis. El potencial de membrana inicial es de -80 mV.

Péptido	$\tau_{1/2}$ activación (ms)			τ inactivación (ms)
	- 20 mV	0 mV	+ 20 mV	+ 20 mV
Control (sin péptido)	5,63 \pm 1,12 (7)	3,28 \pm 0,43 (8)	2,32 \pm 0,21 (8)	1300 \pm 160 (6)
ShB	4,91 \pm 0,95 (5)	3,17 \pm 0,39 (7)	2,22 \pm 0,23 (6)	215 \pm 48 (6)
ShB-Y8(P)	5,87 \pm 1,03 (5)	3,39 \pm 0,47 (5)	2,38 \pm 0,36 (5)	766 \pm 87 (6)
ShB-Y8(P) (quinasa Src)	5,65 \pm 0,89 (4)	3,35 \pm 0,32 (4)	2,17 \pm 0,29 (4)	634 \pm 81 (5)

7.8.3. Propiedades estructurales del péptido ShB-Y8(P).

En la **Fig. 30** se muestra la banda amida I del espectro de infrarrojo del péptido ShB-Y8(P) frente a diferentes tipos de vesículas lipídicas y la evolución en su comportamiento frente a un aumento escalonado de la temperatura. Al igual que ocurría con otros péptidos relacionados, empleados a lo largo de esta Memoria, también el péptido ShB-Y8(P) en presencia de PC presenta una banda amida I con un máximo centrado a 1645 cm^{-1} , indicativo de que dicho péptido no adquiere una conformación ordenada en presencia de lípidos zwitteriónicos; probablemente porque ni tan siquiera se una a este tipo de lípidos (ver **Fig. 30 C**). Esto mismo se observa cuando el péptido se encuentra sólo en disolución acuosa (datos no presentados). Frente a fosfolípidos aniónicos (PA y PG) aparecen en el espectro de infrarrojo los componentes típicos de la estructura β , centrados a 1623 y 1688 cm^{-1} (ver **Fig. 30 A y B**).

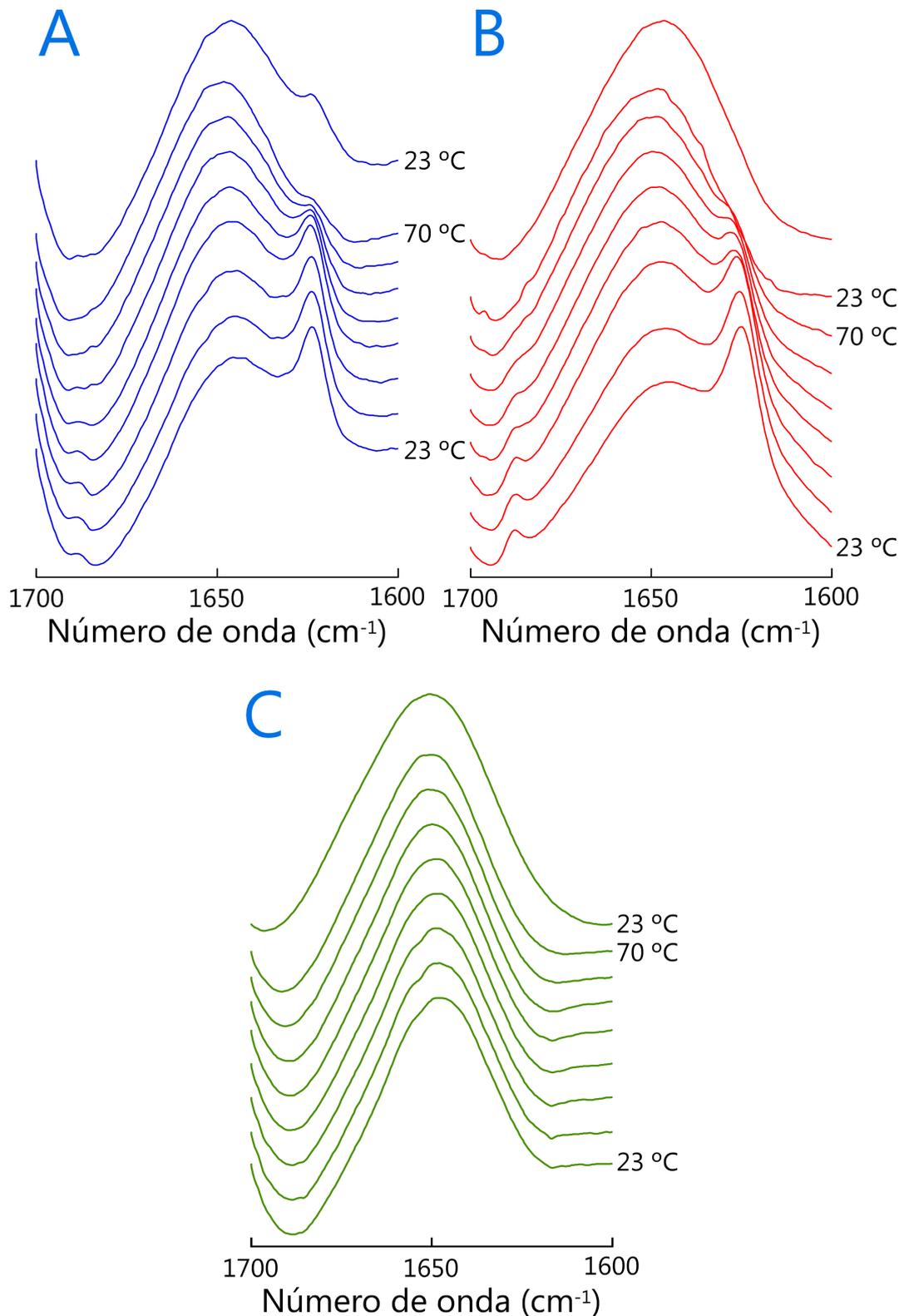


Fig. 30. Banda amida I del espectro original del péptido ShB-Y8(P) en presencia de ácido fosfatídico (A), fosfatidilglicerol (B) y fosfatidilcolina (C) resuspendidos en tampón de D_2O de HEPES 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4 La concentración final de péptidos en todas las muestras es ~ 4 mM y la de fosfolípido varía entre 32,4 y 35,9 mM, dependiendo del tipo. Los espectros que se muestran han sido adquiridos durante un proceso de aumento escalonado de la temperatura.

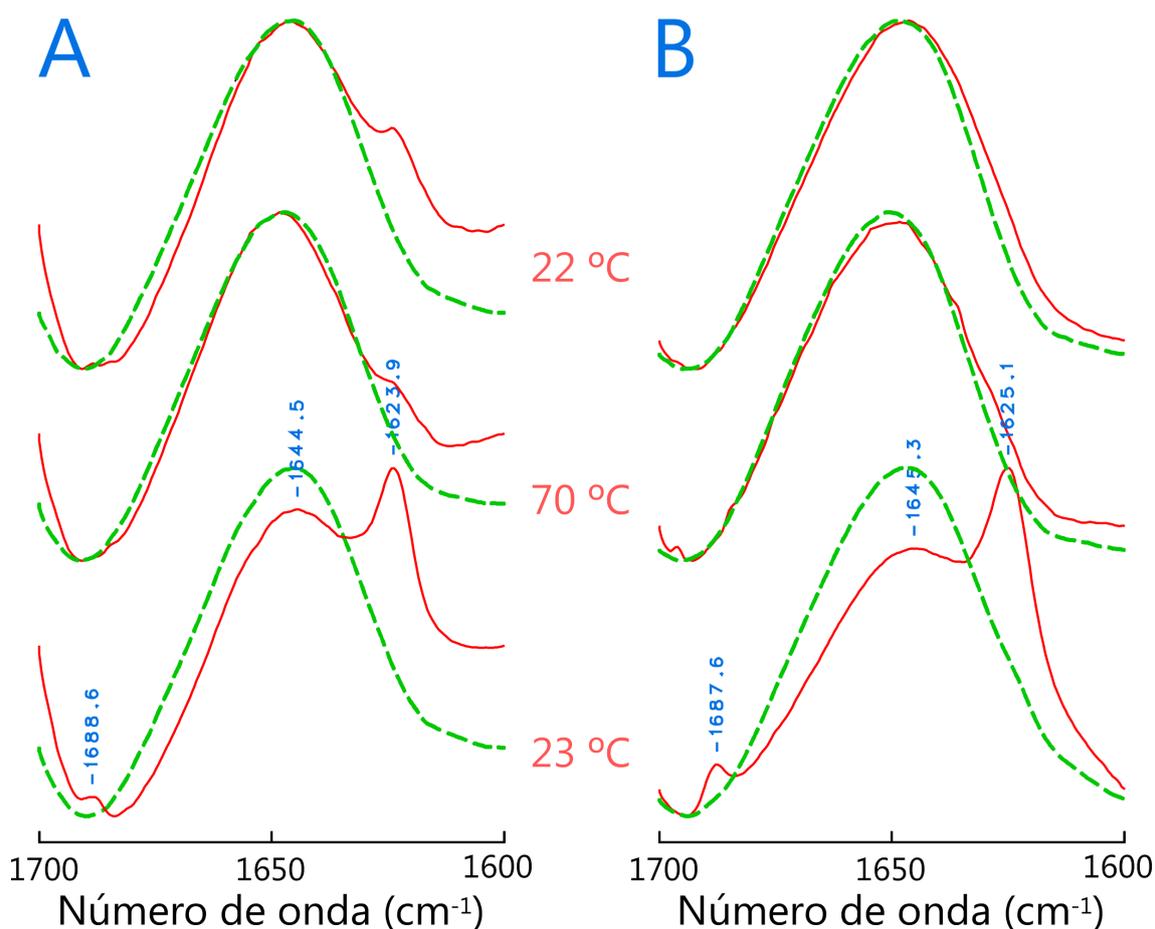


Fig. 31. Banda amida I del espectro original del péptido ShB-Y8(P) en presencia de ácido fosfatídico **(A)** y fosfatidilglicerol **(B)** resuspendidos en tampón de D₂O de Hepes 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4 (línea continua) y en tampón acetato sódico 10 mM, MOPS 10 mM, CAPS 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM y 0,01% NaN₃; pD 9,9 (línea discontinua). La relación molar péptido/fosfolípido es 0,13. Cada panel incluye tres espectros tomados durante un proceso de aumento escalonado de la temperatura, incluyéndose el primer espectro (inferior, 23 °C) y el último (medio, 70 °C), así como el espectro adquirido después de que la temperatura descienda a 22 °C (superior).

Fijándonos en el componente de baja frecuencia, por poseer mayor absorbancia que el de alta, podemos observar que su importancia relativa (relación de absorbancias 1623/1643 cm⁻¹) es significativamente menor que en el caso del péptido ShB (ver **Fig. 8 C y E**); como también lo es su estabilidad frente al aumento de la temperatura, donde dicha relación disminuye hasta prácticamente anularse al alcanzar temperaturas próximas a los 70 °C (ver **Fig. 30 A y B**). Además, al recuperarse la temperatura inicial (22 °C) no aparece de nuevo este componente. Otras características que ponen de manifiesto las diferencias estructurales entre el péptido ShB y su forma fosforilada son el hecho de la adopción del componente de 1623 cm⁻¹, en la forma fosforilada, es sensible a la relación molar péptido/fosfolípido y desaparece a relaciones de 0.06 o inferiores (ver **Fig. 32**); así como el hecho de que a un pD básico (pD 9,9), el grupo fosforilo de la Tyr8 debe encontrarse fundamentalmente en forma dianiónica, lo cual

debe dificultar hasta tal punto la interacción entre el péptido y el fosfolípido que posiblemente no exista ni unión entre ambos y ello daría cuenta de la total ausencia de dicho componente cuando el péptido se encuentra en presencia de vesículas aniónicas (ver **Fig. 31**).

7.8.4. Estudio de inserción del péptido ShB-Y8(P) en bicapas fosfolipídicas.

Dado que el dominio N-terminal hidrofóbico del péptido ShB es el que se inserta en la matriz aniónica (ver sección 1.1.3. de Resultados), cabe pensar que modificaciones covalentes en aminoácidos integrantes del mismo (adición de un grupo fosfato en Tyr8, en este caso) modifiquen las interacciones entre el péptido y las cadenas acílicas de la matriz fosfolipídica. De esta forma, empleamos nuevamente la calorimetría diferencial de barrido para explorar la capacidad de inserción del péptido ShB-Y8(P) en matrices fosfolipídicas. Como consecuencia de la inserción de un péptido o proteína en una bicapa de fosfolípidos puros se produce una disminución, proporcional a la concentración de la proteína, de la entalpía de transición de fase gel a líquido cristalino, sin que se vea afectada la temperatura de transición de fase (T_c) (Papahadjopoulos y cols., 1975). Como se puede observar en la **Fig. 33** la adición del péptido ShB-Y8(P) tanto a vesículas aniónicas (DMPG o DMPA) como a vesículas zwitteriónicas (DMPC) no produce una disminución significativa de la entalpía de transición de fase. Así mismo, los cambios en la T_c son despreciables. En consecuencia, y al igual que ocurría con el péptido ShB-L7E, podemos decir que no se inserta en vesículas lipídicas.

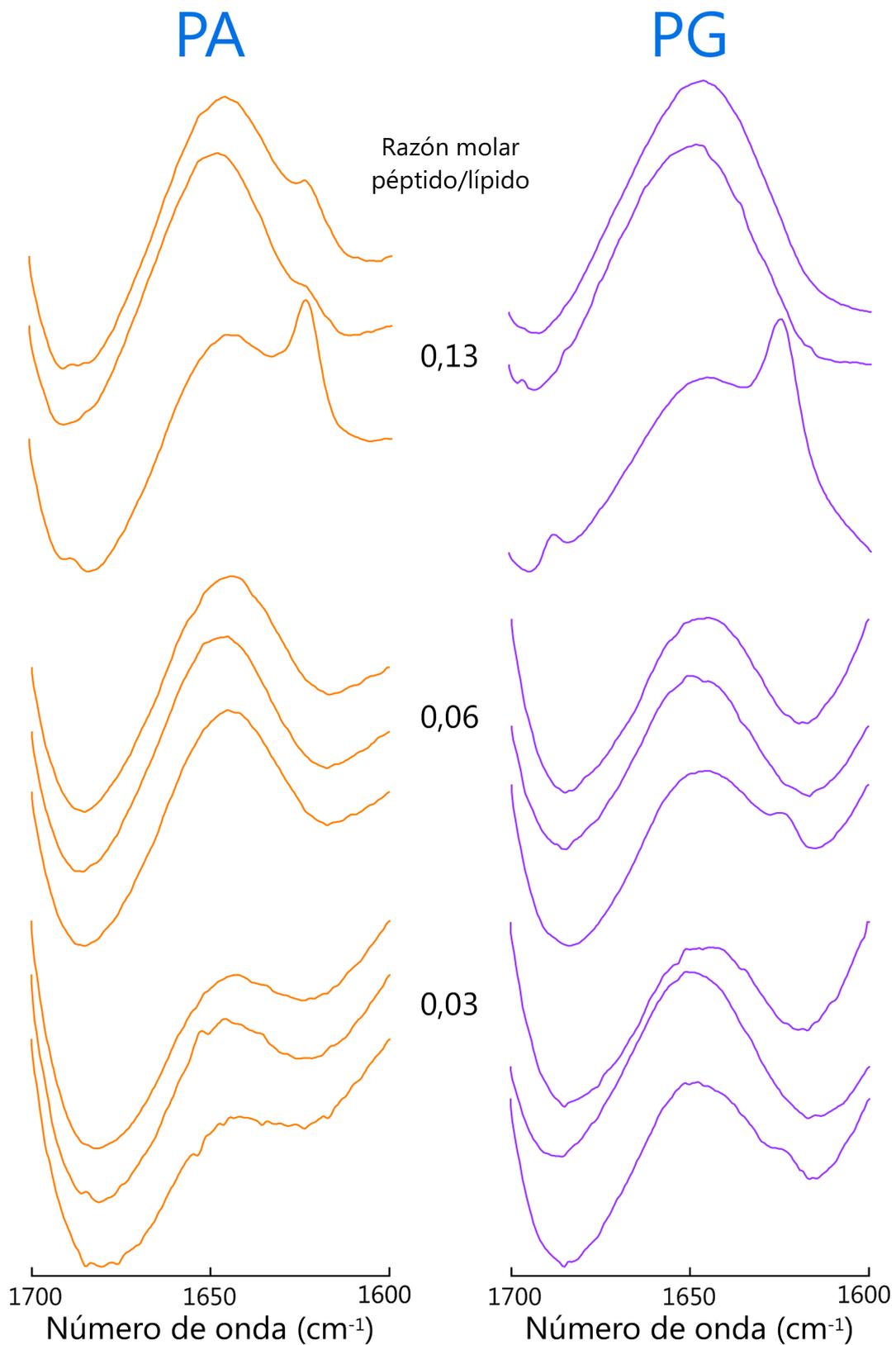


Fig. 32. Banda amida I del espectro original del péptido ShB-Y8(P) en presencia de ácido fosfatídico (PA, paneles del lado izquierdo) y fosfatidilglicerol (PG, paneles del lado derecho) resuspendidos en tampón de D_2O de HEPES 5 mM, KCl 130 mM, NaCl 20 mM; pD 7,4. La relación molar péptido/fosfolípido se indica en la posición central en número. Cada panel incluye tres espectros tomados durante un proceso de aumento escalonado de la temperatura, incluyéndose el primer espectro (inferior, 23 °C) y el último (medio, 70 °C), así como el espectro adquirido después de que la temperatura descienda a 22 °C (superior).

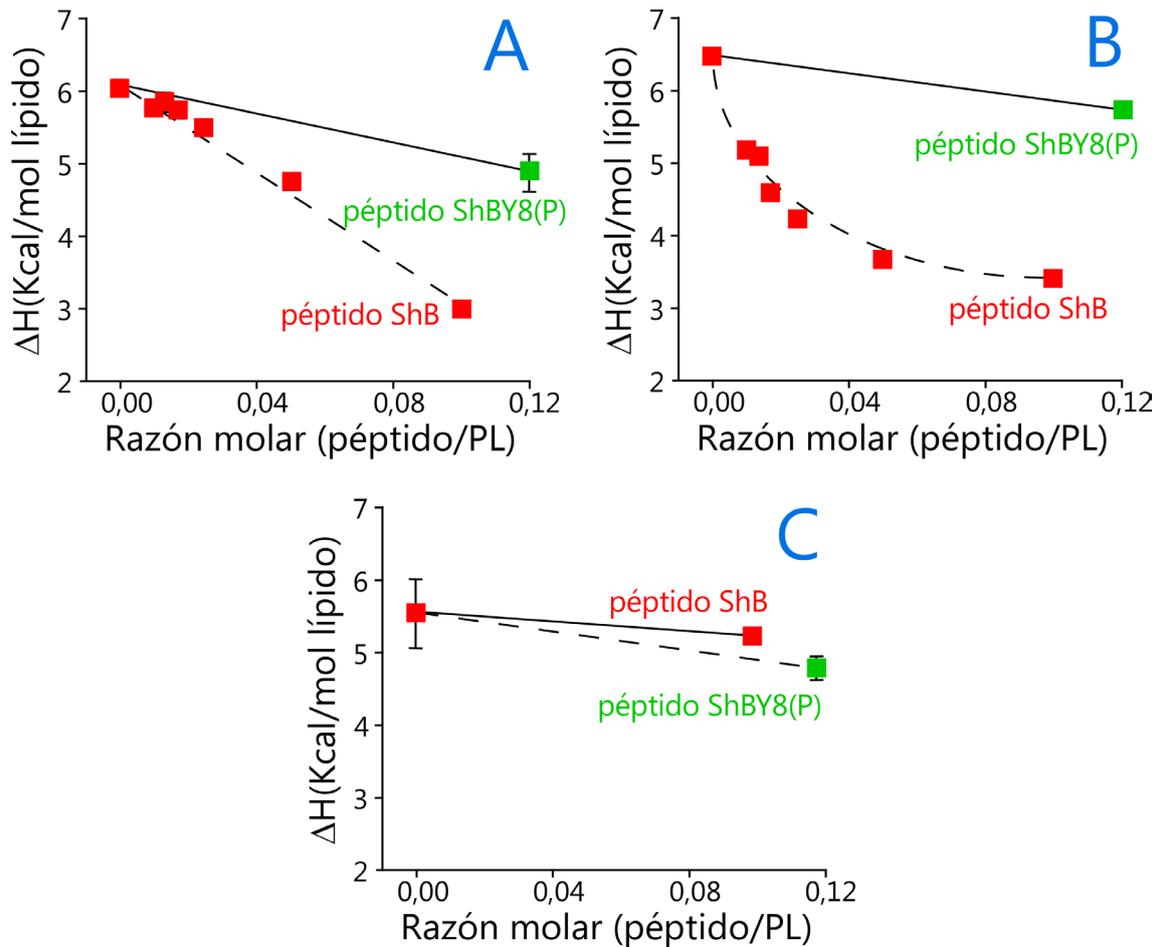


Fig. 33. Efecto de la fosforilación del péptido ShB en su capacidad de inserción en bicapas aniónicas. Se compara los cambios en la entalpía de transición de fase gel a líquido cristalino de vesículas multilamelares grandes de DMPG (**A**), DMPA (**B**) y DMPC (**C**) provocados por la presencia de los péptidos ShB y ShB-Y8(P), calculadas a partir de los termogramas de calorimetría diferencial de barrido de las mezclas péptido/fosfolípido en tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM; pH 7,0, n=3. Esta figura se ha construido con parte de información contenida en la **Fig. 15**.

8. Discusión.

8.1. Interacción de los péptidos ShB y ShBL7E con vesículas fosfolipídicas.

En la génesis del trabajo presentado en esta Memoria se encuentran los trabajos publicados por el grupo de Aldrich a principios de los años 90 (Hoshi y cols., 1990; Zagotta y cols.; 1990). En dichos trabajos se pone de manifiesto que en los canales de potasio activados por voltaje (despolarización de la membrana) existe, en cada subunidad, una región próxima al extremo N-terminal que juega un importante papel en el proceso de inactivación. Este puede explicarse recurriendo al modelo de "bola y cadena", propuesto inicialmente para explicar el mecanismo de inactivación de canales de Na⁺ dependientes de voltaje (Bezanilla y Armstrong, 1972; Bezanilla y Armstrong, 1977), según el cual un dominio citoplásmico flexible de la propia proteína canal, tras interactuar con sitios, aún sin definir, en la conformación del canal abierto, provocaría su inactivación por simple oclusión del poro, que a través dicho canal, permite el paso de iones de K⁺. En dichos trabajos, se concluye que en los canales tipo *Shaker* B el fragmento que contiene los 20 primeros aminoácidos del extremo N-terminal es el causante de la inactivación rápida. Esta región (la "bola") se conecta con el resto de la proteína por una secuencia de unos 60 aminoácidos (la "cadena"). Así mismo, ponen de manifiesto que la "bola" desgajada del resto de la proteína, es decir, como péptido sintético con idéntica estructura primaria mantiene la función de hacer recuperar la inactivación rápida de canales mutantes que por haber perdido el extremo N-terminal carecen de ella, por ej. el canal ShB Δ 4-46 (ver **Fig. 25** de los RESULTADOS).

En experimentos de "patch clamp" realizados con macroparches se pone de manifiesto que la velocidad de la inactivación, a nivel de corriente macroscópica, es dependiente de la concentración de péptido; aumentando al incrementarse la concentración de este, como cabría esperar en una reacción bimolecular simple. Además, para una concentración de péptido dada la velocidad de inactivación macroscópica depende del voltaje, aunque a nivel de canal único sea independiente. Y ello porque a voltajes más positivos, a los cuales los canales se activan más rápidamente, la inactivación inducida por el péptido es más rápida (Zagotta y cols., 1990). Todo esto indica que al igual que ocurre en el proceso de inactivación normal (provocada por el extremo N-terminal de la propia proteína canal), la inactivación producida por el péptido está acoplada al proceso de activación. Lo que quizá sí resulta

un aspecto diferencial entre el proceso de inactivación normal y el inducido por el péptido es el hecho de que la velocidad de recuperación de la inactivación inducida es más lenta que en el proceso normal. Esto se deduce de experimentos en los cuales la repetición de pulsos de voltaje despolarizantes con una frecuencia a la cual las corrientes de canales *Shaker B* se recuperan completamente en el intervalo entre pulsos, en presencia del péptido sintético tienden a disminuir su amplitud progresivamente porque aumentan los canales en un estado de bloqueo por el péptido. Quizá la explicación resida en una mayor afinidad del péptido sintético por el sitio de unión al canal que la que tiene el dominio inactivante normal, que unido covalentemente a los restos de la "cadena" desestabiliza el estado inactivado (Zagotta y cols., 1990).

Hay otros dos aspectos, puestos de manifiesto en estos trabajos, que nos interesa resaltar porque van a regir el desarrollo del trabajo presentado en esta Memoria. Por una parte, la pérdida de la capacidad inactivante del péptido sometido a hidrólisis por tripsina, que no ocurre por calentamiento del péptido y que pone de manifiesto que la mitad hidrofílica C-terminal del péptido (con numerosos sitios de hidrólisis potencial por tripsina) es necesaria para que el péptido produzca la inactivación. Y por otra parte, la dependencia de la inactivación inducida por el péptido de la estructura primaria de este; hasta el punto de que mutaciones en su zona N-terminal hidrofóbica (11 primeros aminoácidos) por residuos con carga (caso de la mutación L7E) hacen que pierda su capacidad inactivante, mientras que en la zona C-terminal hidrofílica mutaciones que no alteren el balance de cargas netas positivas no suponen una pérdida de su capacidad inactivante (Murrel-Lagnado y Aldrich, 1993a; Murrel-Lagnado y Aldrich, 1993b).

La pretensión del trabajo aquí recogido no es otra que la de tratar de entender en términos moleculares las propiedades de la "bola" inactivante y las causas que provocan la pérdida de dicha capacidad. Asumiendo, en base a las observaciones publicadas arriba mencionadas, que el proceso de inactivación normal es básicamente igual que el inducido por el péptido y utilizando un modelo simple, que pretende simular características descritas en el canal normal, como son las vesículas aniónicas, para estudiar las interacciones entre la "bola" y el sitio diana en el canal. Además, se pone luz a los cambios estructurales que deben ocurrir en el proceso de inactivación

rápida de canales de potasio. Es necesario enfatizar que hay dificultades intrínsecas y limitaciones que se derivan del uso de modelos simples que tratan de imitar componentes de sistemas biológicos más complicados y, por consiguiente, los datos obtenidos a partir de sistemas modelo deben entenderse como conjeturas razonables sobre el comportamiento y propiedades que las moléculas reales probablemente presentan. La posibilidad del estudio estructural y funcional de un dominio de cualquier proteína o de esta en su conjunto y en especial si se trata de una proteína de membrana, viene dada por la posibilidad de disponer de la suficiente cantidad de proteína purificada a partir de un material biológico en el que se encuentra en cantidad abundante; así como por el hecho de disponer de un protocolo de purificación adecuado, que no suponga la pérdida de su actividad biológica. Entre las proteínas de membrana es excepcional el caso del receptor nicotínico de acetilcolina que se encuentra en gran abundancia en el órgano eléctrico del pez *Torpedo*. Ello ha hecho de esta proteína un modelo de estudio muy extendido. Sin embargo, los canales iónicos y tantas otras proteínas de membrana, se encuentran en pequeño número en las células y no resulta fácil purificar cantidades suficientes para realizar estudios estructurales. Esto nos empuja a buscar modelos más simples que siquiera nos permitan el estudio de aspectos parciales de los complejos sistemas biológicos. Probablemente, la dirección futura en este campo, y ya comienzan a publicarse trabajos al respecto, sea recurrir a las técnicas de ADN recombinante para conseguir la sobreexpresión de la proteína de nuestro interés en algún sistema celular, desarrollar métodos de purificación y sobre todo conseguir el plegamiento nativo que permita a su vez el mantenimiento de su funcionalidad.

Aunque simple, el modelo arriba propuesto para la interacción de los péptidos ShB y ShBL7E con vesículas fosfolipídicas aniónicas presenta ciertas similitudes con los modelos propuestos para explicar cómo los péptidos pueden producir la inactivación de canales de K^+ . De acuerdo con dichos modelos (Jan y Jan, 1992; Durell y Guy, 1992), residuos cargados positivamente de la zona C-terminal del péptido ShB presumiblemente interaccionan con residuos cargados negativamente de la boca interna del canal, únicamente accesibles cuando este está en estado abierto. Esta región de carga superficial negativa debida a restos de ácido glutámico (muy conservados en los distintos tipos de canales de potasio) está situada en el extremo de la hélice anfipática S_{4-5} de las cuatro subunidades. Este anillo de carga superficial

negativa sería comparable a la carga superficial negativa de nuestros liposomas aniónicos. Por otra parte, tanto en canales de tipo *Shaker* B de K⁺ (Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993a) como en canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (Toro y cols., 1994) se ha postulado la existencia de un bolsillo hidrofóbico en el vestíbulo interno citoplásmico, en base a que diversas mutaciones que hacen al péptido ShB más hidrofóbico suponen una unión más intensa del péptido al canal. La formación de este bolsillo hidrofóbico podría deberse a la rotación de la hélice anfipática S₄₋₅ inducida por la activación del canal (Durell y Guy, 1992), originando un ambiente adecuado en el que, al igual que las cadenas acílicas de la bicapa en los liposomas aniónicos, pueda interaccionar la mitad N-terminal hidrofóbica del péptido ShB.

La información experimental desde un punto de vista estructural sobre este elemento regulador de la cinética de inactivación de los canales de K⁺ únicamente se reduce a estudios preliminares de dicroísmo circular (DC) y resonancia magnética nuclear (RMN) del péptido ShB en mezclas trifluoroetanol-agua (Lee y cols., 1993). Estos autores indican que el péptido presenta en H₂O una estructura no ordenada, mientras que, al igual que le ocurre a otros péptidos y proteínas (Reddy y Nagaraj, 1989; Sönnichsen y cols., 1992), tiene tendencia a adoptar estructura helicoidal conforme aumenta el porcentaje de trifluoroetanol. Nuestros propios experimentos de DC sobre los péptidos ShB y ShBL7E confirman este hecho y lo que es más importante, con independencia de que la formación de estructura helicoidal sea una consecuencia directa del uso del trifluoroetanol y no un reflejo de la estructura nativa, indican que ambos péptidos presentan una capacidad diferente de estructurarse. En este sentido, se han publicado trabajos con datos contradictorios sobre otras "bolas inactivantes" derivadas de canales de K⁺ dependientes de voltaje de mamíferos (Antz y cols., 1997; Abbott y cols., 1998). Antz y cols. (1997) haciendo experimentos de RMN a pH 3.5 encuentran que Raw (Kv3.4) presenta en solución acuosa una estructura compacta que deja expuestos dos sitios de fosforilación y permite la formación de un puente disulfuro intramolecular entre las Cys6 y Cys24. Por el contrario RCK4 (Kv1.4) contiene estructura en α -hélice en similares condiciones experimentales. Los datos que publican Abbott y cols. (1998) sobre experimentos de FTIR y DC con el péptido Raw3 muestran que dependiendo de que se encuentre en forma oxidada o reducida presenta o no estructura beta, respectivamente. El hecho de que la forma reducida adopte dicha estructura independientemente de que se encuentre en solución acuosa, en presencia

de SDS (por encima y por debajo de la concentración micelar crítica), en presencia de lípidos aniónicos o zwitteriónicos sugiere que simplemente se trata de péptido agregado (beta intermolecular). De hecho, nuestros propios experimentos con Raw3, tanto en condiciones oxidantes como reductoras, indican que en solución acuosa y frente a lípidos aniónicos o zwitteriónicos presenta una estructura predominantemente no ordenada (Datos no incluidos en esta Memoria). En contra de la idea publicada por Antz y cols. (1997) de que debe existir más de una clase de péptido inactivante en términos estructurales, nuestros datos (No incluidos en esta Memoria y aún sin publicar) indican que podría encontrarse un patrón estructural entre distintos péptidos inactivantes (ShB, ShB-21C, ShBE12KD13K, ShB 1-16) y no inactivantes (ShBL7E, ShBL7E-21C, ShB 1-14, Sh H 37, ShC 1-20) definido por la adopción de estructura beta y la capacidad de inserción en bicapas aniónicas por parte de los primeros y la no estructuración e incapacidad de inserción en bicapas aniónicas por parte de los segundos.

El análisis, en los espectros de FTIR obtenidos en D₂O puro, de la banda amida I tanto del péptido ShB como del ShBL7E muestra que presentan una serie de conformaciones rápidamente interconvertibles, como cabe esperar en cualquier péptido pequeño en solución acuosa (Dyson y Wright, 1991), y que predominantemente contienen estructura no ordenada. Los cambios en la fuerza y composición iónicas o el pH tienen escaso o nulo efecto sobre el péptido ShBL7E pero sí inducen cambios apreciables en las preferencias conformacionales del péptido inactivante ShB, que adopta estructura β , como se deduce tras la aparición de los componentes a 1632 y 1623 cm^{-1} en el espectro de infrarrojo. En cualquier caso la conformación de ambos péptidos en solución acuosa parece que muestra una escasa dependencia de las interacciones electrostáticas dado que la neutralización de restos de aminoácidos ácidos (a bajo pH) o básicos (a alto pH), que se encuentran en el extremo C-terminal del péptido, únicamente supone pequeños cambios en el espectro de infrarrojo en solución. Sin embargo, la presencia de micelas de detergentes aniónicos sí parece ser un factor más importante en la adopción de estructura β por parte del péptido ShB, mientras que el péptido ShBL7E sigue adoptando una conformación no ordenada al igual que en solución acuosa. La escasa tendencia del péptido ShBL7E a adoptar estructura β está de acuerdo con la baja probabilidad del glutámico (Glu7) de formar estructura β , si bien hay que tener en cuenta que estos

cálculos de probabilidad se hacen en base a estructuras conocidas de proteínas globulares (Chou y Fasman, 1974).

Los estudios llevados a cabo en presencia de liposomas aniónicos ponen claramente de manifiesto la distinta capacidad de ambos péptidos de adoptar estructura β . En este caso, el componente espectral que con más claridad denota dicha diferencia tiene una absorbancia máxima a una frecuencia de 1623 cm^{-1} , aparece a concentraciones de péptido muy bajas y es mucho más intenso que cualquiera de los componentes de estructura β observados en presencia de detergente aniónico. El péptido ShBL7E no adopta esta estructura en presencia de liposomas aniónicos (excepto para concentraciones de péptido altas y solamente con vesículas de PG). Ninguno de los péptidos adopta este tipo de estructura en presencia de liposomas zwitteriónicos. Estas observaciones son muy similares a las presentadas para ciertos péptidos señal necesarios para la traslocación de proteínas de membrana (Reddy y Nagaraj, 1989; Demel y cols., 1990). Dichos péptidos se insertan en las bicapas que contienen fosfolípidos aniónicos, dando lugar a estructuras β caracterizadas por componentes espectrales de baja frecuencia en ese ambiente tan hidrofóbico (Demel y cols., 1990). Sin embargo, dichos componentes también pueden resultar de agregaciones intermoleculares (Muga y cols., 1990; Fraser y cols., 1991; Jackson y cols., 1992). Teniendo en cuenta estas consideraciones podemos pensar que nuestros resultados son consecuencia de la inserción de la mitad N-terminal del péptido ShB en la bicapa aniónica, en la que en principio la estructura β formada puede ser intra- o intermolecular. Considerando sólo los datos de FTIR podemos pensar que se trata de una estructura β intramolecular, es decir, que no es consecuencia de la agregación del péptido y ello porque la absorbancia relativa del componente a 1623 cm^{-1} es independiente de la concentración de péptido utilizada. La posibilidad de inserción del péptido ShB se ve apoyada por experimentos adicionales en los que se utilizan fosfolípidos sintéticos como el DMPG y el DMPA y donde el componente característico de 1623 cm^{-1} se detecta únicamente a temperaturas superiores a las correspondientes de transición de fase gel a líquido cristalino. De esta forma, el péptido ShBL7E no es capaz de adoptar este tipo de estructura β porque la mutación L7E en su secuencia de aminoácidos dificulta tanto la inserción del extremo N-terminal en la bicapa aniónica como la adopción de la estructura. El componente a 1623 cm^{-1} que presenta el péptido ShBL7E nunca llega a alcanzar la intensidad relativa del componente que presenta el

péptido ShB y además es claramente dependiente de la relación lípido-péptido. La incapacidad de ambos péptidos de formar esta estructura en presencia de vesículas de PC sugiere que la interacción péptido-vesícula lipídica transcurre en dos etapas, una primera de aposición de la mitad C-terminal del péptido sobre la superficie aniónica de la bicapa, que requiere interacciones electrostáticas, y una segunda etapa que supone la adopción de estructura β por parte del dominio N-terminal del péptido y su posterior inserción en el dominio hidrofóbico de la matriz lipídica. Esta segunda etapa no transcurre para el péptido ShBL7E por ser incapaz de cancelar la carga de E7. La necesidad del mantenimiento de la integridad de la estructura primaria del péptido ShB, con sus dominios hidrofóbico e hidrofílico, también se pone de manifiesto en la incapacidad de formación de estructura β en presencia de vesículas aniónicas por parte del fragmento tríptico mayor resultante de la proteólisis por tripsina, ya que supone la ruptura del dominio hidrofílico del péptido. Por lo que respecta a la estabilidad del componente de estructura β de 1623 cm^{-1} también hay diferencias claras entre ambos péptidos, mientras el nativo presenta una gran estabilidad frente a cambios drásticos de las condiciones experimentales, como pueda ser calentamiento a altas temperaturas, cambios extremos en la fuerza iónica o el pH, y la adición de detergentes o EDTA; el péptido mutado sólo adopta estructura β en condiciones más restrictivas y desde luego con una menor estabilidad que el péptido nativo. No obstante, la consecución de esta estructura tan estable requiere que se satisfagan ciertos requisitos. Por ejemplo, los experimentos realizados utilizando vesículas preparadas con mezclas de fosfolípido aniónico/PC muestran que la adopción de dicha estructura por parte del péptido ShB requiere que la vesícula diana presente una densidad de carga superficial relativamente alta, es decir, un alto porcentaje de fosfolípidos aniónicos en la mezcla. Sólo cuando este porcentaje supera el 50 % el péptido ShB puede adoptar estructura β . Esta proporción sólo disminuye cuando se utilizan mezclas PA/PC a un pH alcalino, al cual el ácido fosfatídico se encuentra en forma dianiónica. Por otra parte, teniendo en cuenta la incapacidad del péptido ShB para promover la separación de fases lipídicas como se deduce de los datos de calorimetría, puede concluirse que debe existir una densidad de carga negativa adecuada antes de la interacción con del péptido, dado que es incapaz de reorganizar el microambiente lipídico para con posterioridad interaccionar con los fosfolípidos de la membrana. En este punto el modelo no se aparta de la situación real, ya que es la despolarización de la membrana la responsable de la accesibilidad del

anillo de residuos de glutamato y del bolsillo hidrofóbico y esto, a su vez, permite la interacción del dominio citoplásmico flexible, que concluye con la inactivación del canal.

Los estudios de unión utilizando péptidos marcados con NBD muestran que ni el péptido nativo ni el mutado se unen a fosfolípidos zwitteriónicos pero sí lo hacen a liposomas aniónicos. El componente electrostático de este proceso de unión queda evidenciado por i) el efecto observado por FTIR de estabilización del grupo fosforilo dianiónico del PA, provocado por la presencia de cualquiera de los péptidos, que en cualquier caso es mayor para el péptido nativo y ii) la disminución de la unión que se observa al incrementar el pH hasta ~ 8.5 , lo que probablemente se deba a la desprotonación tanto del grupo amino terminal como de las cadenas laterales de Lys del extremo C-terminal del péptido, que causaría una disminución de la interacción electrostática con la superficie de las vesículas aniónicas. Las diferencias cuantitativas que se observan en los parámetros de unión de ambos péptidos tanto con vesículas de PA como de PG indican 1) que la unión del péptido derivado de ShB es mucho mayor que la del péptido derivado de ShBL7E, y 2) que la unión de ambos péptidos fluorescentes a vesículas de PA ocurre con una mayor afinidad que a vesículas de PG. Esto puede explicarse aludiendo únicamente a las interacciones electrostáticas que median el proceso de unión de ambos péptidos a las vesículas aniónicas, que en el primer caso se ven desfavorecidas por la presencia de una carga neta negativa adicional (E7) en el péptido mutado, y en el segundo se ven favorecidas porque ambos péptidos inducen la estabilización de la forma dianiónica del PA.

La capacidad de inserción de los péptidos en el dominio hidrofóbico de la bicapa lipídica es probablemente lo que mejor distingue el diferente comportamiento de los péptidos ShB y ShBL7E en su interacción con las vesículas aniónicas diana. El péptido mutante ShBL7E, bajo las condiciones experimentales que suponen la adopción de estructura β , no se inserta en la bicapa lipídica. Por el contrario, el péptido nativo ShB se inserta con gran eficiencia tanto en vesículas de DMPG como de DMPA, lo que provoca una disminución de la entalpía de transición de fase gel a líquido cristalino del fosfolípido dependiente de la concentración de péptido, además la temperatura de la transición de fase permanece inalterada. Este comportamiento es enteramente similar al descrito por Papahadjopoulos y cols. (1975) para la interacción

de proteínas integrales de membrana con bicapas lipídicas. No obstante, la inserción en la bicapa no incluye el extremo C-terminal del péptido ShB como se deduce tanto del hecho de que el péptido marcado con NBD que se une a vesículas de PA y PG presenta máximos de emisión entorno a 530-535 nm, lo que indica que en vez de insertarse en la bicapa el NBD (unido covalentemente en el extremo C-terminal) se localiza sobre la superficie de la membrana o cerca de esta; como del hecho de que todos los sitios potenciales de hidrólisis por tripsina permanecen accesibles a esta cuando se añade en el medio acuoso extravesicular. En este mismo sentido vuelve a ponerse de manifiesto la necesidad de mantener íntegro el dominio C-terminal hidrofílico del péptido ShB, no sólo para que se produzca el anclaje y posterior inserción (lo que ya se ha mencionado) sino también para conferir esa extraordinaria estabilidad de la estructura β formada frente a situaciones desestabilizantes.

El estudio de la dependencia de la inserción del péptido ShB en vesículas de DMPC muestra que la disminución máxima de la entalpía asociada a la transición de fase lipídica ocurre a pH 6.0, mientras que a valores próximos o superiores a 8.5, a los cuales el péptido sigue adoptando la típica estructura β , no ocurre la inserción. En consecuencia, la adopción de estructura β ocurre de forma independiente y no necesariamente implica la inserción en la bicapa lipídica. El plegamiento que experimenta el péptido nativo como consecuencia de la adopción de una estructura β intramolecular en su mitad N-terminal a pH neutro probablemente permite la aproximación espacial de residuos de aminoácidos de diferente carga, lo que favorece la formación de puentes salinos. Por ejemplo, este puede ser el caso de la carga positiva del resto amino terminal y la carga negativa de E12. Esto contribuiría a la estabilización por puentes de hidrógeno de la estructura global, y lo que es más importante, tendría como efecto cancelar cargas netas, lo que es necesario que ocurra para que tras el plegamiento de la mitad N-terminal del péptido esta penetre la interfase aniónica que forman los grupos polares de la cabeza de los fosfolípidos y se inserte en la bicapa hidrofóbica. De acuerdo con esto, la incapacidad de inserción del péptido ShB a pH próximos o superiores a 8.5 puede explicarse por la alteración del balance de cargas causado por la desprotonación de grupos básicos. Siguiendo esta misma interpretación, el péptido mutante ShBL7E es incapaz de insertarse en la bicapa ya que no puede cancelar la carga neta negativa de E7, a pesar de lo cual adopta estructura β . Esto concuerda con observaciones previas según las cuales mutaciones en

las que L7 se sustituye por residuos de glutamato o lisina (con un grupo con carga negativa o positiva, respectivamente) pierden la inactivación rápida (Hishi y cols., 1990).

Como ya se ha mencionado arriba, el seguimiento de la adopción de estructura β (a partir de datos de FTIR) por el péptido ShB en presencia de vesículas aniónicas no muestra una dependencia de la concentración de péptido, al menos en el rango de concentraciones estudiado y ello hace pensar que se trata de una estructura β *intramolecular*. Sin embargo, los estudios de FTIR requieren concentraciones de péptido considerablemente altas y disponiendo únicamente de estos datos no se puede excluir que la estructura β formada no resulte del establecimiento de puentes de hidrógeno *intermoleculares* como consecuencia de la agregación del péptido. Por esta razón también se ha estudiado la posible agregación del péptido unido a las vesículas. Para ello se ha empleado derivados fluorescentes de los péptidos, lo que ha permitido usar concentraciones de péptido mucho más pequeñas que las empleadas en FTIR. Las medidas transferencia de energía por resonancia de fluorescencia empleando como donador el péptido ShB-21C-NBD y como aceptor ShB-21C-Rho, así como las pruebas de formación de excímeros utilizando el péptido ShB-21C-Pyr, muestran claramente que el péptido insertado se encuentra como monómero, es decir, no se agrega, a cualquiera de las razones fosfolípido-péptido estudiadas. Por esto, la estructura β formada resulta del establecimiento de puentes de hidrógeno *intramoleculares*. Ello requiere que el péptido ShB se pliegue formando una estructura en "horquilla β " en la que debido tanto a razones estéricas como al mayor grado de libertad de rotación, debemos considerar dos aminoácidos candidatos para permitir el giro β necesario. Estos son alguno de los residuos de Gly en las posiciones 6 o 9 en la secuencia del péptido. A este respecto, tanto los estudios de criofractura como los de accesibilidad a la hidrólisis por tripsina nos proporcionan información adicional que nos puede ayudar a decidir a favor de considerar uno u otro resto como punto de giro más probable. Las imágenes de criofractura indican que cuando se añade el péptido ShB al medio acuoso extravesicular se inserta profundamente en la bicapa lipídica perturbando simultáneamente ambas hemicapas. La inserción del extremo C-terminal es parcial, quedando totalmente accesibles los cuatro sitios de hidrólisis potencial por tripsina añadida en el medio extravesicular. Esto coincide con los estudios de unión del péptido ShB-21C-NBD a vesículas y en los que queda claro que el NBD se localiza cerca de la superficie de la membrana pero no se inserta. Estos resultados requieren que el

plegamiento para que se forme la estructura β debe permitir que esta resulte lo suficientemente larga como para atravesar la hemicapa externa y afectar parte de la interna, en consecuencia el punto de giro más probable es Gly6, ya que en Gly9 la estructura resultante sería más corta. Continuando en esta misma línea argumental, cabe resaltar que para que ocurra la inserción relativamente profunda del péptido plegado en el dominio hidrofóbico de la bicapa las cargas netas que puedan encontrarse en la porción de secuencia que se inserta deben quedar canceladas por puentes salinos entre residuos de diferente signo.

En concordancia con los distintos datos experimentales y las conclusiones sacadas de los mismos se ha construido un modelo estructural para el péptido ShB insertado en la bicapa aniónica. En la **Fig. 34** se muestran dos posibles estructuras que pueden satisfacer suficientemente bien los datos experimentales de que se dispone. Estos modelos responden al plegamiento alternativo del péptido según dos posibles secuencias del tetrapéptido necesario para formar el giro β , que podría estar formado por la secuencia 4-7 (VAGL) o la 5-8 (AGLY).

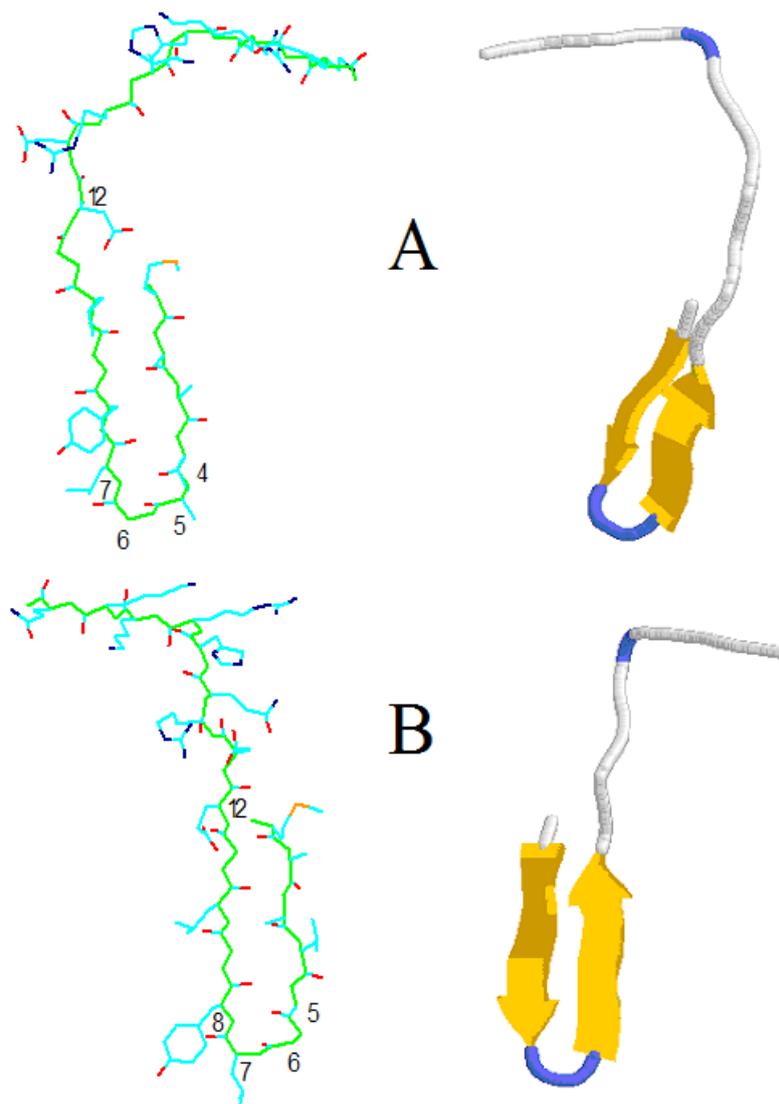


Fig. 34. Propuesta de dos modelos alternativos de estructura en "horquilla β " para el péptido ShB Insertado en vesículas fosfolipídicas aniónicas. El giro necesario para que se forme esta estructura puede tener lugar a partir de dos secuencias de tetrapéptido: VAGL (panel **A**) y AGLY (panel **B**). Los números que se encuentran en cada figura indican la posición de los correspondientes carbonos α . En las estructuras más detalladas que se presentan en el lado izquierdo de cada panel, se representa el esqueleto peptídico y las cadenas laterales de los aminoácidos de colores verde y azul claro, respectivamente. Los átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre aparecen de colores rojo, azul oscuro y naranja, respectivamente. Los modelos del lado derecho de cada panel corresponden a representaciones más simplificadas de las mismas horquillas, en las que las hebras β aparecen en amarillo. El modelaje del péptido se ha realizado en una estación de trabajo Silicon Graphics, usando el programa Sybyl (Tripos Inc., St. Louis, MO). Los ángulos de torsión del esqueleto peptídico para los residuos 5 y 6 (panel **A**) y 6 y 7 (panel **B**) han sido modificados hasta conseguir que la distancia entre las dos hebras de la hoja β permitiera el establecimiento de los correspondientes puentes de hidrógeno. Los ángulos de los restantes residuos fueron fijados dentro de los valores normales de una estructura extendida. La estructura resultante se sometió a un procedimiento de minimización de energía con el campo de fuerza del programa Sybyl.

La secuencia VAGL (**Fig. 5A**) presenta una mayor probabilidad de formar un giro β de acuerdo con las predicciones de Chou y Fasman (Chou y Fasman, 1974), y mantiene los restos de Met1 y Glu12 suficientemente próximos como para formar un puente salino entre los grupos amino N-terminal y carboxilo de la cadena lateral, respectivamente. La estabilidad de esta estructura está garantizada tanto por los puentes de hidrógeno como por las interacciones hidrofóbicas resultantes de la aproximación de los restos hidrofóbicos de Val4 y Leu7. Si el giro se produce en el tetrapéptido AGLY (**Fig. 5B**) la horquilla resultante es más larga y está estabilizada por más puentes de hidrógeno, además sitúa más cerca los restos de Met1 y Glu12 para que se forme el puente salino. En ambas estructuras se ha postulado un puente salino adicional entre las cadenas laterales de los restos Asp13 y Arg14 para que haya una cancelación interna completa de cargas netas en la secuencia del péptido comprendida entre los aminoácidos 1 y 16. Los restos cargados positivamente de los aminoácidos situados en C-terminal se han modelado formando un plano lo más extendido posible para facilitar su interacción electrostática con el grupo fosforilo de la cabeza del PA cargado negativamente.

El hecho de que péptidos inactivantes de distintos orígenes sean capaces de inactivar diferentes tipos de canales sugiere que la inactivación del canal ocurre como consecuencia de la interacción entre dominios complementarios, que permiten ciertas variaciones en términos de su estructura primaria. Asumiendo que la interacción entre el péptido inactivante y las bicapas aniónicas puede imitar, al menos parcialmente, el sitio receptor en el canal que interacciona con la bola, se puede asumir que la conformación que esta adopta es similar a la que conocemos que posee en presencia de las dianas modelo aniónicas. En cualquier caso, el modelo propuesto debe someterse a pruebas posteriores para conocer en qué medida se ajusta a la información experimental. Por ejemplo, el modelo propone que el péptido ShB se organiza como un monómero cuando interacciona con la membrana modelo. Esto parece estar en concordancia con trabajos publicados con anterioridad en los que se pone de manifiesto que la inactivación del canal resulta de la interacción de una sola molécula de ShB con el correspondiente sitio receptor en la proteína canal (Gomez-Lagunas y Armstrong, 1995; MacKinnon y cols., 1993). Además, el modelo predice que la introducción de una carga neta en la región que forma la "horquilla β " hace al

péptido energéticamente desfavorable para atravesar la interfase aniónica e insertarse en el dominio hidrofóbico, este es el caso de los péptidos mutantes ShBL7E y ShBL7R (en los que se introduce una carga negativa y positiva, respectivamente) que de esta forma pierden su capacidad inactivante (Hoshi y cols., 1990). Además, el modelo propuesto y la localización relativa de los restos aminoacídicos está de acuerdo con la única información experimental, basada en la cinética de inactivación del canal provocada por una gran variedad de péptidos mutantes, sobre la conformación del péptido unido al canal (Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993a) que proponen para el péptido una conformación "extendida". Por otra parte, la observación de que el doble mutante ShBE12KD13K, en el que no podría formarse uno de los puentes salinos postulados en el modelo (Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993a), es un mutante inactivante del péptido ShB sugiere que la inserción del péptido en la boca interna del canal no debe ser tan profunda como en la vesícula diana modelo. En relación con esto, nuestros datos muestran que en la interacción del péptido nativo con micelas de colato sódico, en la que la profundidad de la inserción viene limitada por el tamaño de la micela, el péptido sigue manteniendo la tendencia a adoptar estructura β .

8.2. El péptido ShB-21C-ASIB: un análogo estructural y funcional del péptido ShB.

En el diseño de un análogo del péptido inactivante ShB capaz de marcar por fotoafinidad el sitio de la proteína canal a la que se une la "bola" inactivante, se han tenido en cuenta diversas consideraciones para hacer de él una herramienta útil en el futuro.

Primeramente se ha considerado el proceso de derivativación del péptido, en el que se han pretendido tres cosas: i) que sea necesario un número mínimo de reacciones químicas sencillas para unir la sonda fotoactivable al péptido, ii) que la derivatización ocurra con gran eficacia y iii) que implique a residuos específicos en la estructura primaria del péptido. Pues bien, la síntesis y purificación de los péptidos derivatizados con ASIB que se presentan, se ajustan totalmente a estos requerimientos. La reacción de alquilación implicada en el proceso de derivatización transcurre con una gran eficiencia (94-95 %) y especificidad, ya que sólo los grupos sulfhidrilo libres de la Cys del extremo C-terminal de cada péptido permiten la unión covalente del ASIB.

En segundo lugar, la caracterización estructural y funcional del péptido ShB-21C-ASIB debe revelar propiedades similares a las del péptido ShB, para poder hablar

de que el primero es un análogo funcional del segundo. Desde un punto de vista estructural los estudios de FTIR indican que el péptido nativo y el derivado marcado con ASIB, adoptan una estructura similar, aunque no idéntica, cuando se ponen en presencia de dianas modelo que imitan características del sitio del receptor al que debe unirse la "bola" inactivante. Esa diferencia radica en la intensidad y la resistencia a la temperatura del componente de 1623 cm^{-1} . Posiblemente la explicación se deba a que la unión de la parte fotoactivable (ASIB) a la Cys situada en el extremo C-terminal dificulte el anclaje a la membrana aniónica de ese dominio C-terminal catiónico del péptido. De hecho, una situación de proteólisis enzimática por tripsina en este dominio, después de insertado el péptido en la matriz lipídica, tiene unas consecuencias estructurales similares de disminución del componente β y pérdida de su resistencia a la desnaturalización térmica. Desde un punto de vista funcional, los registros electrofisiológicos ponen de manifiesto que no hay diferencias entre el péptido nativo ShB y el derivado ShB-21C-ASIB en cuanto a su capacidad de restaurar la inactivación rápida (tipo N) del canal ShB Δ 4-46. Además, el péptido ShB-21C-ASIB no ejerce ninguna influencia en otras propiedades del canal como son la velocidad de activación o el curso temporal de la inactivación lenta (tipo C). A partir de estas observaciones parece razonable asumir que la afinidad del ShB-21C-ASIB por el canal ShB Δ 4-46 debe ser similar a la que presenta el péptido nativo ShB. No se intentó una estimación cuantitativa de la K_D para el péptido análogo, porque en nuestras condiciones experimentales (registros de *patch-clamp* en configuración de célula entera) la medida se hubiera visto alterada por posibles problemas de difusión y/o degradación proteolítica del péptido. Así pues, desconocemos la concentración "efectiva" del péptido análogo. La K_D para la inactivación de los canales ShB Δ 4-46 por parte del péptido nativo es aproximadamente de $3\ \mu\text{M}$, medida a partir de parches escindidos de oocitos de *Xenopus* transfectados (Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993a), donde el péptido no tiene problemas de difusión o proteólisis.

En tercer lugar, en una sonda para marcaje por fotoafinidad, la fotólisis de la porción fotoactivable debe dar lugar a un intermediario de reacción con una vida media lo más corta posible, para asegurar la unión covalente de dicho intermediario con el sitio "específico" de unión en la proteína diana. Dicha unión covalente debe ocurrir de forma eficaz y con una velocidad mayor que la de formación de los complejos no covalentes sonda-diana. Tanto los nitrenos singletes como tripletes

producidos por la fotólisis de las azidas aromáticas, como es el caso del ASIB, se encuentran entre los intermediarios fotoquímicos con vidas medias más cortas conocidas. En particular, la vida media de los nitrenos en estado singlete, que sería la especie reactiva predominante cuando la sonda se une a la proteína canal, es probablemente menor de 30 μ s (DeGraff y cols., 1974). En nuestro caso, teniendo presente las consideraciones anteriores sobre la reactividad de los nitrenos en estado excitado intermediarios, y el hecho de que la afinidad del péptido análogo por el canal debe de ser similar a la del péptido nativo ShB, podemos esperar que la fotólisis en el complejo no covalente formado por la proteína canal y el péptido ShB-21C-ASIB, durante la inactivación, permita el marcaje específico del sitio de unión al canal; seguramente por reacción con enlaces C-H o N-H del enlace peptídico (reacciones de "inserción"), o bien con grupos nucleófilos de cadenas laterales. Ante estas condiciones, la difusión de las especies fotoreactivas fuera del bolsillo hidrofóbico al que se une la bola de forma no covalente y su asociación y posterior marcaje, con otros sitios "no específicos" del canal, parece muy poco probable. Asimismo, los nitrenos resultantes de la fotólisis de la sonda libre (péptido ShB-21C-ASIB no unido al canal) deben reaccionar rápidamente con el solvente o con componentes del tampón o consigo mismos, sin tener tiempo de difundir para acercarse lo suficiente a la proteína y reaccionar con ella (Bayley y Knowles, 1976; Ruoho y cols., 1984). En cualquier caso, siempre podrá utilizarse el péptido no inactivante ShBL7E-21C-ASIB para medir el posible "marcaje inespecífico" a otras partes del canal. La realización de los experimentos de fotomarcaje en busca del sitio diana de la "bola" inactivante en el canal de potasio aún no se ha llevado a cabo porque excedería los límites del trabajo presentado en esta Memoria. En cualquier caso, la línea a seguir vendría definida por la sobreexpresión de un canal carente de la "bola" inactivante, por ejemplo ShB Δ 4-46, en oocitos de *Xenopus*, la introducción de la "bola análoga" utilizando la propia pipeta de registro de "patch-clamp", la despolarización de la membrana y la aplicación de un protocolo de irradiación con luz UV adecuado. La identificación del fragmento del canal al que se uniera el péptido análogo pasaría por la inmunoprecipitación del canal con anticuerpos anti-canal, seguida de una hidrólisis enzimática y la separación en gel de poliacrilamida de los fragmentos proteicos. La identificación del fragmento al que se une covalentemente la "bola análoga", no resultaría difícil teniendo en cuenta que el ASIB es susceptible de ser marcado con iodo radiactivo.

Es necesario hacer notar, que aunque los nitrenos intermediarios son especies muy reactivas, es necesario un tiempo de irradiación relativamente grande para su formación. Evidentemente, este tiempo puede optimizarse (acortando el tiempo de irradiación) empleando una fuente de luz UV de longitud de onda más corta que proporcione mayor intensidad, disminuyendo la distancia entre la lámpara y la muestra o eligiendo un protocolo adecuado del pulsos de irradiación. Sin embargo, esta optimización únicamente incrementará la eficacia del fotomarcaje de la proteína diana, sin alterar la especificidad, que estará fundamentalmente determinada por la afinidad del péptido ShB-21C-ASIB por el sitio de unión de la proteína diana y la vida media de los nitrenos intermediarios.

Finalmente, debemos tener presente que el péptido inactivante del canal de potasio *Shaker B* también inactiva otros canales de K^+ dependientes de voltaje (Zagotta y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; Dubinsky y cols., 1992), canales de K^+ activados por Ca^{2+} del alta conductancia (Toro y cols., 1992; Foster y cols., 1992) o canales activados por nucleótidos cíclicos (Kramer y cols., 1994), que normalmente no inactivan. Por consiguiente, parece lógico pensar que el péptido análogo ShB-21C-ASIB pueda usarse como una herramienta adecuada con la cual explorar los sitios de unión para el péptido inactivante en una gran variedad de canales.

[8.3. Modulación de la capacidad inactivante del péptido ShB mediante fosforilación por tirosin-quinasa en Y8.](#)

Las propiedades eléctricas de las neuronas dependen en gran medida de las propiedades de compuerta de sus canales iónicos y estas, a su vez, pueden ser moduladas por señales bioquímicas que implican tanto interacciones con otras proteínas como modificaciones covalentes (Drain y cols., 1994). Los procesos de fosforilación y desfosforilación son muy importantes en la modulación de la función de los canales. Afectan tanto a las subunidades del canal como a proteínas asociadas y pueden suponer tanto cambios en la amplitud como en el curso temporal de la corriente provocada por la unión de un ligando o por la despolarización de la membrana (Levitan, 1994). Los cambios en estas magnitudes son el resultado de modificar el número de canales disponibles (Shuster y cols., 1985; Gunning, 1987), la probabilidad de apertura (Cachelin y cols., 1983; Ewald y cols., 1985) o la conductancia (Levitan, 1988). Sin embargo, los mecanismos biofísicos de este proceso de regulación sólo se conocen en unos pocos casos y no necesariamente presentan elementos

comunes. Más aún las quinasas implicadas y los sitios de fosforilación son muy diferentes.

A este respecto, se ha estudiado con cierto detalle cómo la modulación de la inactivación rápida de canales de K^+ expresados en oocitos de *Xenopus* se ve afectada por las serín/treonin-quinasas A y C. La fosforilación de una secuencia consenso en el extremo C-terminal de canales de tipo *Shaker* por proteína quinasa A es necesaria para el mantenimiento de la inactivación rápida, ya que la aplicación de fosfatasa hace más lenta dicha inactivación (Drain y cols., 1994). Basándose en el hecho de que en la cinética de la inactivación rápida median interacciones electrostáticas entre el dominio N-terminal inactivante ("la bola") y su sitio receptor en la boca citoplásmica del canal (Murell-Lagnado y Aldrich, 1993a; Murell-Lagnado y Aldrich, 1993b), los autores especulan que la adición de cargas negativas que supone un grupo fosfato en el dominio C-terminal del canal incrementaría las interacciones electrostáticas con los restos cargados positivamente de la bola inactivante y por consiguiente la velocidad de inactivación. A la luz de nuestro modelo esto podría entenderse si el dominio C-terminal del canal, como consecuencia de algún cambio conformacional, contribuyera a formar parte del anillo de restos de glutamato de la hélice anfipática S_{4-5} (Jan y Jan, 1992; Durell y Guy, 1992), ya que se vería favorecida la primera etapa de interacción electrostática entre el dominio C-terminal hidrofílico de la bola y este anillo aniónico. Sin embargo, no hay evidencia experimental de ello. Por el contrario, la proteína quinasa C fosforila dos serinas (Ser15 y Ser21) en un canal Kv3.4 humano, en el propio extremo N-terminal y ello hace más lento la inactivación hasta el punto de eliminar el componente rápido (Covarrubias y cols., 1994). De nuevo teniendo en cuenta nuestro modelo de interacción, el aporte de cargas negativas que supone la fosforilación en esta zona lo que hace es "romper" el dominio catiónico C-terminal de la bola y por consiguiente anular la etapa electrostática inicial. Sin embargo, en el canal *Shaker* B no hay Ser o Thr en esta zona de la bola susceptibles de fosforilarse por lo que difícilmente ninguna serín/tronin-quinasa podría intervenir en la modulación por fosforilación de su cinética de inactivación. Lo que sí hay es una Tyr8 que potencialmente podría ejercer un papel similar a las Ser15 y Ser21 en un canal Kv3.4 humano, aunque impidiendo la segunda etapa de interacción hidrofóbica (según nuestro modelo) y cuya consecuencia inmediata sería también eliminar la inactivación tipo N. Esto justifica nuestro interés por

estudiar el posible cambio de propiedades biofísicas y funcionales, así como la susceptibilidad del péptido ShB a ser fosforilado por una tirosin-quinasa.

El estudio de los sistemas de tirosin quinasa/fosfatasa presenta en los últimos años un gran interés ya que las rutas de señalización por fosfotirosina se encuentran implicadas en fenómenos de diferenciación y crecimiento celular a través de sofisticadas rutas enzimáticas (Hunter, 1995). Particularmente interesante resulta el hecho de que tanto en neuronas postmitóticas como en células endocrinas se expresan niveles muy grandes de tirosin quinasa como *Src* o *PYK2* (Brugge y cols., 1985; Lev y cols., 1985; Hanley, 1988; Sudhof, 1995). Ya se ha puesto de manifiesto que dichas enzimas regulan la fosforilación y la actividad de canales de potasio de mamífero (Holmes y cols., 1996a; Holmes y cols., 1996b). No sólo son muy abundante sino que en algún caso se ha encontrado que se encuentran directamente asociadas a los canales. Así por ejemplo motivos ricos en Pro de los canales humanos Kv1.5 permiten la unión a dominios SH3 de *Src* y la fosforilación que producen en el canal supone la supresión de la corriente iónica (Holmes y cols., 1996b). En canales Kv1.3 dicha fosforilación, que parece que ocurre en Tyr449 (segmento H5 formador del poro), igualmente se traduce en una disminución de la corriente. Aunque nosotros no hemos mostrado aún que *Src* fosforile *in vivo* la Tyr8 de canales *Shaker B*, sí queda claro que el péptido ShB es fosforilado *in vitro* de forma específica por *Src* (ShB también es sustrato de la correspondiente fosfatasa) y que las serín/treonin quinasa A y C no lo fosforilan de forma inespecífica. La introducción de un grupo fosfato en el dominio N-terminal hidrofóbico del péptido (Tyr8) supone unas consecuencias similares a las que implica la mutación L7E. Desde un punto de vista estructural no adopta estructura β en presencia de vesículas aniónicas o si lo hace es de forma dependiente de la concentración de péptido y tampoco es capaz de insertarse en el dominio hidrofóbico de la bicapa aniónica. Presumiblemente si ocurriera la fosforilación en Tyr8 *in vivo* el efecto sería la conversión de un canal tipo A en un rectificador retrasado no inactivante. Cuando menos el péptido ShB-Y8P es incapaz de hacer recuperar la inactivación rápida en canales ShB Δ 4-46. Abundando en una idea ya apuntada, las diferentes propiedades eléctricas de los distintos tipos neuronales a lo largo del desarrollo de un organismo se explican en función del distinto número, disposición y tipos de canales de que dispone; y ahora se ven amplificadas por la posibilidad de una modulación bioquímica rápida. En este sentido, diferentes neuronas presentan distintos patrones endógenos de disparo,

unas se encuentran en silencio en ausencia de estímulos externos y otras disparan potenciales de acción espontáneamente, a intervalos regulares o irregulares. También son diferentes la amplitud y la forma de sus potenciales de acción y ello da cuenta de grandes diferencias tanto en la amplitud como en el curso temporal de la liberación de neurotransmisor por sus terminales (Levitan, 1994). Sería ingenuo aventurar las consecuencias a un nivel superior al neuronal que conlleva la posibilidad de modular en estos canales la cinética de su inactivación. Lo que sí parece claro es que en muchos tipos celulares sería capaz de modificar la duración y frecuencia de las espigas de potenciales de acción y por tanto la cantidad y temporalidad de la liberación de neurotransmisor, lo que podría suponer fenómenos de potenciación o inhibición de determinados circuitos neuronales.

9. Conclusiones

1. Se ha utilizado la dependencia conformacional de la banda amida I del espectro de infrarrojo para obtener información estructural del péptido inactivante ShB, y otros péptidos relacionados con él, sometidos a diversas condiciones experimentales. En estos estudios se ha utilizado las vesículas fosfolipídicas aniónicas como modelo del vestíbulo citoplásmico de un canal de potasio dependiente de voltaje, con el que interacciona el dominio citoplásmico flexible del propio canal durante el proceso de la inactivación rápida.
2. Los péptidos ShB y ShBL7E, tanto en solución acuosa como en presencia de liposomas zwitteriónicos, presentan estructura no ordenada. Por el contrario, en presencia de liposomas aniónicos sólo el péptido ShB adopta estructura β . Dicha estructura es independiente del pH y muy estable al aumento de la temperatura, además requiere una gran densidad de carga negativa en la vesícula diana.
3. La secuencia temporal de acontecimientos que supone la interacción de los péptidos con la membrana modelo permite definir tres etapas:
 - 1ª de unión a la superficie aniónica de la vesícula lipídica del extremo C-terminal de los péptidos, está mediada por interacciones electrostáticas y ocurre con una mayor afinidad para el péptido ShB.
 - 2ª de adopción de una estructura beta muy estable por parte del extremo N-terminal del péptido ShB y únicamente en condiciones favorables por parte del péptido ShBL7E. Es independiente del pH del medio. En el caso del péptido ShB se trata de una horquilla beta y en el del péptido ShBL7E podría ser una hoja beta intermolecular.
 - 3ª de inserción profunda del péptido ShB, como monómero, por su extremo N-terminal en el dominio hidrofóbico de los liposomas aniónicos. Esta etapa, al contrario que la de estructuración, es dependiente del pH. El péptido ShBL7E no experimenta esta tercera etapa por su incapacidad para cancelar la carga negativa de E7 en el interior del dominio hidrofóbico de la bicapa.
4. Se ha propuesto un modelo estructural del péptido ShB insertado en vesículas aniónicas que adopta una estructura en horquilla β y que satisface los datos experimentales de que disponemos y que explica el comportamiento de estos péptidos y sus mutantes en lo relativo a inducir la inactivación en los canales iónicos que los contienen.

5. Se ha sintetizado un análogo fotoactivable del péptido inactivante ShB que podrá utilizarse para estudiar el sitio de unión, en diferentes canales, al que se une la bola inactivante durante el proceso de la inactivación rápida.
6. El péptido ShB es sustrato *in vitro* de un sistema de tirosin quinasa/fosfatasa y como consecuencia de su fosforilación en Tyr8 se convierte en un péptido no inactivante. Si esto ocurre *in vivo* estaríamos en presencia de un mecanismo enzimático capaz de modular la cinética de inactivación de un canal de potasio dependiente de voltaje.

10. Bibliografía

1. **Abbott, G.W., Mercer, E.A., Miller, R.T., Ramesh, B. y Srini S.K.** (1998). *Biochemistry*. **37**: 1640-1645.
2. **Aldrich, R.W., Hoshi, T. y Zagotta, W.N.** (1990). *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. **55**: 19-27.
3. **Antz, C., Geyer, M., Fakler, B., Schott, M.K., Guy, H.R., Frank, R., Ruppersberg, J.P. y Kalbitzer H.R.** (1997). *Nature*. **385**: 272-275.
4. **Apel, E.D. y Merlie, J.P.** (1995). *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**: 62-67.
5. **Armstrong, C.M.** (1981). *Physiol. Rev.* **61**: 644-683.
6. **Armstrong, C.M. y Bezanilla, F.** (1973). *Nature*. **242**: 459-461.
7. **Arrondo, J.L., Muga, A., Castresana, J. y Goñi, F.M.** (1994). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**: 23-56.
8. **Arrondo, J.L.R., Mantsch, H.H., Mullner, N., Pikula, S. y Martonosi, A.** (1987). *J. Biol. Chem.* **262**: 9037-9043.
9. **Atherton, E. y Sheppard, R.D.** (1987) En PEPTIDES 1987 (Eds. Gross, E., y Meienhofer, J.) Vol. 9. pp 1-38, Academic Press, New York.
10. **Azhderian, E.M., Hefner, D., Lin, C.H., Kaczmarek, L.K. y Forscher, P.** (1994). *Neuron*. **12**: 1223-1233.
11. **Backx, P.H., Yue, D.T., Lawrence, J.H., Marban, E. y Tomaselli, G.F.** (1992). *Science*. **257**: 248-251.
12. **Bañuelos, S., Arrondo, J.L.R., Goñi, F.M. y Pifat, G.** (1995). *J. Biol. Chem.* **270**: 1460-1467.
13. **Baumann, A., Grupe, A. y Pongs, O.** (1988) *EMBO J.* **7**: 2457-2463.
14. **Baumann, A., Krah-Jentgens, I., Müller, R., Müller, F., Seidel, R., Kecsemethy, W., Casal, J., Ferrues, A. y Pongs, O.** (1987). *EMBO J.* **6**: 3414-3419.
15. **Bayley, H. y Knowles, J.R.** (1976) *Methods in Enzymology* **46**: 69-115.
16. **Bernal, J.D. y Crowfoot, D.C.** (1934). *Nature*. **133**: 794-795.
17. **Bezanilla, F. y Armstrong, C.M.** (1972). *J. Gen. Physiol.* **60**: 588-608.
18. **Bezanilla, F. y Armstrong, C.M.** (1977). *J. Gen. Physiol.* **70**: 549-566.
19. **Bhushan, A. y McNamee, M.G.** (1993). *Biophys. J.* **64**: 716-723.
20. **Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C. y Bredt, D.S.** (1996). *Cell*. **84**: 757-67

21. **Brugge, J.S., Cotton, P.C. Qeral, A.E., Barret, J.N., Nonner, D. and Keane, R.W.** (1985). *Nature*. **316**: 554-557.
22. **Budnik, V., Koh, Y.-H., Guan, B., Haungh, C., Woods, D. y Goczyca, M.** (1996). *Neuron*. **17**: 627-640.
23. **Busch, A.E., Hurst, R.S., North, R.A., Adelman, J.P. y Kavanaugh, M.P.** (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 1384-1390.
24. **Butler, A., Wei, A., Baker, K. y Salkoff, L.** (1989). *Science* **243**: 943-947.
25. **Byler, D.M. y Susi, H.** (1986). *Biopolymers*. **25**: 469-487.
26. **Cachelin, A.B., de Peyer, J.E., Kokubun, S., Reuter, H.** (1983). *Nature*. **304**:462-464.
27. **Cameron, D.G. y Moffatt, D.J.** (1984). *J. Test Eval.* **12**: 78-85.
28. **Cameron, D.G. y Moffatt, D.J.** (1987). *Appl. Spectrosc.* **41**: 539-544.
29. **Castresana, J., Fernandez-Ballester, G., Fernandez, A.M., Laynez, J.L., Arrondo, J.L.R., Ferragut, J.A. y Gonzalez-Ros, J.M.** (1992). *FEBS Lett.* **314**: 171-175.
30. **Castresana, J., Muga, A. y Arrondo, J.L.R.** (1988). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**: 69-75.
31. **Catsch, A.** (1944). *Vererbungslehre* **82**: 64-66.
32. **Catterall, W.A.** (1995). *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 493-531.
33. **Catterall, W.A. y Striessnig, J.** (1992). *Trends Pharmacol. Sci.* **13**: 256-262
34. **Chandy, K., Williams, C., Spencer, R., Aguilar, B., Ghanshani, S., Tempel, B. y Gutman, G.** (1990). *Science*. **247**: 973-975.
35. **Chirgadze, Y.N., Fedorov, O.V. y Trushina, N.P.** (1975). *Biopolymers*. **14**: 679-694.
36. **Cho, K.O., Hunt, C.A. y Kennedy, M.B.** (1992) *Neuron*. **9**: 929-942.
37. **Choi, K.L., Aldrich, R.W. y Yellen, G.** (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5092-5095.
38. **Choi, K.L., Mossman, C., Aubé, J. y Yellen, G.** (1993). *Neuron*. **10**: 533-541.
39. **Chou, P.Y. y Fasman, G.D.** (1974). *Biochemistry*. **13**: 211-222.
40. **Christie, M.J., Adelman, J. P., Douglass, J. y North, A.** (1989). *Science*. **244**: 221-224.
41. **Cooley, J.W. y Tukey, J.W.** (1965). *Math. Comput.* **19**: 297.
42. **Covarrubias, M., Wei, A., Salkoff, L. y Vyas, T.B.** (1994) *Neuron*. **13**: 1403-1412.
43. **De Biasi, M., Hartmann, H.A., Drewe, J.A., Taglialatela, M., Brown, A.M. y Kirsch, G.E.** (1993). *Pflüegers Arch.* **422**: 354-363.

44. **DeGraff, B.A., Gillespie, D.W. y Sundberg, R.J.** (1974) *J. Am. Chem. Soc.* **96**: 7491-7496.
45. **Demel, R.A., Goormaghtigh, E. y Kruijff, B.** (1990). *Biochim. Biophys. Acta.* **1027**: 155-162.
46. **Demo, S.D. y Yellen, G.** (1991). *Neuron* **7**: 743-753.
47. **DeNoyer, L.K. y Dodd, J.G.** (1990). *Am. Lab.* **3**: 21-27.
48. **Dousseau, F., Therrien, M. y Pezolet, M.** (1989). *Appl. Spectrosc.* **43**: 538-542.
49. **Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. y MacKinnon, R.** (1998). *Science.* **280**: 69-77.
50. **Drain, P., Dubin, A.E. y Aldrich, R.W.** (1994) *Neuron.* **12**: 1097-1109.
51. **Dubinsky, W.P., Mayorka-Wark, O. y Schultz, S.** (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1770-1774.
52. **Durrell, S.R. y Guy, R.** (1992). *Biophys. J.* **62**: 238-250.
53. **Dyson, H.J. y Wright, P.E.** (1991). *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**: 519-538.
54. **Echabe, I., Encinar, J.A. y Arrondo, J.L.R.** (1997). *Biospectroscopy.* (En prensa).
55. **Elliot, A. y Ambrose, E.J.** (1950). *Nature.* **165**: 921-922.
56. **Ewald, D.A., Williams, A. y Levitan, I.B.** (1985) *Nature.* **315**: 503-506.
57. **Fernández-Ballester, G., Castresana, J., Arrondo, J.L.R., Ferragut, J.A. y Gonzalez-Ros, J.M.** (1992). *Biochem. J.* **288**: 421-426.
58. **Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M.S., Díaz-Muñoz, M. y Montal, M.** (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6418-6422.
59. **Ferrer-Montiel, A.V., Sun, W. y Montal, M.** (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8021-8025.
60. **Foster, C.D., Chung, S., Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. y Levitan, I.B.** (1992). *Neuron* **9**: 229-236.
61. **Fraser, P.E., Nguyen, J.T., Surewicz, W.K. y Kirschner, D.A.** (1991). *Biophys. J.* **60**: 1190-1201.
62. **Frech, G.C., van Dongen, A., Schuster, G., Brown, A. y Joho, R.** (1989). *Nature.* **340**: 642-645.
63. **Fung, B.K.-K. y Stryer, L.** (1978). *Biochemistry* **17**: 5241-5248.
64. **Gausepohl, H., Boulin, C., Kraft, M. y Frank, R.W.** (1992). *Peptide research.* **5**: 315-320.

65. Gavilanes, F., Peterson, D.L., Bullis, B. y Schirch, L.V. (1983). *J.Biol.Chem.* **258**: 13155-13159.
66. Gazit, E. y Shai, Y. (1993). *Biochemistry* **32**: 3429-3426.
67. Gomez-Lagunas, F. y Armstrong, C.M. (1995). *Biophys. J.* **68**: 89-95.
68. Graham, J.M. y Wallach, D.F.H. (1971). *Biochim. Biophys. Acta.* **241**: 180-191.
69. Green, S., Issemann, J. y Sher, E. (1988). *Nucleic Acid Res.* **16**: 369.
70. Gregory, R.B. y Rosenberg, A. (1986). *Methods Enzymol.* **131**: 448-484.
71. Griffiths, P.R. y De Haseth, J.A. (1986). Fourier transform infrared spectroscopy. *Chem. Anal. Ser. Monogr. Anal. Chem. Appl.* **83**.
72. Gunning, R. (1987). *Science.* **235**: 80-82.
73. Gutman, G.A. y Chandy, K.G. (1993). *Sem. Neurosci.* **5**: 79-92.
74. Guy, H.R. y Conti, F. (1990). *Trends. Neurosci.* **13**: 201-206.
75. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F. J. (1981). *Pflüegers Arch.* **391**: 85-100.
76. Hanley, M.R. (1988). *Neuron.* **1**: 175-182.
77. Hartmann, H.A., Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Tagliatela, M., de Biasi, M., Joho, R.H. y Brown, A.M. (1991). *Science.* **251**: 942-944.
78. Heginbotham, L. y MacKinnon, R. (1992). *Biophys. J.* **65**: 2089-2096.
79. Heginbotham, L. y MacKinnon, R. (1992). *Neuron.* **8**: 483-491.
80. Heginbotham, L., Abramson, T. y MacKinnon, R. (1992). *Science.* **258**: 1152-1155.
81. Heinemann, S. H., Terlau, H. y Imoto, K. (1992). *Pflugers-Arch.* **422**: 90-92.
82. Hell, J.W., Yokoyama, C.T., Breeze, L.J., Chavkin, C. y Catterall, W.A. (1995). *EMBO J.* **14**: 3036-3044.
83. Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. (1952a). *J. Physiol.* **116**: 449-472.
84. Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. (1952b). *J. Physiol.* **116**: 473-496.
85. Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. (1952c). *J. Physiol.* **116**: 497-506.
86. Hodgkin, A.L. y Huxley, A.F. (1952d). *J. Physiol.* **117**: 507-544.
87. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. y Katz, B. (1952). *J. Physiol.* **116**: 424-448.
88. Holmes, T.C., Fadool, D.A. y Levitan, I.B. (1996a). *J. Neurosci.* **16**: 1581-1590.
89. Holmes, T.C., Fadool, D.A., Ren, R. y Levitan, I.B. (1996b). *Science.* **274**: 2089-2091.
90. Hoppe-Seyler, F. (1864). *Virchows Arch. A* **29**: 233-235.
91. Hoshi, T., Zagotta, W.N. y Aldrich, R.W. (1990). *Science.* **250**: 533-538.

92. **Huang, X.-Y., Morielli, A.D. y Peralta, E.G.** (1993) *Cell*. **75**: 1145-1156.
93. **Huang, X.-Y., Morielli, A.D. y Peralta, E.G.** (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 624-628.
94. **Hunt, C.A., Schenker, L.J. y Kennedy, M.B.** (1996) *J. Neurosci.* **16**: 1380-1388.
95. **Hunt, J.F., Earnest, T.N., Bousche, O., Kalghatgi, K., Reilly, K., Horvath, C., Rothschild, K.J. y Engelman, D.M.** (1997b). *Biochemistry* **36**: 15156-15176.
96. **Hunt, J.F., Rath, P., Rothschild, K.J. y Engelman, D.M.** (1997a). *Biochemistry* **37**: 15177-15192.
97. **Hunter, T.** (1995). *Cell*. **80**: 225-236.
98. **Isacoff, E.Y., Jan, Y.N. y Jan, L.Y.** (1991). *Nature*. **353**: 86-90.
99. **Iverson, L.E. y Rudy, B.** (1990). *J. Neurosci.* **10**: 2903-16
100. **Iverson, L.E., Tanouye, M.A., Lester, H.A., Davidson, N. Rudy, B.** (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5723-5727.
101. **Jackson, M., Haris, P.I. y Chapman, D.** (1989). *J. Mol. Struct.* **214**: 329-355.
102. **Jan, L.Y. y Jan, N.Y.** (1990). *Nature*. **345**: 672.
103. **Jan, L.Y. y Jan, Y.N.** (1992). *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 537-555.
104. **Jan, Y.N., Jan, L.Y. y Dennis, M.J.** (1977). *Proc. R. Soc. Lond. B.* **198**: 87-108.
105. **Johnson, B.D., Scheuer, T. y Catterall, W.A.** (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 11492-11496.
106. **Jonas, A.E. y Kaczmarek, L.K.** (1996) *Current Opinion in Neurobiology.* **6**: 318-323.
107. **Jonas, E.A., Knox, R.J., Kaczmarek, L.K., Schwartz, J.H. y Solomon, D.H.** (1996). *J. Neurosci.* **16**: 1645-1658.
108. **Kamb, A.J., Iverson, L.E. y Tanouye, M.A.** (1987). *Cell* **50**: 405-413.
109. **Kamb, A.J., Tseng-Crank, J. y Tanouye, M.A.** (1988). *Neuron.* **1**: 421-430.
110. **Kauppinen, J.K., Moffat, D.G., Mantsch, H.H. y Cameron, D.G.** (1982). *Appl. Opt.* **21**: 1866-1872.
111. **Kavanaugh, M.P., Varnum, M.D., Osborne, P.B., Christie, M.J., Busch, A.E., Adelman, J.P. y North, R.A.** (1991). *J. Biol. Chem.* **266**: 7583-7587.
112. **Kendrew, J.C., Dikerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies, D.R., Phillips, D.C. y Shore, V.C.** (1960). *Nature*. **185**: 422-437.
113. **Khuse, J., Betz, H. y Kirsch, J.** (1995). *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**: 318-323.
114. **Kim, E., Cho, K.O., Rothschild, A. y Sheng, M.** (1996). *Neuron.* **17**: 103-113.

115. **Kim, E., Niethammer, M., Rotsh, A., Jan, N.Y. y Sheng, M.** (1995) *Nature*. **378**: 85-88.
116. **King, D.S., Fields, C.G. y Fields, G.B.** (1990). *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**: 255-266.
117. **Kirsch, E., Drewe, J., Verma, S., Brown, A. y Joho, R.** (1991). *FEBS letts.* **278**: 55-60.
118. **Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Hartmann, H.A., Tagliatela, M., de Biasi, M., Brown, A.M. y Joho, R.H.** (1992a). *Neuron*. **8**: 499-505.
119. **Kirsch, G.E., Drewe, J.A., Tagliatela, M., Joho, R.H., de Biasi, M., Hartmann, H.A., y Brown, A.** (1992b). *Biophys. J.* **62**: 136-144.
120. **Knox, R.J., Quattrochi, E.A., Connor, J.A. y Kaczmarek, L.K.** (1992). *Neuron*. **8**: 883-889.
121. **Koenig, J.L. y Tabb, D.L.** (1980). En *Analytical Applications of FT-IR to Molecular y Biological Systems* (ed. J.R. Durig) pp. 241-255, Reidel Publishing Co. Holland.
122. **Kramer, R.H., Goulding, E. y Siegelbaum, S.A.** (1994). *Neuron* **12**: 655-662.
123. **Kukuljan, M., Labarca, P. y Latorre, R.** (1995). *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **268**: C535-C556.
124. **Lee, C.W.B., Aldrich, R.W. y Gierasch, L.M.** (1993). *Biophys. J.* **61**: 379a (Abstr.)
125. **Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E. Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B. and Schlessinger, J.** (1995). *Nature*. **376**: 737-745.
126. **Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Masacchiom, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B. y Schlessinger, J.** (1995). *Nature*. **376**: 737-745.
127. **Levin, G., Keren, T., Peretz, T., Chikvashvili, D., Thornhill, W.B. y Lotan, I.** (1995). *J. Biol. Chem.* **270**: 14611-14618.
128. **Levitan, I.B.** (1988). *Annu. Rev. Neurosci.* **11**:119-136.
129. **Levitan, I.B.** (1994). *Annu. Rev. Physiol.* **56**: 193-212.
130. **Li, M., Jan, Y.N. y Jan L.Y.** (1992). *Science*. **257**: 1225-1230.
131. **Li, M., West, J.W., Numann, R., Murphy, B.J., Scheuer, T. y Catterall, W.A.** (1993). *Science*. **261**: 1439-1442.
132. **Liman, E.R., Tytgat, J. y Hess, P.** (1992). *Neuron*. **9**: 861-871.
133. **Logothetis, D.E., Movahedi, S., Satler, C., Lindpaintner, K. y Nadal-Grinard, B.** (1992). *Neuron*. **8**: 531-540.
134. **López, G.A., Jan, Y.N. y Jan, L.Y.** (1991). *Neuron*. **7**: 327-336.

135. **López-Barneo, J.** (1991). En Cell Membrane Transport (Yudilevich, D.L. et al. eds.) pp. 215-237, Plenum Press, NY, USA.
136. **López-Barneo, J., Hoshi, T., Heinemann, S.H. y Aldrich, R.W.** (1993). *Recept. Channels*. **1**: 61-71.
137. **Lue, R.A., Marfatia, S.M., Branton, D. y Chishti, A.H.** (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **11**: 9818-9822.
138. **MacCormack, K., Tanouye, M.A., Iverson, L.E., Lin, J.-W., Tamaswami, M., MacCormack, T., Pampanelle, J.T., Mathew, M.K. y Rudy, B.** (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 2931-2935.
139. **MacCormack, T., Vega-Sainz de Miera, E.C. y Rudy, B.** (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5227-5231.
140. **MacKinnon, R.** (1991). *Nature*. **350**: 232-235.
141. **MacKinnon, R. y Miller, C.** (1989). *Science*. **245**: 1382-1385.
142. **MacKinnon, R. y Yellen, G.** (1990). *Science*. **250**: 276-279.
143. **MacKinnon, R., Aldrich, R.W. y Lee, A.W.** (1993). *Science* **262**: 757-559.
144. **MacKinnon, R., Heginbotham, L. y Abramson, T.** (1990). *Neuron* **5**: 767-771.
145. **Mannuzzu, L.M., Moronne, M.M. y Isacoff, E.Y.** (1996). *Science*. **271**: 213-216.
146. **Mantsch, H.H., Moffatt, D.J. y Casal, H.L.** (1988). *J. Mol. Struct.* **173**: 285-298.
147. **Mendelsohn, R. y Mantsch, H.H.** (1986). En Progress in Protein-Lipid Interactions, A. Watts and A. DePont, eds. (Elsevier Science Publisher, B.V.), pp. 103-146.
148. **Michelson, A.A.** (1891). *Phil. Mag.* **31**: 256.
149. **Miyazawa, T. y Blout, E.R.** (1961). *J. Am. Chem. Soc.* **83**: 712-719.
150. **Moffatt, D.J. y Mantsch, H.H.** (1992). *Methods Enzymol.* **210**: 192-200.
151. **Morris, S.J., Bradley, D., Gibson, C.C., Smith, P.D. y Blumenthal, R.** (1988) in *Spectroscopic membrane probes*, (Loew, L.M., Ed) pp. 161-191, CRC Press, Boca Raton, Florida.
152. **Muga, A., Surewicz, W.K., Wong, P.T.T. y Mantsch, H.H.** (1990). *Biochemistry*. **29**: 2925-2930.
153. **Müller, B.M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W.J., Kuhlendahl, S., Fenster, S.D., Lau, L.F., Veh, R.W., Haganir, R.L., Gundelfinger, E.D. y Garner, C.C.** (1996). *Neuron*. **17**: 255-265.
154. **Müller, B.M., Kistner, U., Veh, R.W., Cases-Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E.D. y Garner, C.C.** (1995) *J. Neurosci.* **15**: 2354-2366.

155. **Murrell-Lagnado, R.D. y Aldrich, R.W.** (1993a). *J. Gen. Physiol.* **102**: 949-975.
156. **Murrell-Lagnado, R.D. y Aldrich, R.W.** (1993b). *J. Gen. Physiol.* **102**: 977-1003.
157. **Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kanayo, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Raferty, M.A., Hirose, T., Inayama, S. y Numa, S.** (1984). *Nature.* **312**: 121-127.
158. **Noda, M., Suzuki, H., Numa, S. y Stühmer, W.** (1990). *FEBS lett.* **259**: 216-216.
159. **Papahadjopoulos, D., Moscarello, M., Eylar, E.H. y Isac, T.** (1975). *Biochim. Biophys. Acta* **401**: 317-335.
160. **Papazian, D., Schwarz, T., Tempel, B., Jan, Y.N. y Jan, L.Y.** (1987). *Science.* **237**: 749-753.
161. **Papazian, D.M., Timpe, L.C., Jan, Y.N. y Jan, L.Y.** (1991). *Nature.* **349**: 305-310.
162. **Parcej, D. y Dolly, J.O.** (1989). *Biochem. J.* **257**: 899-903.
163. **Pauling, L., Corey, R.B. y Branson, H.R.** (1951). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **37**: 205-211.
164. **Peled, H. y Shai, Y.** (1993). *Biochemistry* **32**: 7879-7885.
165. **Perez-Reyes, E., Yuan, W., Wei, X. y Bers, D.M.** (1994). *FEBS Lett.* **342**: 119-123.
166. **Planells-Cases R, Ferrer-Montiel AV, Patten CD, Montal M.** (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9422-9426.
167. **Pongs, O., Kecsemethy, N., Müller, K., Krah-Jentgens, I., Baumann, A., Kiltz, H., Canal, I., Llamazares, S. y Ferrus, A.** (1988). *EMBO J.* **7**: 1087-1096.
168. **Powell, J.R., Vasacz, F.M. y Jacobsen, R.J.** (1986). *Appl. Spectrosc.* **40**: 339-344.
169. **Qu, Y., Rogers, J., Tanada, T., Scheuer, T. y Catterall, W.A.** (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 3289-3293.
170. **Rajarithnam, K., Hochman, J. Schindler, M. y Ferguson-Miller, S.** (1989). *Biochemistry* **28**: 3168-3176.
171. **Rapaport, D. y Shai, Y.** (1992). *J. Biol. Chem.* **267**: 6502-6509.
172. **Reddy, G.L. y Nagaraj, R.** (1989). *J. Biol. Chem.* **264**: 16591-16597.
173. **Rehm, H. y Lazdunski, M.** (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 4919-4923.
174. **Renh, H.** (1991). *Eur. J. Biochem.* **202**: 701-713.
175. **Rettig, J., Heinemann, S.H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D.N., Dolly, J.O. y Pongs, O.** (1994) *Nature.* **369**: 289-294.

176. Rettig, J., Wunder, F., Stocker, M., Lichting-Hagen, R., Mstiaux, F., Beckh, S., Kues, W., Pedarzani, P., Schröter, K.H., Ruppertsberg, J.P., Veh, R. y Pongs, O. (1992). *EMBO J.* **11**: 2473-2486.
177. Rohl, C.A., Chakrabarty, A. y Baldwin, R.L. (1996). *Protein Sci.* **5**: 2623-2637.
178. Rothschild, K.J. y Clark, N.A. (1979). *Science.* **204**: 311-312.
179. Rudy, B. (1988). *Neuroscience.* **25**: 729-749.
180. Ruoho, A.E., Rashidbaigi, A. y Roeder, P.E. (1984) in: *Photoaffinity Labeling* (Venter, J.C. and Harrison, L.C. eds.) pp. 119-160, Alan R. Liss, Inc. New York.
181. Ruppertsberg, J.P., Schroter, K.H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S. y Pongs, O. (1990). *Nature.* **345**: 535-537.
182. Sakmann, B. y Neher, E. (1996). *Single channel recording.* Plenum Press, NY, USA.
183. Salkoff, L. y Wyman, R. (1981). *Nature.* **293**: 228-230.
184. Sanchez-Ruiz, J.M. y Martinez-Carrion, M. (1986). *Biochemistry* **25**: 2915-2920.
185. Sathyamoorthy, V. y DasGusta, B.R. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**: 10461-10466.
186. Satin, J., Kyle, J. W., Chen, M., Bell, P., Cribbs, L., Fozzard, H. A. y Rogart, R. B. (1992). *Science.* **256**: 1202-1205.
187. Savitsky, A. y Golay, M.J.E. (1964). *Anal. Chem.* **36**: 1627-1639.
188. Schmidt, R.R. y Betz, H. (1989). *Biochemistry.* **28**: 8346-8350.
189. Schwarz, T., Tempel, B., Papazian, D., Jan, Y. N. y Jan, L.Y. (1988). *Nature.* **331**: 137-142.
190. Scott, V.E., Muniz, Z.M., Sewing, S., Lichtinghegen, R., Parcej, D.N., Pongs, O. y Dolly, J.O. (1994). *Biochemistry.* **33**: 1617-1623.
191. Scott, V.E., Retting, J., Parcej, D.N., Keen, J.N., Findlay, J.B.C., Pongs, O. y Dolly, J.O. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 1637-1641.
192. Selinfreund, R.H. y Blair, L.A. (1994). *Mol. Pharmacol.* **45**: 1215-1220.
193. Sharma, N., D'Arcangelo, G., Kleinklaus, A, Halegoua, S. y Trimmer, J.S. (1993). *J. Cell. Biol.* **123**: 1835-1843.
194. Shen, N.V., Chen, X., Boyer, M.M. y Pfaffinger, P.J. (1993). *Neuron.* **11**: 67-76.
195. Sheng, M. y Kim, E. (1996) *Current Opinion in Neurobiology.* **6**: 602-608.
196. Sheng, M., Tsaur, M.L., Jan, Y.N. y Jan, L.Y. (1992). *Neuron.* **9**: 271-284.
197. Shuster, M.J., Camardo, J.S., Siegelbaum, S.A. y Kandel, E.R. (1985) *Nature.* **313**: 392-395.
198. Sigworth, F.J. (1994). *Q. Rev. Biophys.* **27**: 1-40.

199. **Sönnichsen, F.D., Van Eyk, J.E., Hodges, R.S. y Sykes, B.D.** (1992). *Biochemistry*. **31**: 8790-8798.
200. **Stocker, M., Stühmer, W., Wittka, R., Wang, X., Müller, R., Ferrus, A. y Pongs, O.** (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 8903-8907.
201. **Striessnig, J., Glossmann, H. y Catterall, W.A.** (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9108-9112.
202. **Stühmer, W., Ruppertsberg, J., Schröter, K., Sakmann, B., Stocker, M., Giese, K., Perschke, A. Baumann, A. y Pongs, O.** (1989). *EMBO J.* **8**: 3235-3244.
203. **Sudhof, T.C.** (1995). *Nature*. **375**: 645-653.
204. **Surewicz, W.K. y Mantsch, H.H.** (1988). *Biochem. Biophys. Acta*. **952**: 115-130.
205. **Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. y Chapman, D.** (1993). *Biochemistry*. **32**: 389-394.
206. **Susy, H. y Byler, M.** (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 391-397.
207. **Susy, H. y Byler, M.** (1986). *Meth. Enzym.* **130**: 290-311.
208. **Tagliatalata, M, Drewe, J.A., Kirsch, G.E., de Biasi, M., Hartmann, H.A. y Brown, A.M.** (1993). *Pfluegers Arch.* **423**: 104-112.
209. **Takumi, T., Ohkubo, H. y Nakanishi, S.** (1988). *Science*. **242**: 1042-1045.
210. **Tejedor, F.J., Bokhari, A., Rogero, O., Goccyca, M., Zhang, J., Kim, E., Sheng, M. y Budnik, V.** (1997). *J. Neurosci.* **17**: 152-159.
211. **Tempel, B., Jan, Y.N. y Jan, L.Y.** (1988). *Nature*. **332**: 837-839.
212. **Terlau, H., Heinemann, S.H., Stühmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K. y Numa, S.** (1991). *FEBS lett.* **293**: 93-96.
213. **Timpe, L., Jan, Y.N. y Jan, L.Y.** (1988). *Neuron*. **1**: 659-667.
214. **Timpe, L., Schwarz, T., Tempel, B., Papazian, D., Jan, Y.N. y Jan, L.Y.** (1988). *Nature*. **331**: 137-142.
215. **Timpe, L.C. y Fantl, W.J.** (1994). *J. Neurosci.* **14**: 1195-1201.
216. **Toro, L., Ottolia, L., Stefani, E. y Latorre, R.** (1994). *Biochemistry* **33**: 7220-7228.
217. **Toro, L., Stefani, E. y Latorre, R.** (1992). *Neuron*. **9**: 237-245.
218. **Tytgat, J. y Hess, P.** (1992). *Nature*. **359**: 420-423.
219. **Valpuesta, J.M., Goñi, F.M., Alonso, A., Arrondo, J.L.R. y Macarulla, J. M.** (1988). *Biochem. Biophys. Acta*. **942**: 341-352.
220. **Villar, M.T., Artigues, A., Ferragut, J.A. y Gonzalez-Ros, J.M.** (1988). *Biochim. Biophys. Acta* **938**: 35-43.

221. **Wei, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M. y Salkoff, L.** (1990). *Science*. **248**: 599-603.
222. **West, J.W., Numann, R., Murphy, B.J., Scheuer, T. y Catterall, W.A.** (1991). *Science*. **254**: 866-8
223. **Wilson, G.G., O'Neill, C.A., Sivaprasadarao, A., Findlay, J.B. y Wray, D.** (1994). *Pflugers Arch*. **428**: 186-193.
224. **Wüthrich, K.** (1989). *Science* **243**: 45-50.
225. **Yellen, G., Jurman, M.E., Abransom, T. y MacKinnon, R.** (1991). *Science* **251**: 939-942.
226. **Yokoyama, S., Imoto, K., Kawamura, T., Higashida, H., Iwabe, N., Miyata, T. y Numa, S.** (1989). *FEBS letts*. **259**: 37-42.
227. **Yool, A.J. y Schwarz, T.L.** (1991). *Nature*. **349**: 700-704.
228. **Zagotta, W.N., Hoshi, T. y Aldrich, R.W.** (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7243-7247.
229. **Zagotta, W.N., Hoshi, T. y Aldrich, R.W.** (1990) *Science*. **250**: 568-571.
230. **Zhang, Y.-P., Lewis, R.N.A.H., Hodges, R.S. y McElhaney, R.N.** (1992). *Biochemistry* **31**: 11572-11578.

11. Apéndices

11.2. ANÁLISIS MATEMÁTICO DETALLADO DEL CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN EN LOS EXPERIMENTOS DE UNIÓN DE PEPTIDO-NBD A VESÍCULAS LIPÍDICAS.

Bibliografía: **Gazit, E. y Shai, Y.** (1993). *Biochemistry*. **32**: 12363-12371.

Se recoge como ejemplo los datos reales de uno de los experimentos de unión del péptido **ShB-21C-NBD** a vesículas unilamelares pequeñas de **PA**.

A alicuotas de péptido **ShB-21C-NBD** de concentración 0.1 μM se le añaden vesículas unilamelares pequeñas (SUV) de **PA** para conseguir distintas relaciones lípido-péptido y se mide la intensidad de fluorescencia inmediatamente después de la mezcla. La longitud de onda de excitación es de 470 nm y la de emisión de 530 nm. Se corrige la fluorescencia de la mezcla **ShB-21C-NBD/PA** restando la dispersión de la luz producida por la mezcla **ShB-21C/PA**. Estos datos iniciales se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1: intensidades de fluorescencia vs relación molar lípido/péptido

PA/péptido	IF _{530nm} de ShB-21C-NBD---PA	IF _{530nm} de ShB-21C--PA	IF _{530nm}
0,00	4,0	0,8	3,2
1,38	5,63	0,81	4,82
2,77	6,8	0,8	6,0
5,55	8,3	0,9	7,4
19,45	11,5	1,0	10,5
33,36	13,3	1,1	12,2
47,26	14,3	1,2	13,1
75,08	15,4	1,2	14,2
103,99	16,0	1,2	14,8
172,40	17,3	1,3	16,0
311,60	19,0	1,4	17,6
450,94	20,0	1,4	18,6
729,63	21,3	1,45	19,8
1426,21	22,7	1,6	21,1
2061,63	23,4	1,7	21,7
3516,40	24,0	2,0	22,0
6304,37	24,8	2,4	22,4
11878,33	24,5	3,2	21,3

La representación de estos datos se recoge en la **Fig. 1**

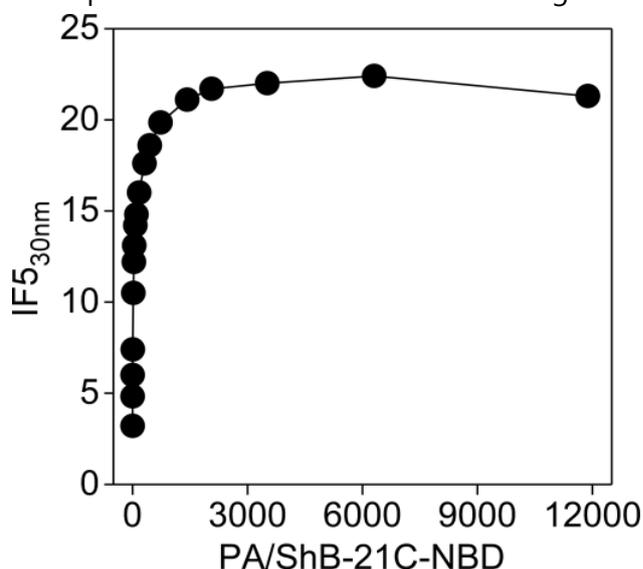


Fig. 1: Curva de unión del péptido ShB-21C-NBD a SUV de PA

Las constantes de unión se analizan como un equilibrio de partición de acuerdo con la ecuación:

$$X_b = K_p \cdot C_f$$

donde X_b se define como la relación molar del péptido unido (C_b) por lípido total (C_L), K_p es el coeficiente de partición, y C_f representa la concentración de péptido libre (no unido) en el equilibrio. Para calcular X_b es necesario conocer primero f_b (es decir, la fracción del péptido unido a membrana), que se calcula utilizando la ecuación:

$$f_b = \frac{(F - F_0)}{(F_\infty - F_0)}$$

en la que F_∞ (la señal de fluorescencia que se obtendría si todo el péptido se une al lípido), que podría calcularse ajustando los datos los datos de la Fig. 1 a una ecuación hiperbólica similar a la que explica la cinética michaeliana o extrapolando a partir de la representación doble inversa de F (intensidad de la fluorescencia observada, es decir, IF_{530nm} recogido en la Tabla 1) y de la C_L (concentración total de lípido); equivalente a la representación de Lineweaver-Burk.

El cálculo de F_∞ se hará en función de los datos recogidos en la Tabla 2:

Tabla 2: Datos para la representación de dobles inversos.

$F = IF_{530nm}$	C_L	$1/F$	$1/C_L$
3,2	0,0000	0,3125	$+\infty$
4,82	1,2470e-7	0,2075	8019246,19
6,0	2,4870e-7	0,1667	4020908,72
7,4	4,9500e-7	0,1351	2020202,02
10,5	1,7295e-6	0,0952	578201,79
12,2	2,9580e-6	0,0820	338066,26
13,1	4,1806e-6	0,0763	239200,11
14,2	6,6074e-6	0,0704	151345,46
14,8	9,1090e-6	0,0676	109781,53
16,0	1,4918e-5	0,0625	67033,11
17,6	2,6901e-5	0,0568	37173,33
18,6	3,8835e-5	0,0538	25749,96
19,85	6,2537e-5	0,0504	15990,53
21,1	1,2080e-4	0,0474	8278,14
21,7	1,7260e-4	0,0461	5793,74
22,0	2,8768e-4	0,0455	3476,08
22,4	4,9368e-4	0,0446	2025,60
21,3	8,5524e-4	0,0469	1169,26

Teniendo que para los valores pequeños de C_L , pequeños errores de F conducen a grandes errores de $1/F$, lo que supondría grandes errores de F_∞ , despreciamos los valores más pequeños de la Tabla 2. El valor de la ordenada en el origen de la ecuación de la recta a la que se ajustan estos puntos será el inverso de F_∞ .

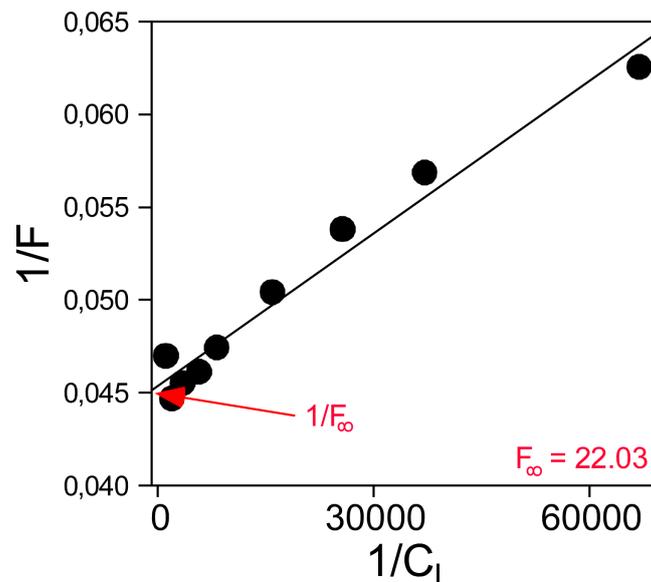


Fig. 2: Representación de dobles inversos para calcular F_{∞} .

Conociendo F_{∞} podremos calcular la fracción del péptido unido a membrana (f_b):

$$f_b = \frac{(F - 3.2)}{(22.03 - 3.2)}$$

Los datos obtenidos para f_b aparecen en la Tabla 3. En ella también aparecen los datos de concentración de péptido total (C_t) (corregidos para el volumen ligeramente distinto en cada relación lípido-péptido). Multiplicando f_b por la concentración de péptido total obtenemos la concentración de péptido unido (C_b). La concentración de péptido libre (C_f) = (C_t)-(C_b). Asumiendo que los péptidos se unen sólo a la hemicapa externa de los liposomas (60% del lípido total) debemos corregir el valor de X_b como:

$$X_b^* = X_b / 0,6$$

por lo que la ecuación de partición se convierte en:

$$X_b^* = K_p^* \cdot C_f$$

En la **Tabla 3** se recogen todos estos parámetros para el ejemplo elegido:

f_b	C_t	$C_b = f_b \times C_t$	$C_f = C_t - C_b$	$C_L \times 0,6$	$X_b^* = C_b / C_L \times 0,6$
0,0000	9,0000e-8	0,0000	9,0000e-8	0,0000	---
0,0861	8,9770e-8	7,7248e-9	8,2045e-8	7,4820e-8	0,1032
0,1487	8,9550e-8	1,3319e-8	7,6231e-8	1,4922e-7	0,0893
0,2231	8,9100e-8	1,9878e-8	6,9222e-8	2,9700e-7	0,0669
0,3878	8,8880e-8	3,4464e-8	5,4416e-8	1,0377e-6	0,0332
0,4781	8,8670e-8	4,2390e-8	4,6280e-8	1,7748e-6	0,0239
0,5259	8,8450e-8	4,6513e-8	4,1937e-8	2,5084e-6	0,0185
0,5843	8,8000e-8	5,1418e-8	3,6582e-8	3,9644e-6	0,0130
0,6162	8,7590e-8	5,3970e-8	3,3620e-8	5,4654e-6	9,8749e-3
0,6799	8,6530e-8	5,8833e-8	2,7697e-8	8,9508e-6	6,5729e-3
0,7649	8,6330e-8	6,6034e-8	2,0296e-8	1,6141e-5	4,0912e-3
0,8180	8,6120e-8	7,0448e-8	1,5672e-8	2,3301e-5	3,0234e-3

0,8844	8,5710e-8	7,5803e-8	9,9068e-9	3,7522e-5	2,0202e-3
0,9508	8,4700e-8	8,0534e-8	4,1662e-9	7,2480e-5	1,1111e-3
0,9827	8,3720e-8	8,2270e-8	1,4497e-9	1,0356e-4	7,9442e-4
0,9986	8,1810e-8	8,1697e-8	1,1299e-10	1,7261e-4	4,7331e-4
1,0199	7,8260e-8	7,9815e-8	-1,5547e-9	2,9621e-4	2,6945e-4
0,9614	7,2000e-8	6,9223e-8	2,7766e-9	5,1314e-4	1,3490e-4

La representación X_b^* versus C_f es lo que comúnmente se conoce como isoterma de unión, y que queda representado en la **Fig. 3**.

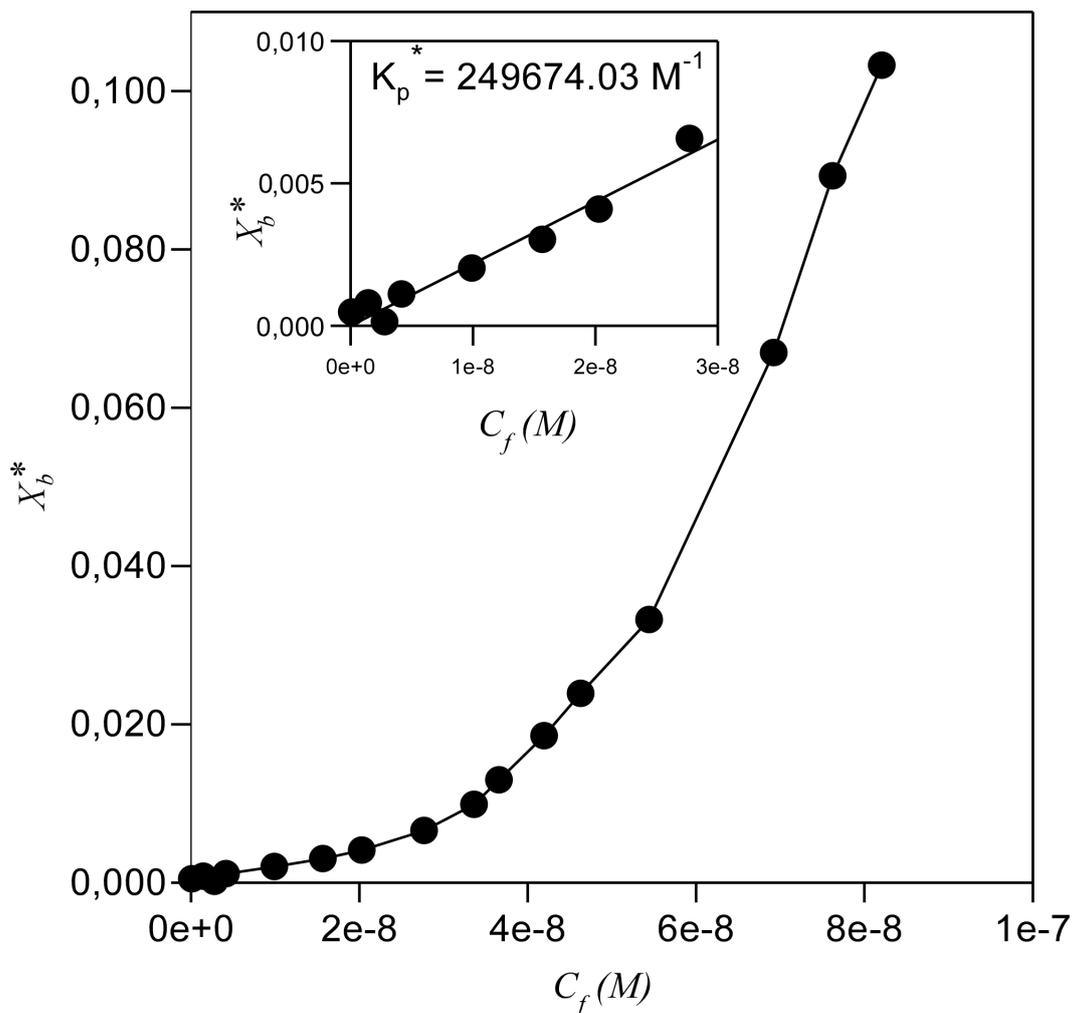


Fig. 3. representación X_b^* versus C_f : isoterma de unión

El tramo inicial de la isoterma de unión se puede ajustar a una recta que pase por el origen, coincide precisamente con el tramo final o "plato" de la curva de unión (**Fig. 1**). La pendiente de esta recta será K_p^* que para el ejemplo tomado tiene un valor de $249.674,03 M^{-1}$.