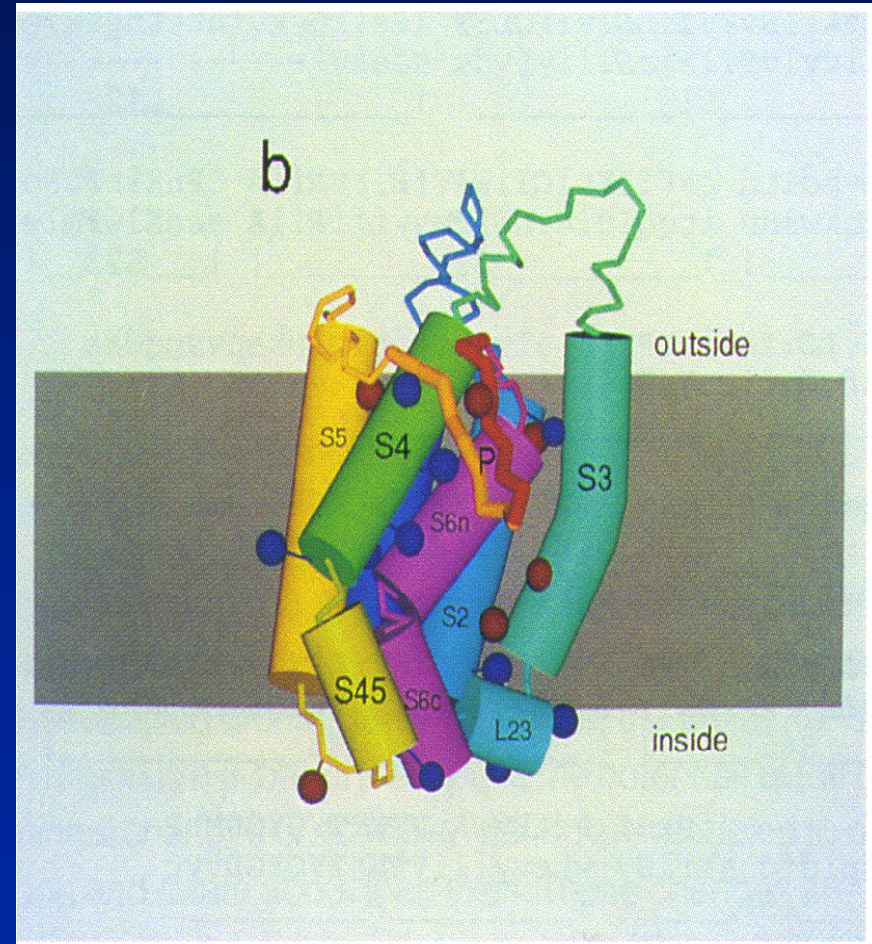
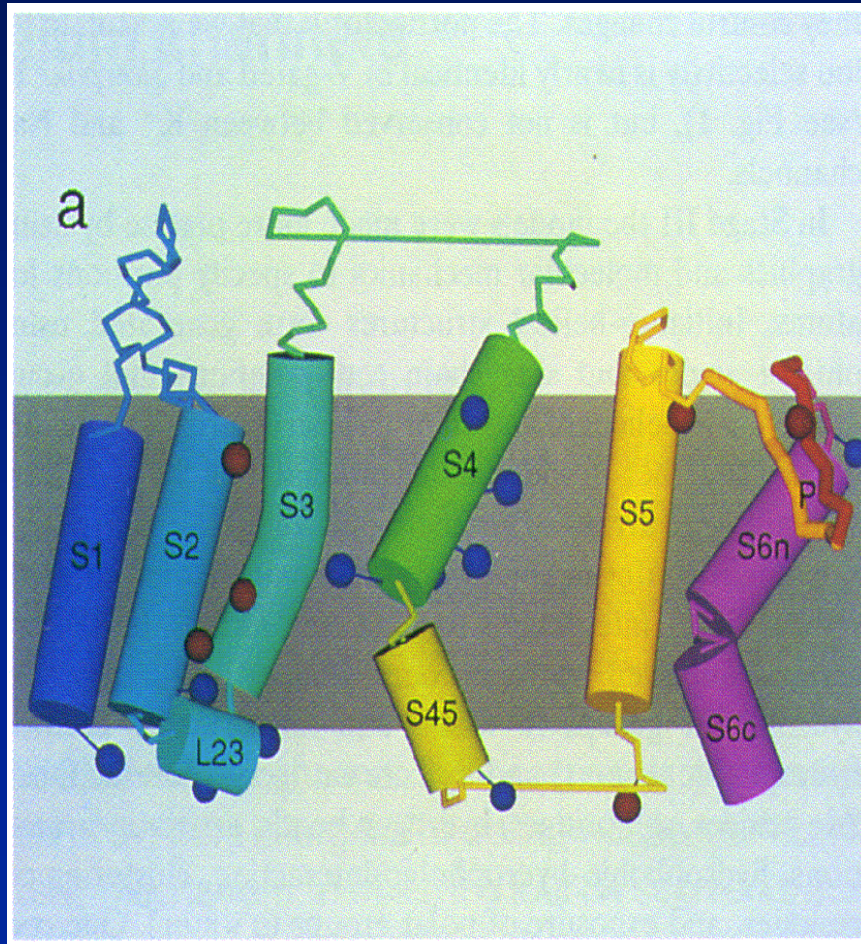


**Estudios estructurales de los fragmentos
amino terminal de los canales de potasio
tipo *Shaker B* nativo (ShB)
y mutado (ShBL7E)**

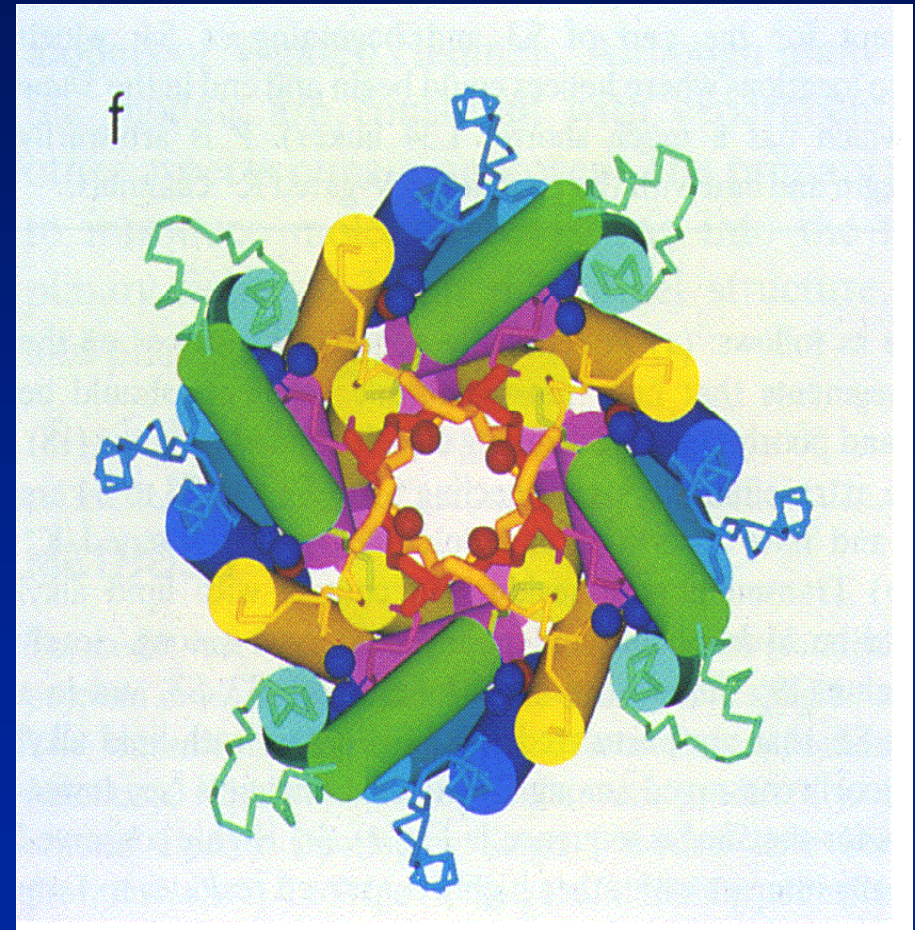
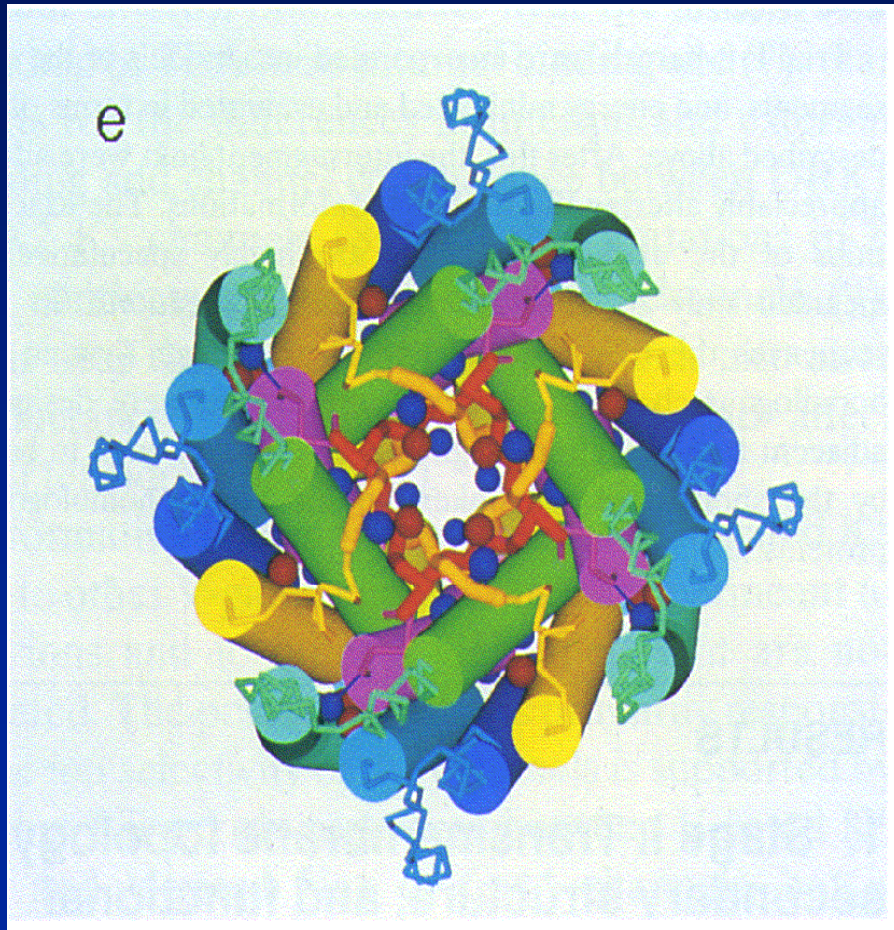


Centro de Biología Molecular y Celular

Posible topología de los segmentos transmembrana de cada una de las subunidades de un canal de K^+ tipo *Shaker*.



Un modelo estructural de los canales de potasio dependientes de voltaje



OBJETIVOS

- 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.

Fig. 1: Espectros de dicroísmo circular de los péptidos ShB (A) y ShBL7E (B) tomados en H₂O (1), TFE (7) y en mezclas H₂O/ TFE.

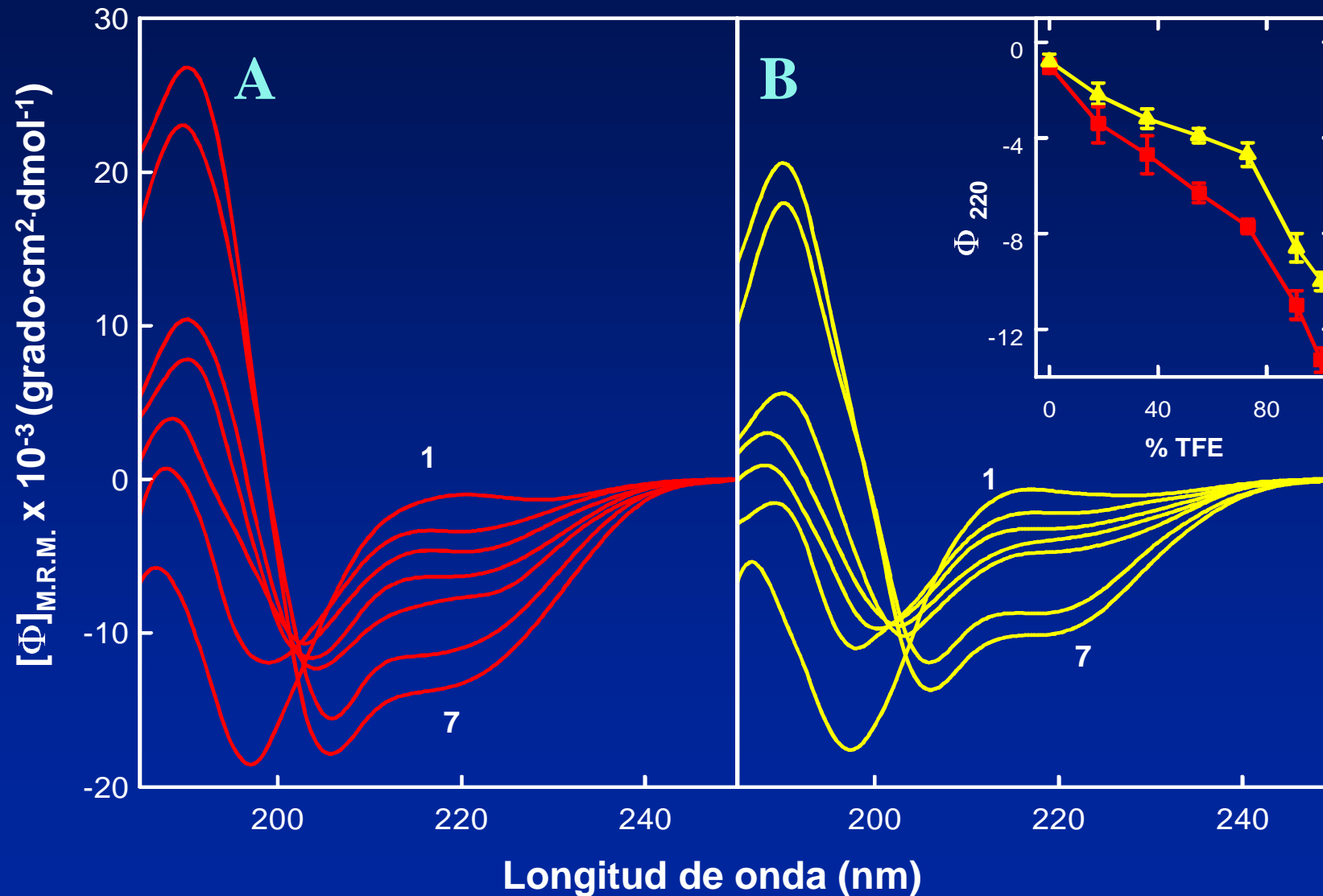


Fig. 2: Espectros de FTIR de los péptidos ShB y ShBL7E tomados en distintos tampones acuosos: efecto de la fuerza iónica (A) y bandas componentes (B).

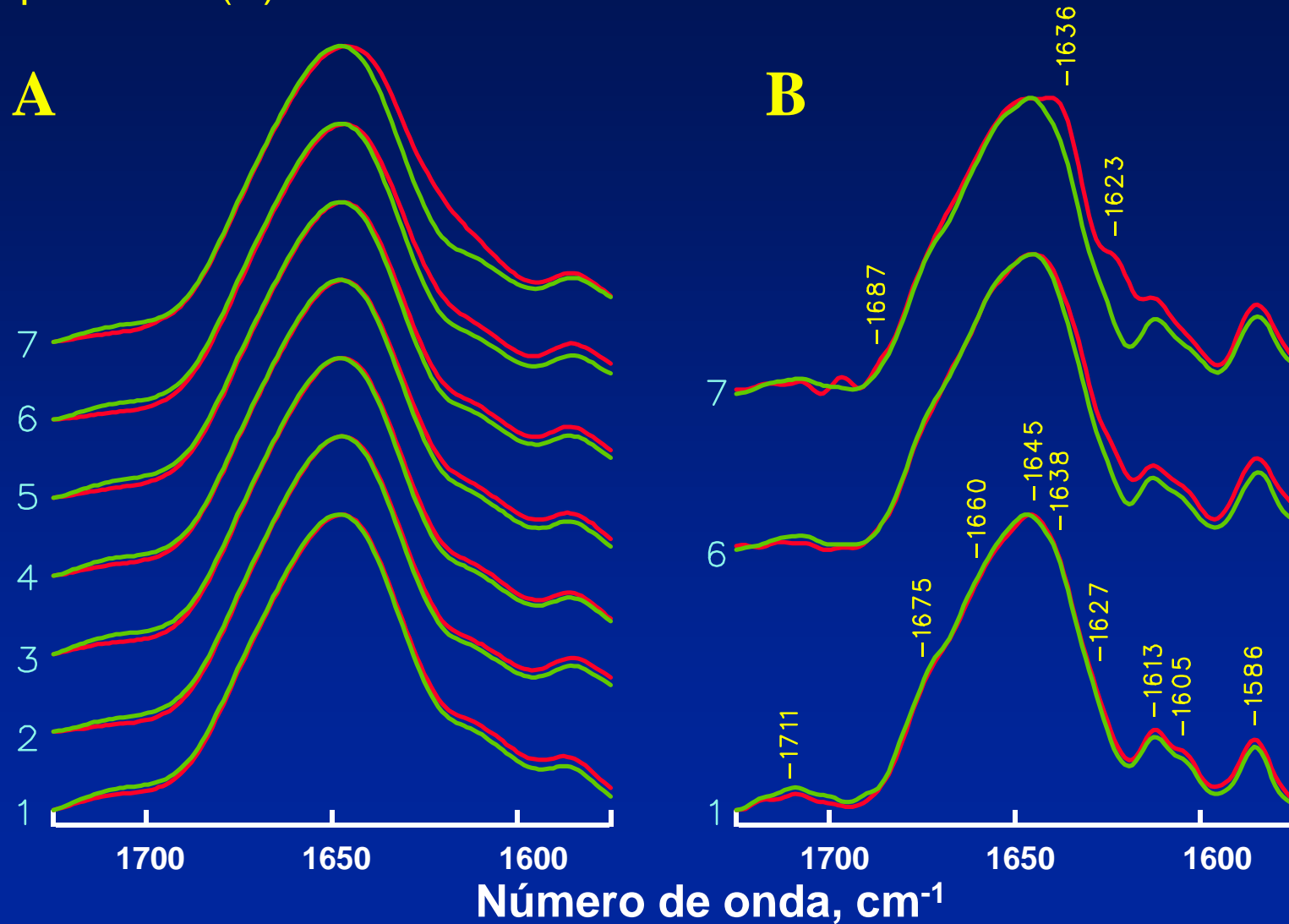


Fig. 3: Espectros de FTIR originales (A) y desconvueltos (B) de los péptidos ShB y ShBL7E tomados en distintos tampones acuosos: efecto del pD.

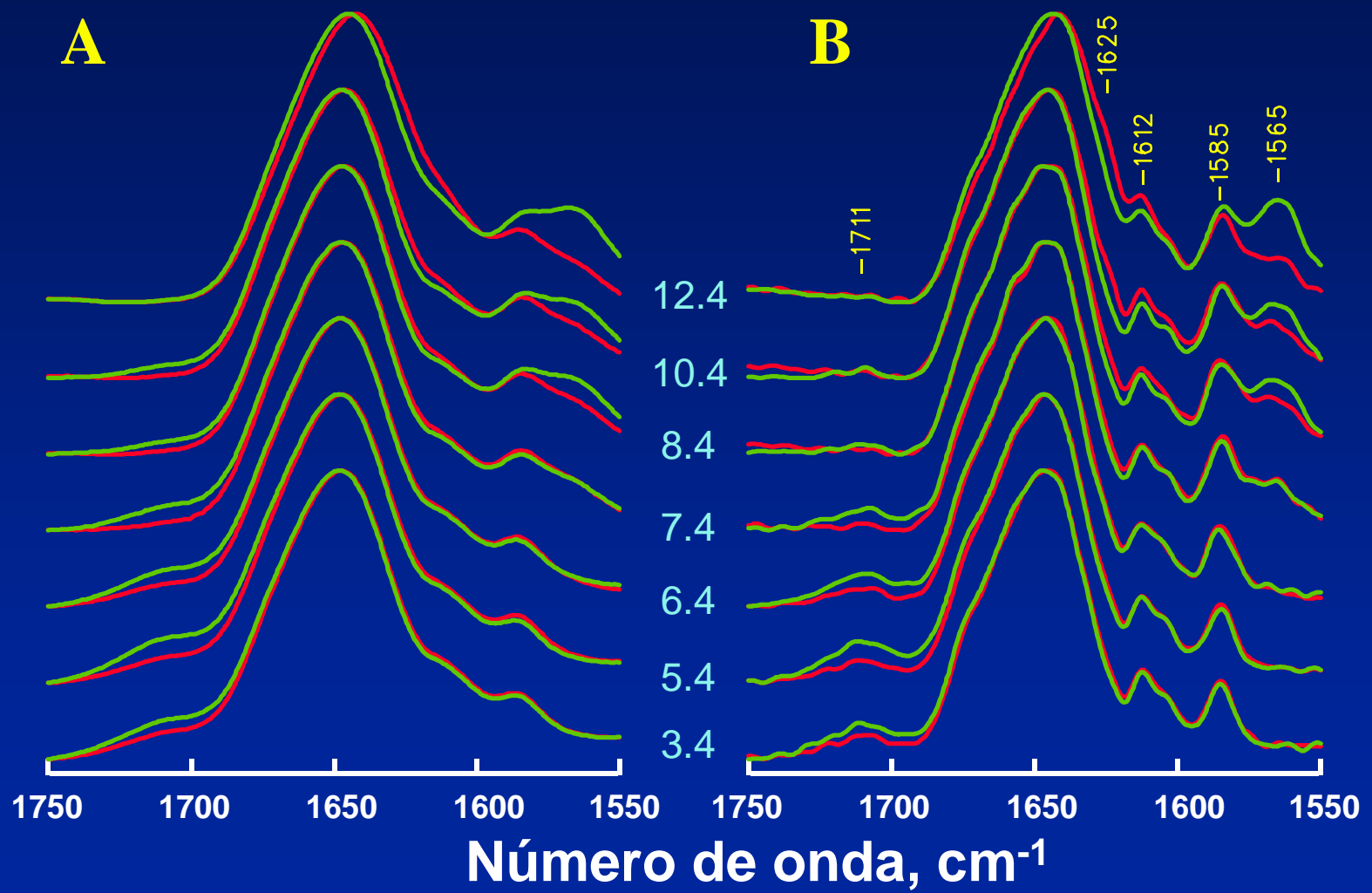
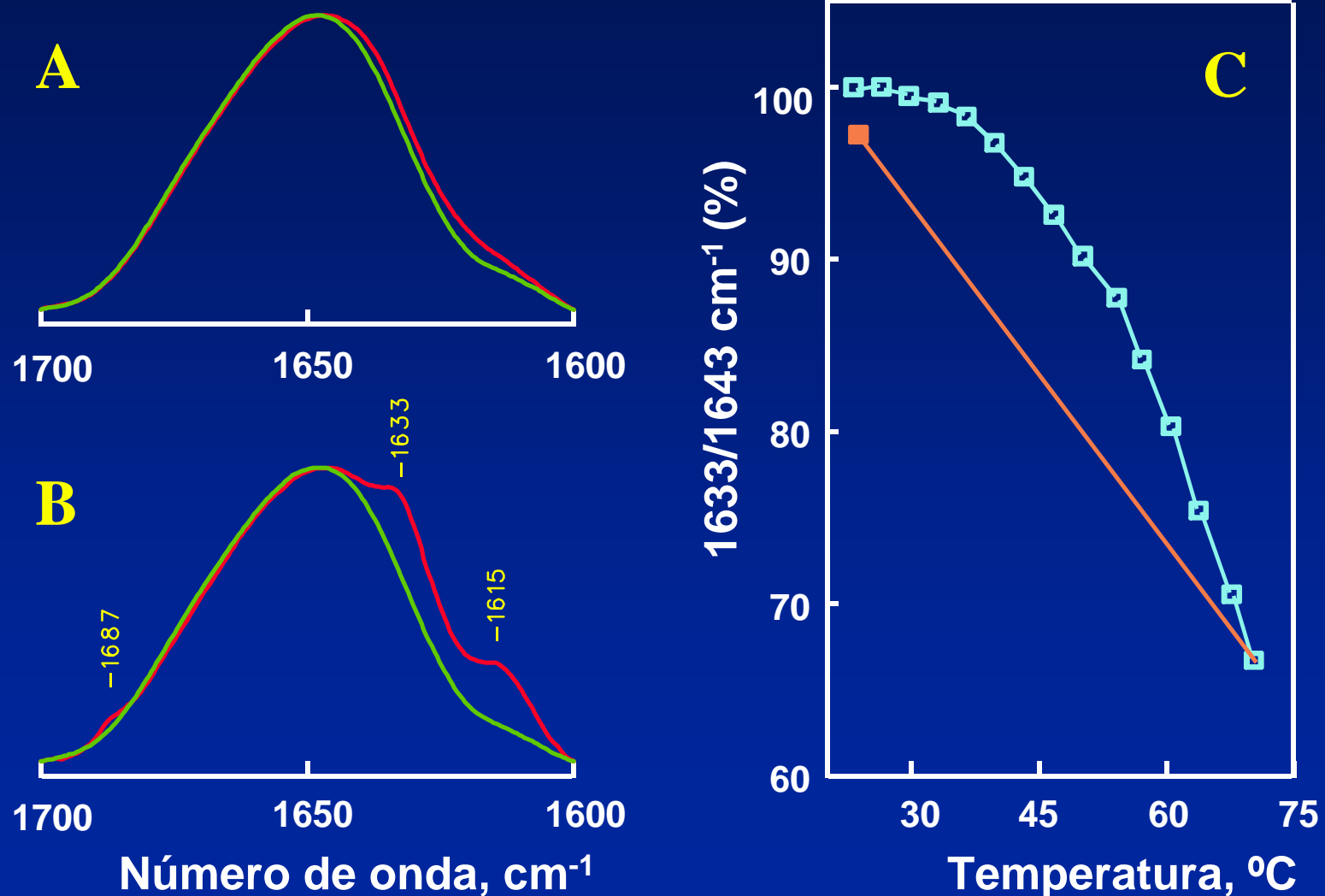


Fig. 4: Efecto del colato 5 mM (A) y 20 mM (B) sobre la banda amida I del espectro de FTIR de los péptidos ShB y ShBL7E. ShB presenta componentes de estructura β , muy estables a la temperatura (C).



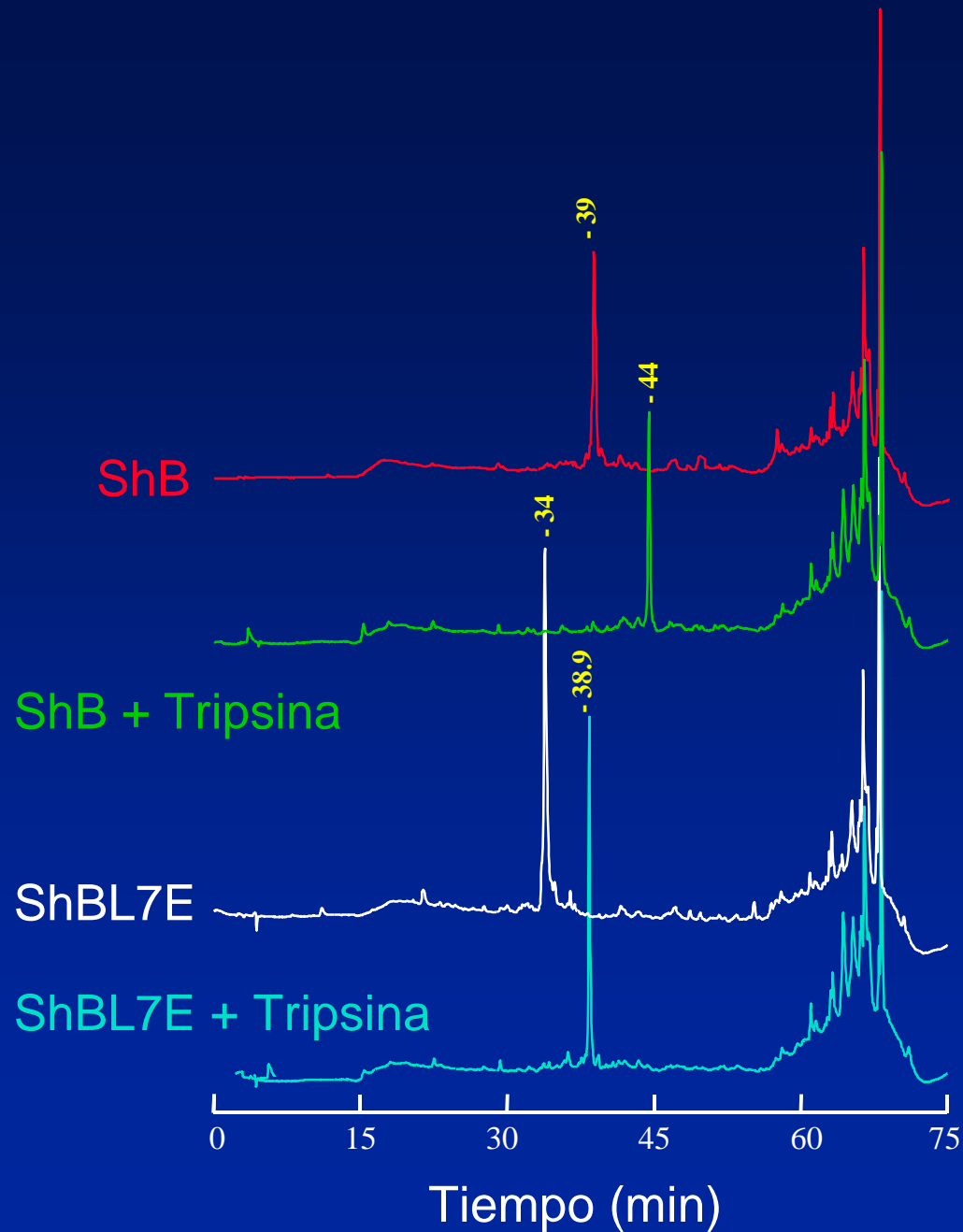
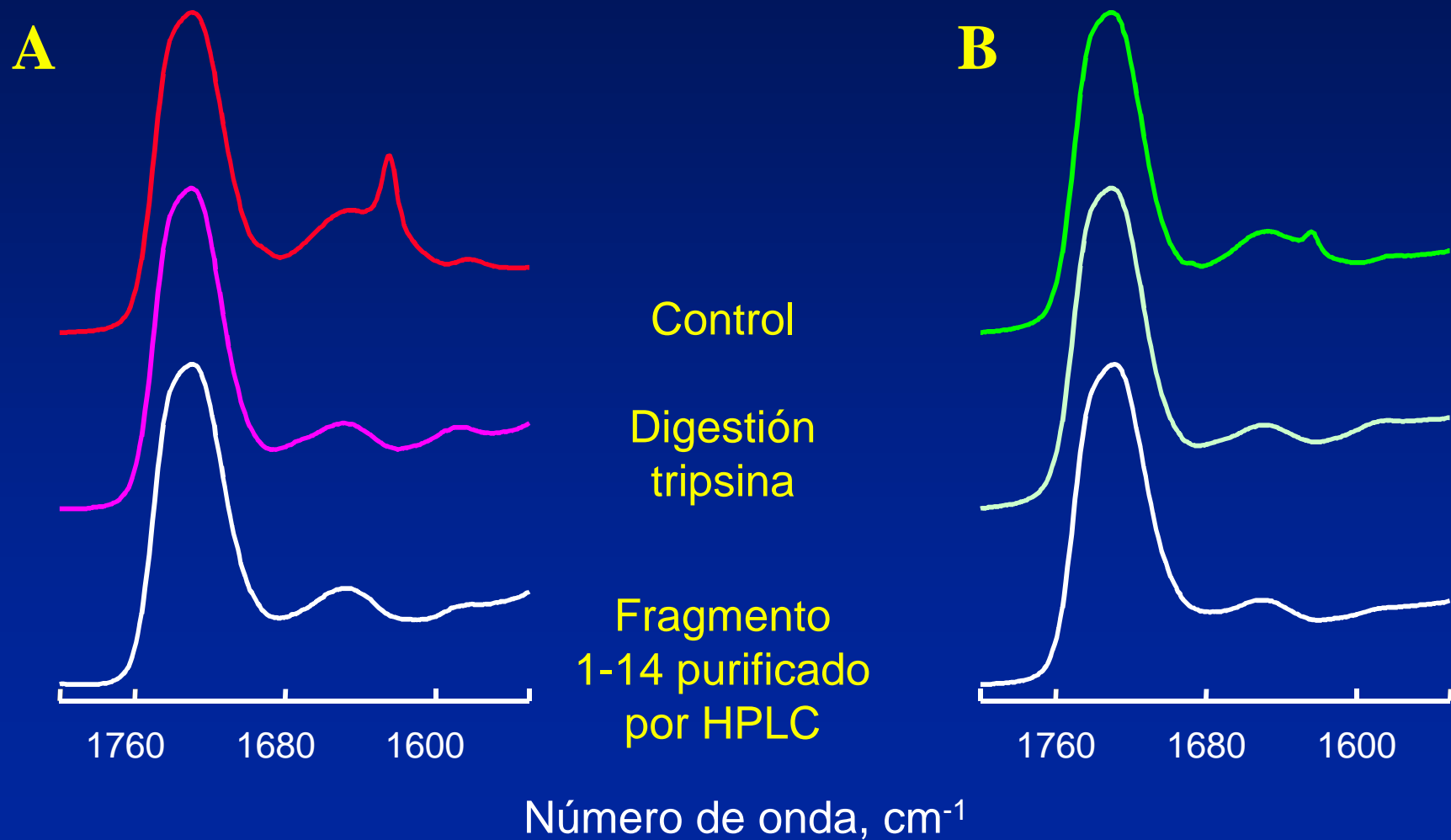


Fig. 5: Cromatogramas de HPLC de los péptidos ShB y ShBL7E y los fragmentos resultantes de la hidrólisis con tripsina de estos.

Fig. 6: Efecto de la tripsina sobre la banda amida I del espectro de FTIR de los péptidos ShB (A) y ShBL7E (B) en presencia de vesículas de PG: pérdida de los componentes de estructura β .



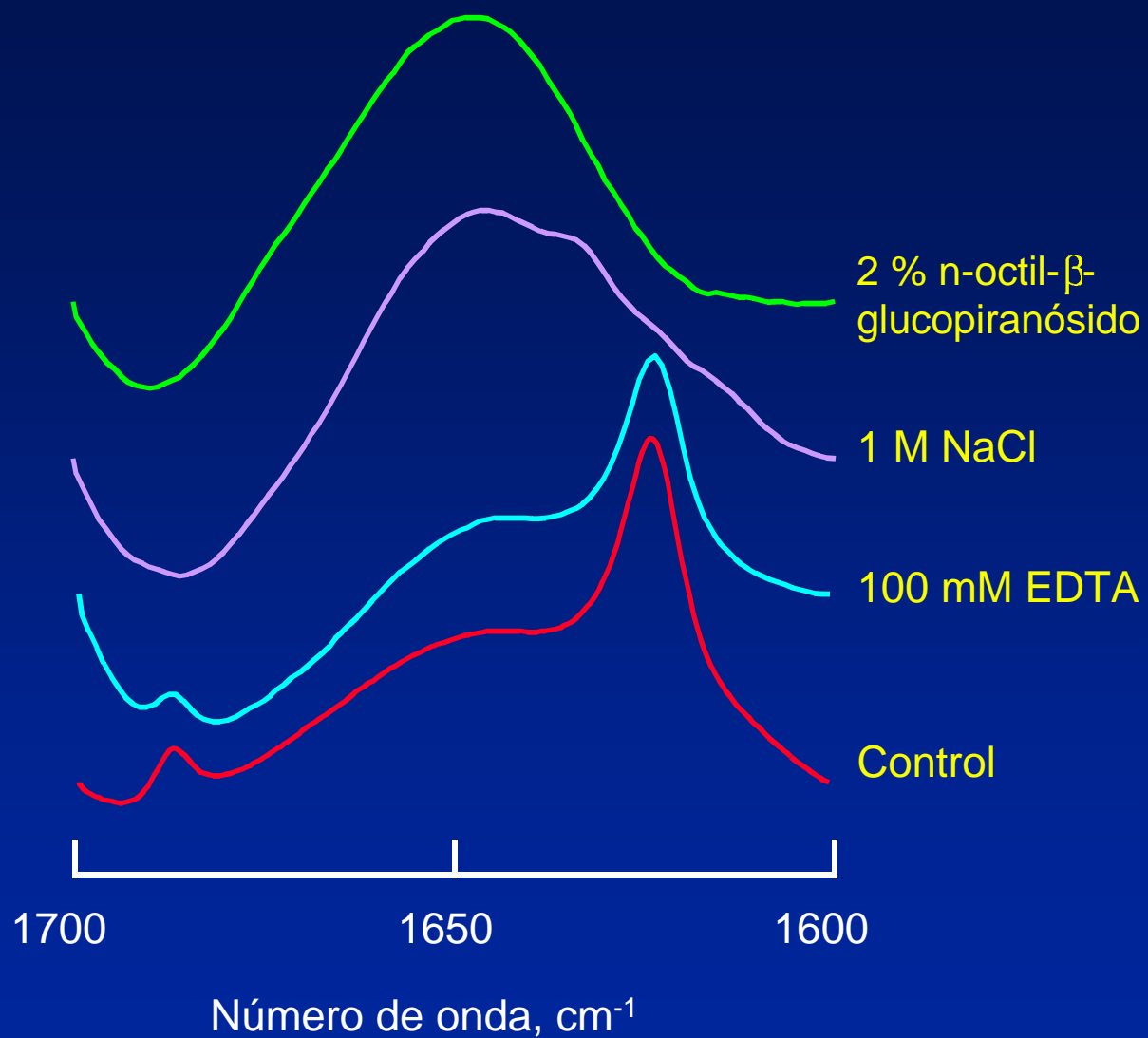


Fig. 7: Banda amida I del espectro de FTIR del péptido ShB en presencia de vesículas de PG en distintas situaciones experimentales: gran estabilidad de los componentes de estructura β.

Fig. 8: Banda amida I del espectro de FTIR de los péptidos **ShB** y **ShBL7E** en presencia de liposomas: sólo **ShB** adopta estructura β en presencia de fosfolípidos aniónicos.

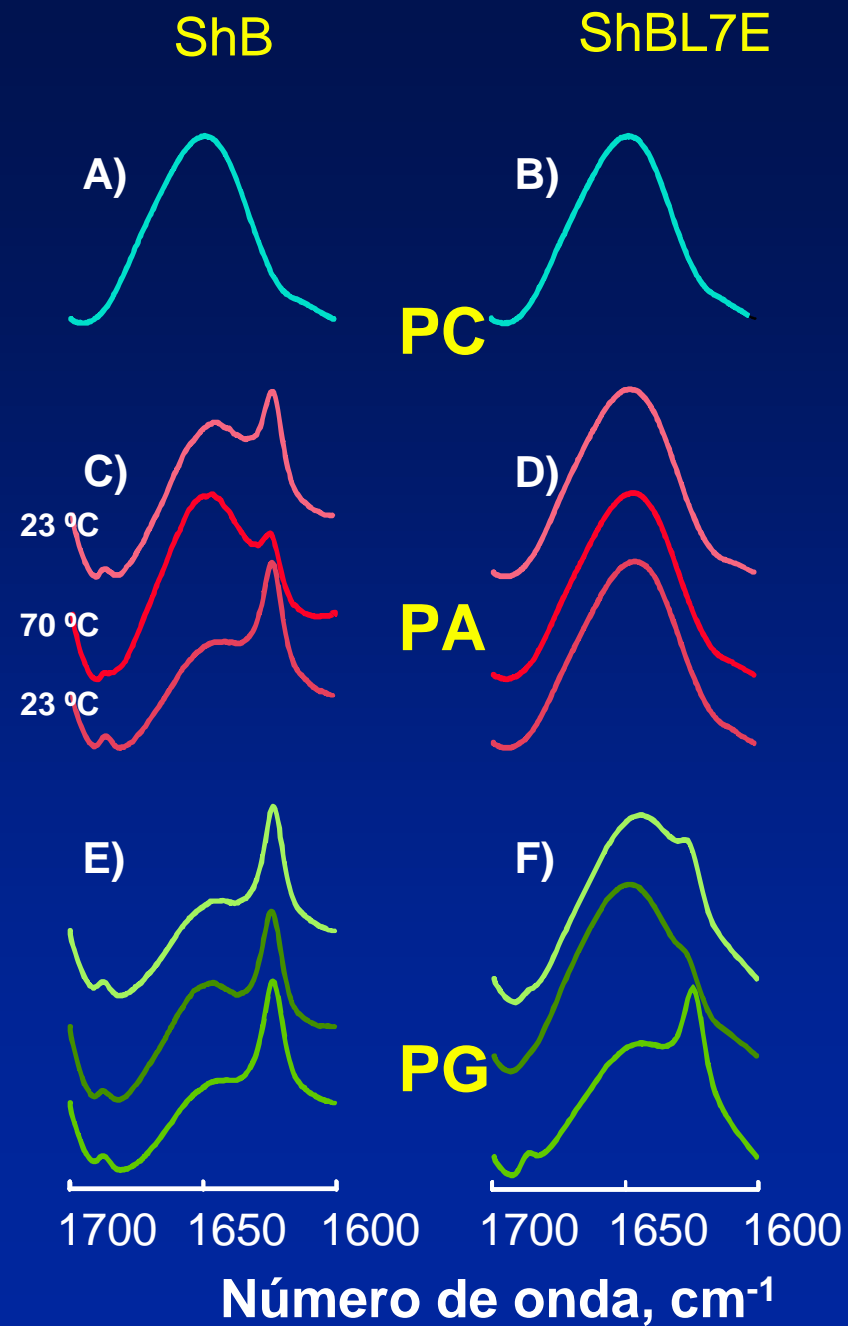
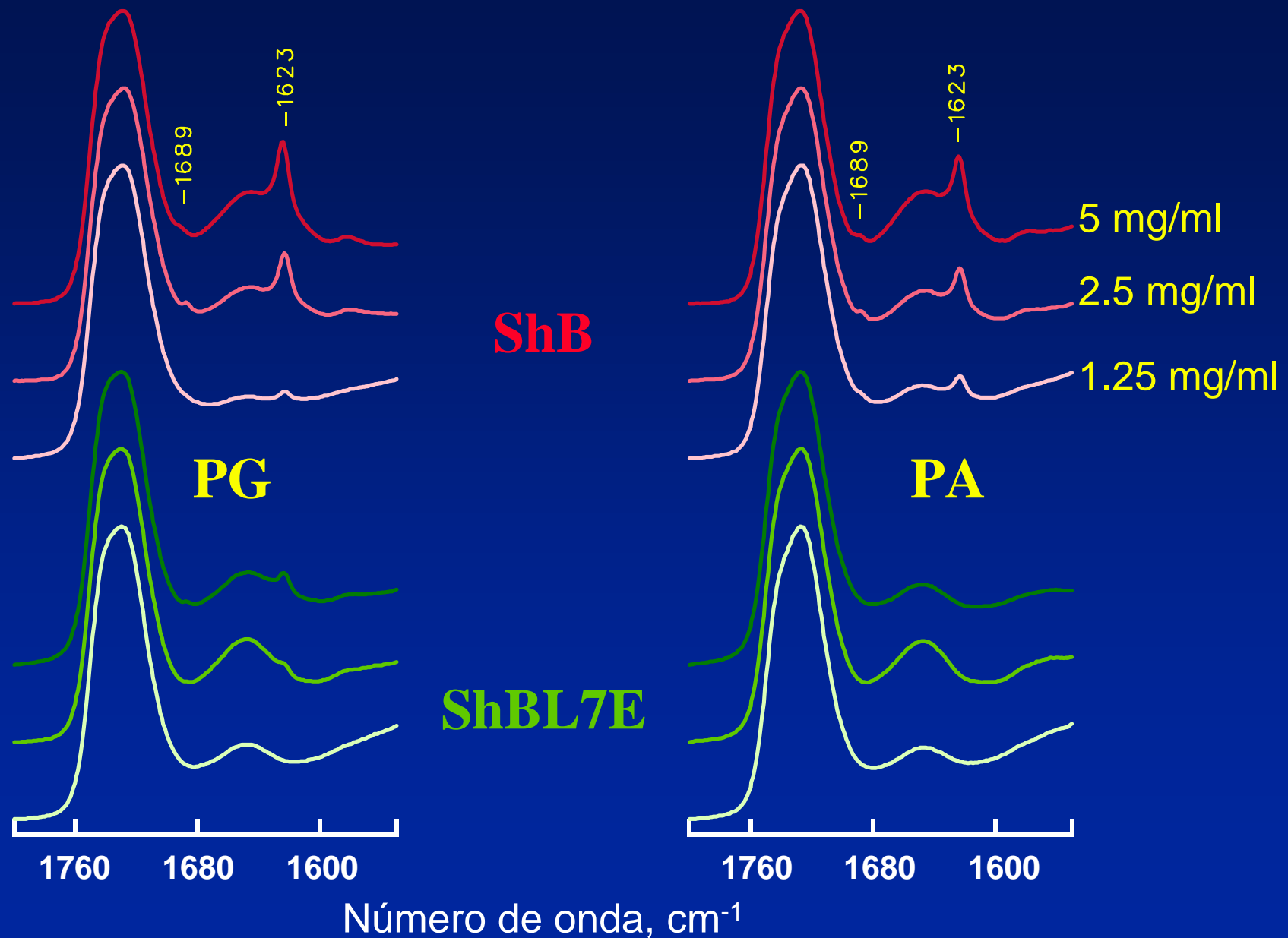


Fig. 9: El péptido ShB adopta estructura β en presencia de fosfolípidos aniónicos de forma independiente a su concentración.



ShB

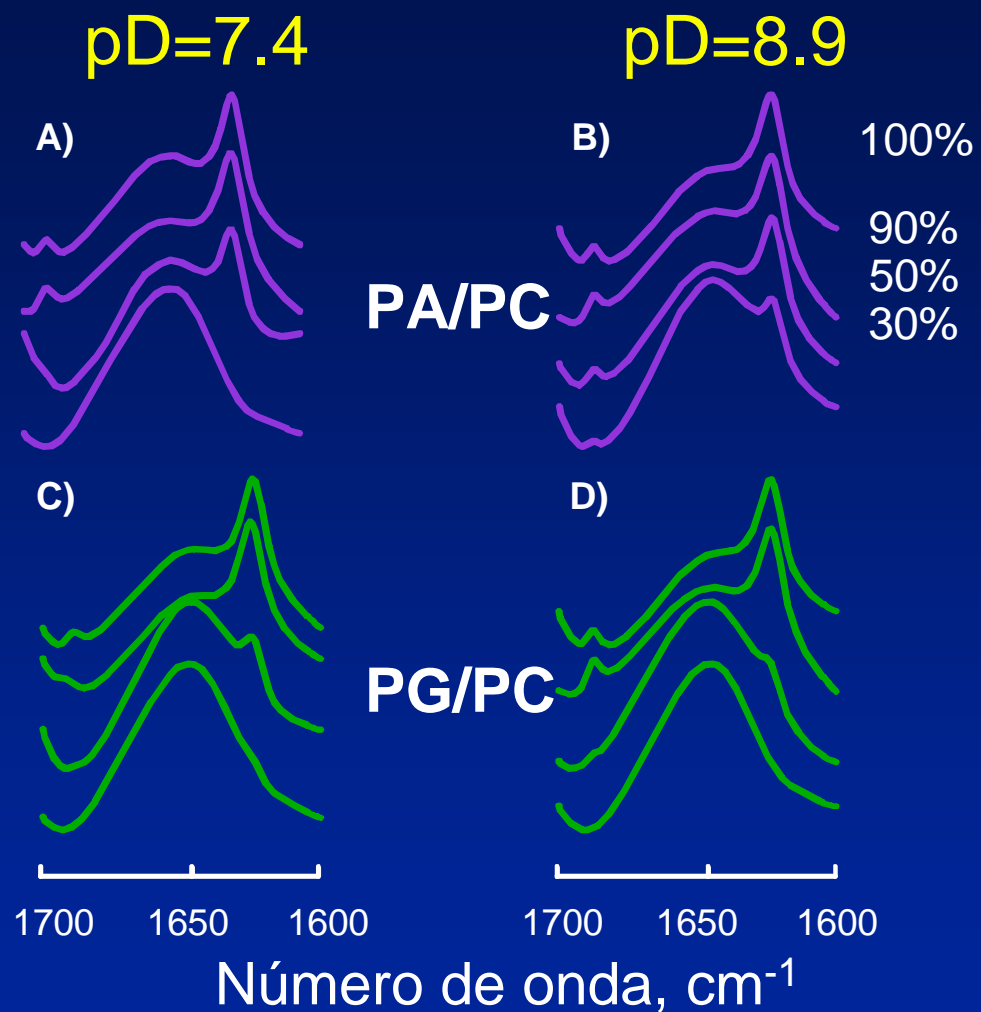


Fig. 10: La adopción de estructura β requiere una gran densidad de carga negativa superficial.

ShBL7E

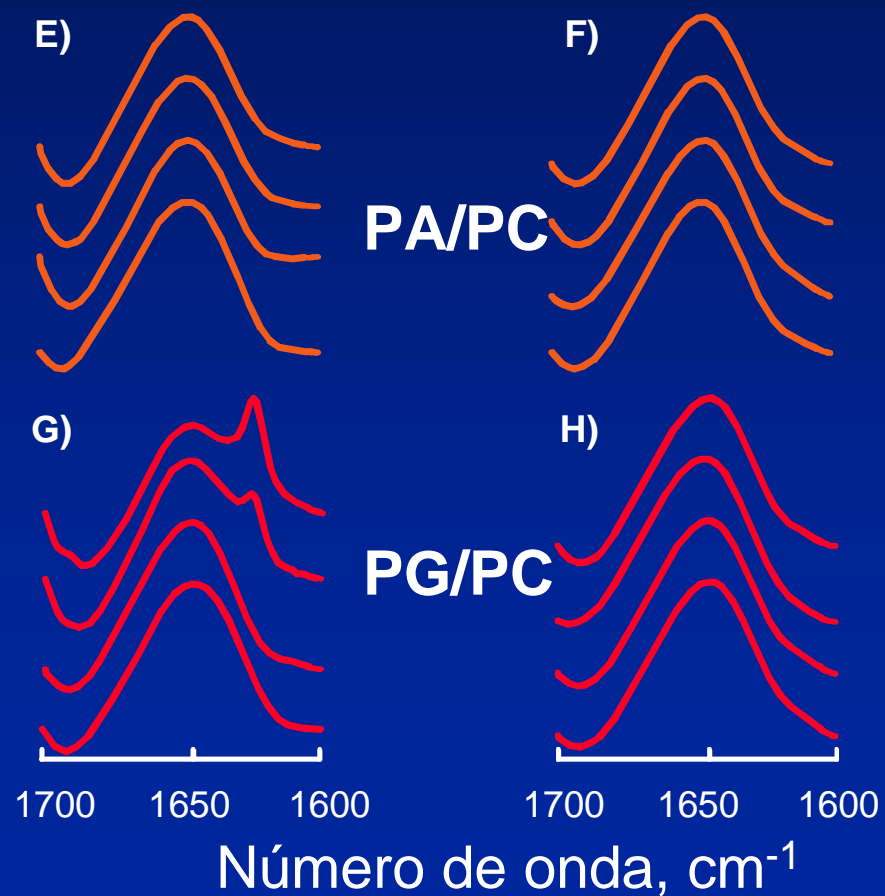


Fig. 11: La eliminación por ultracentrifugación del péptido ShB que no se une a los liposomas supone la disminución del componente de estructura no ordenada en el espectro de FTIR.

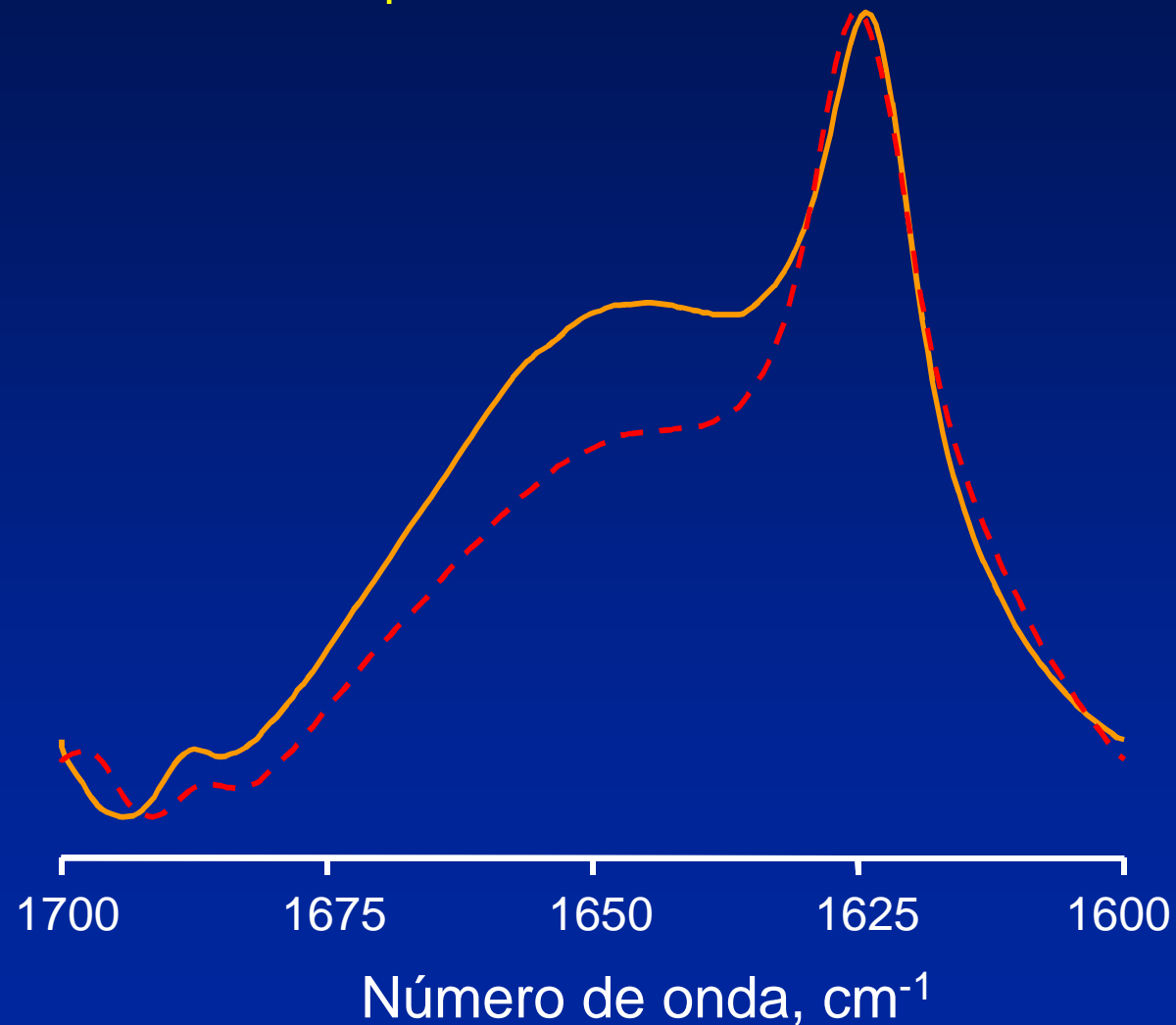


Fig. 12: La adopción de estructura β por parte del péptido ShB en liposomas de DMPG (A) y DMPA (B) ocurre a temperatura superior a la de transición de fase gel a líquido cristalino, lo que sugiere su inserción en el dominio hidrofóbico de la membrana, facilitada por el aumento de fluidez de esta.

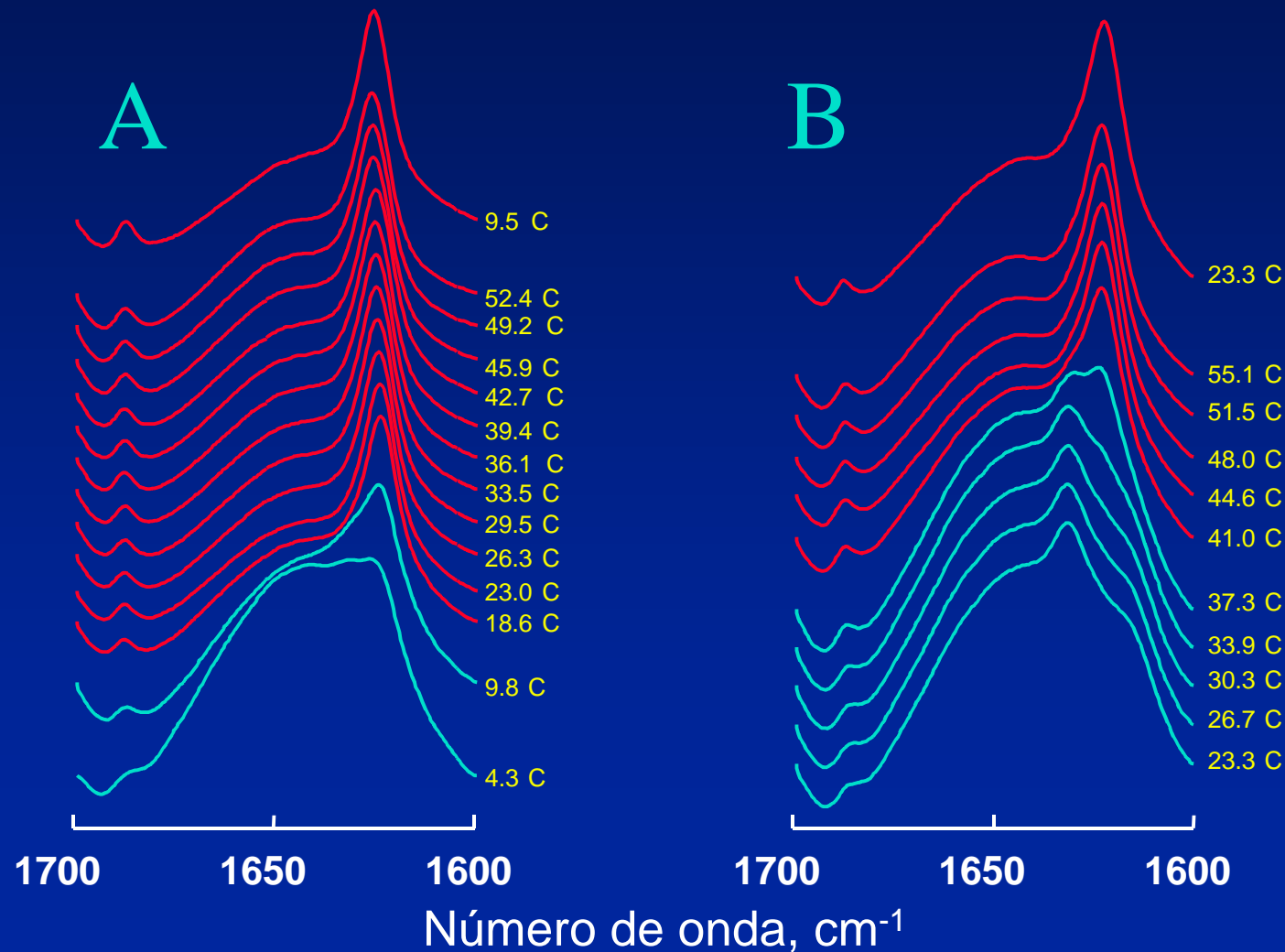


Tabla I: Máximos de emisión de fluorescencia (λ_{\max}) y coeficiente de partición superficial que presentan los péptidos marcados con NBD en presencia de vesículas de fosfolípido.

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-NDB	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

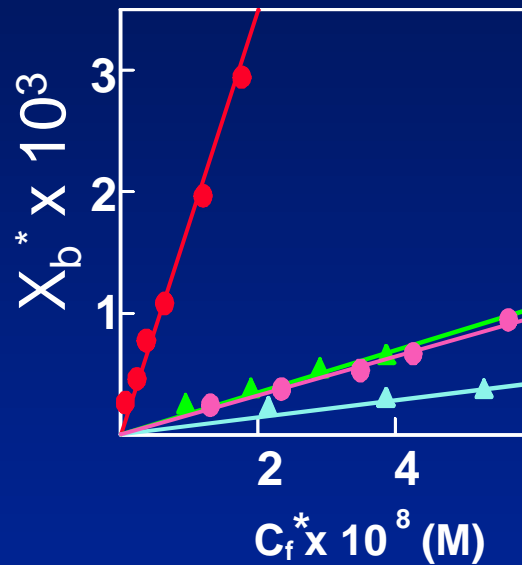
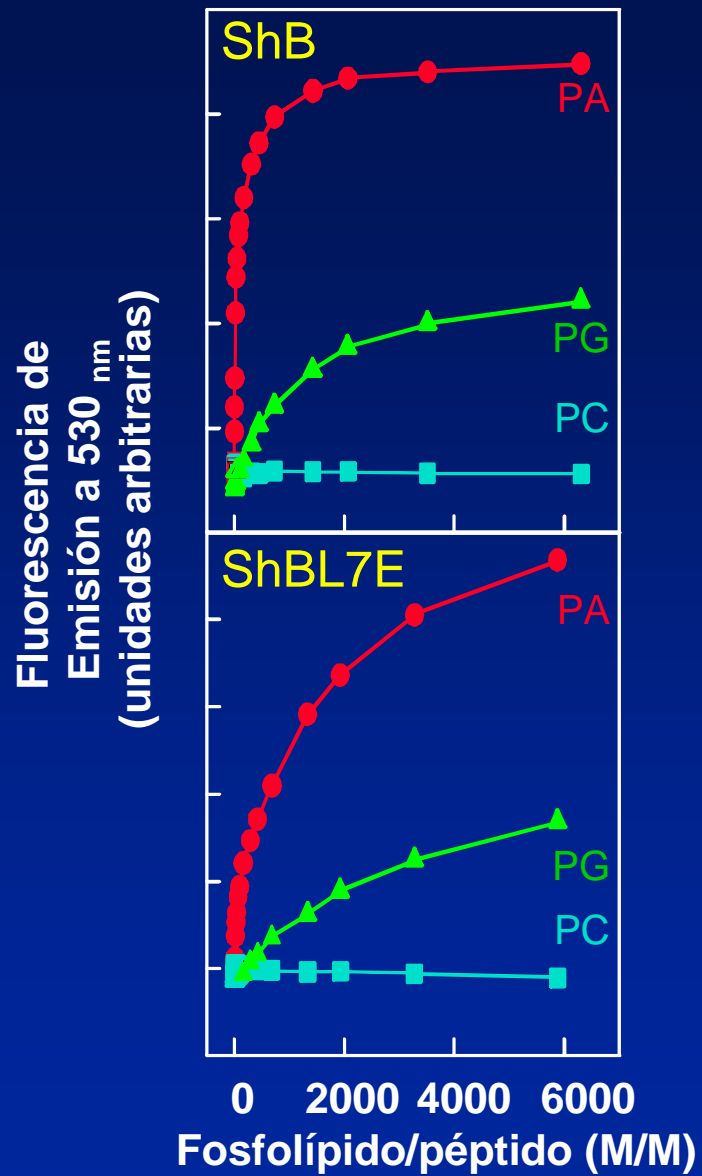


Fig. 13: Ni el péptido ShB ni el ShBL7E se unen a vesículas de PC. Sin embargo, ambos péptidos se unen con gran eficiencia y de forma saturable a vesículas de PA y, en menor medida, de PG.

Fig. 14: El péptido ShB estabiliza la forma dianiónica del PA.

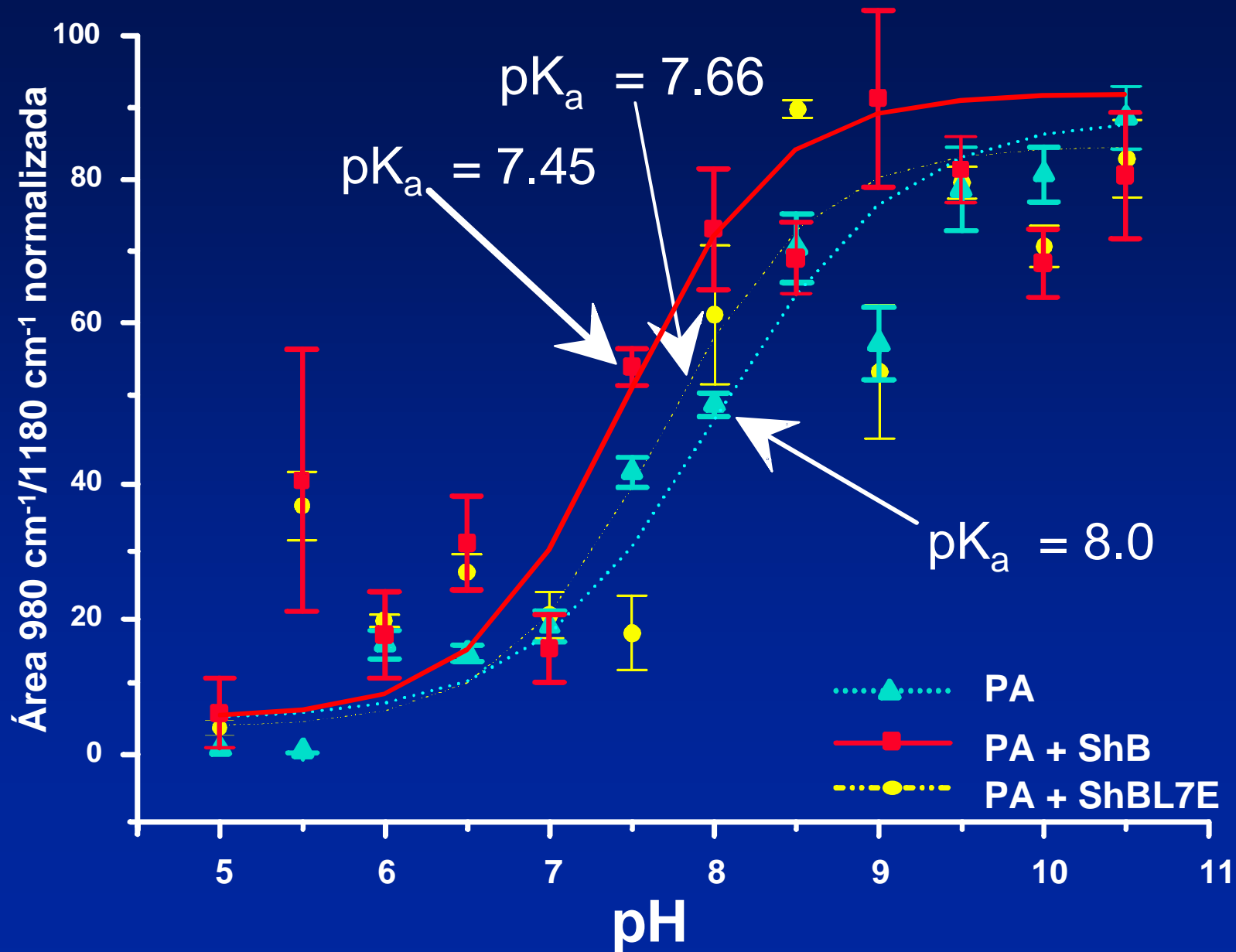


Tabla II: Secuencia de aminoácidos de derivados del péptido ShB (con el extremo C-terminal amidado) y sus análogos marcados con una sonda fluorescente.

#	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}

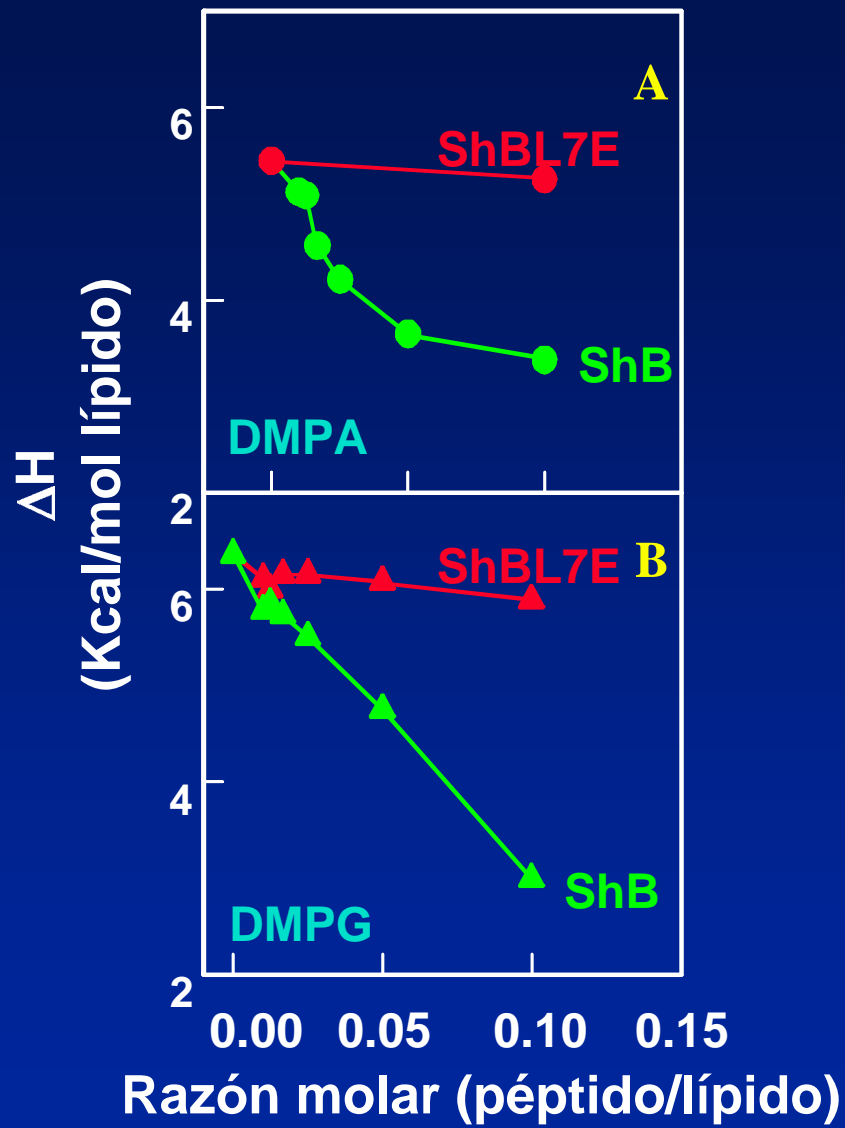


Fig. 15: Inserción del péptido ShB en vesículas fosfolipídicas aniónicas.

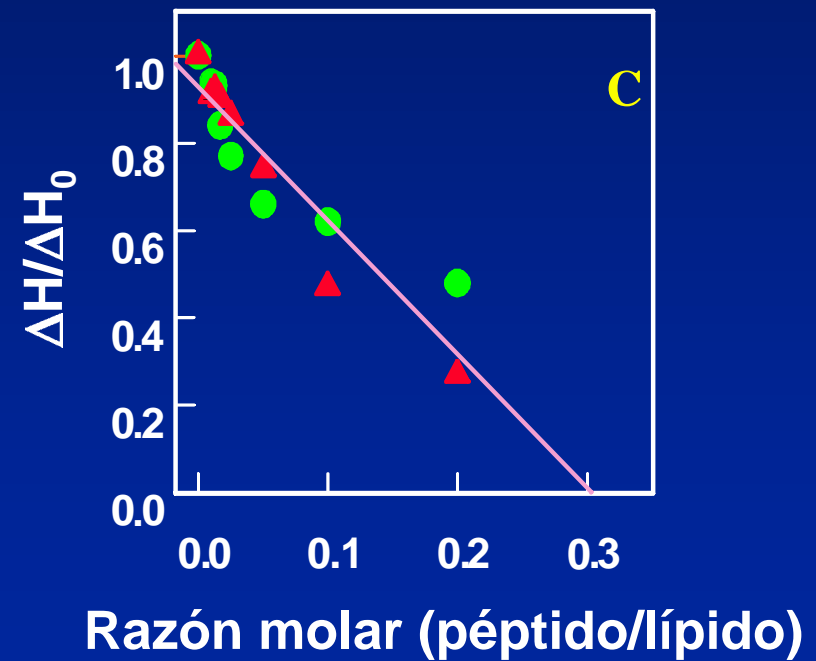
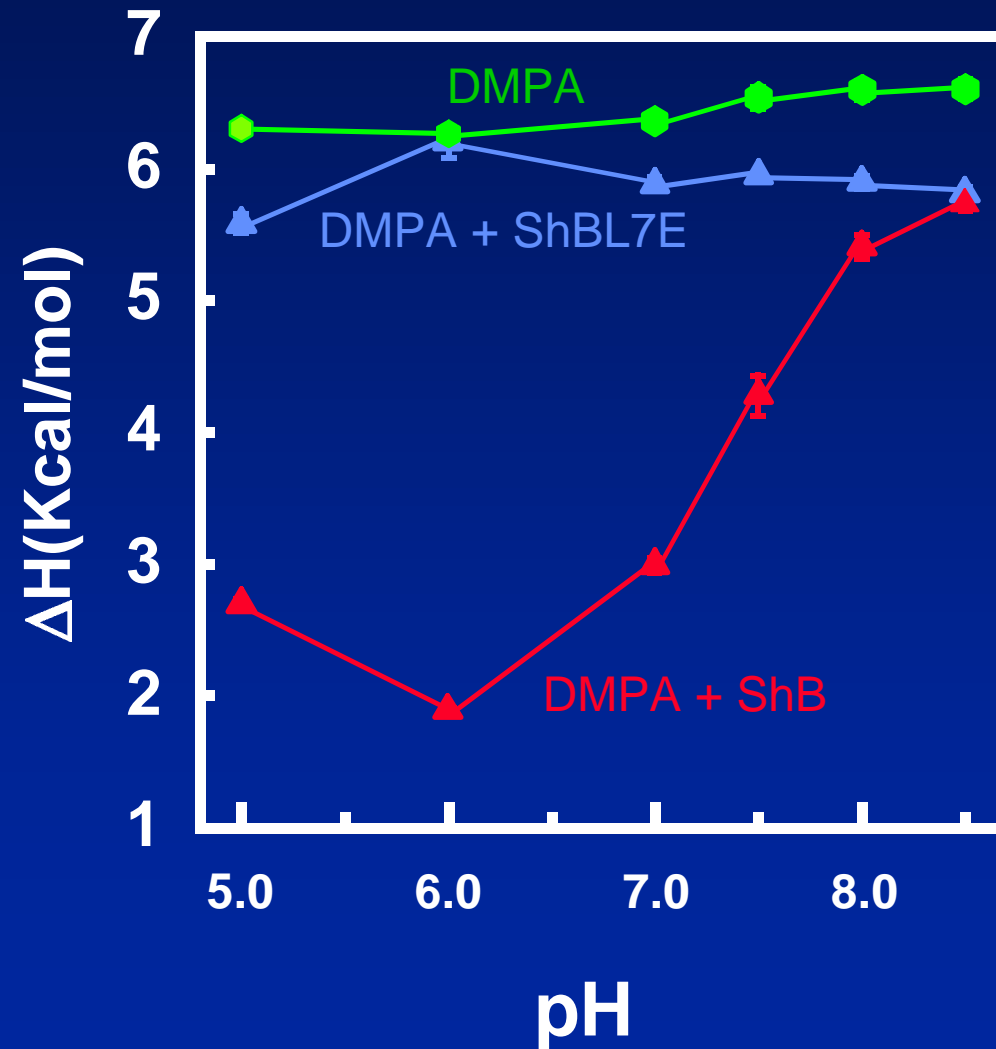


Fig. 16: La inserción del péptido ShB en la bicapa aniónica es dependiente del pH.



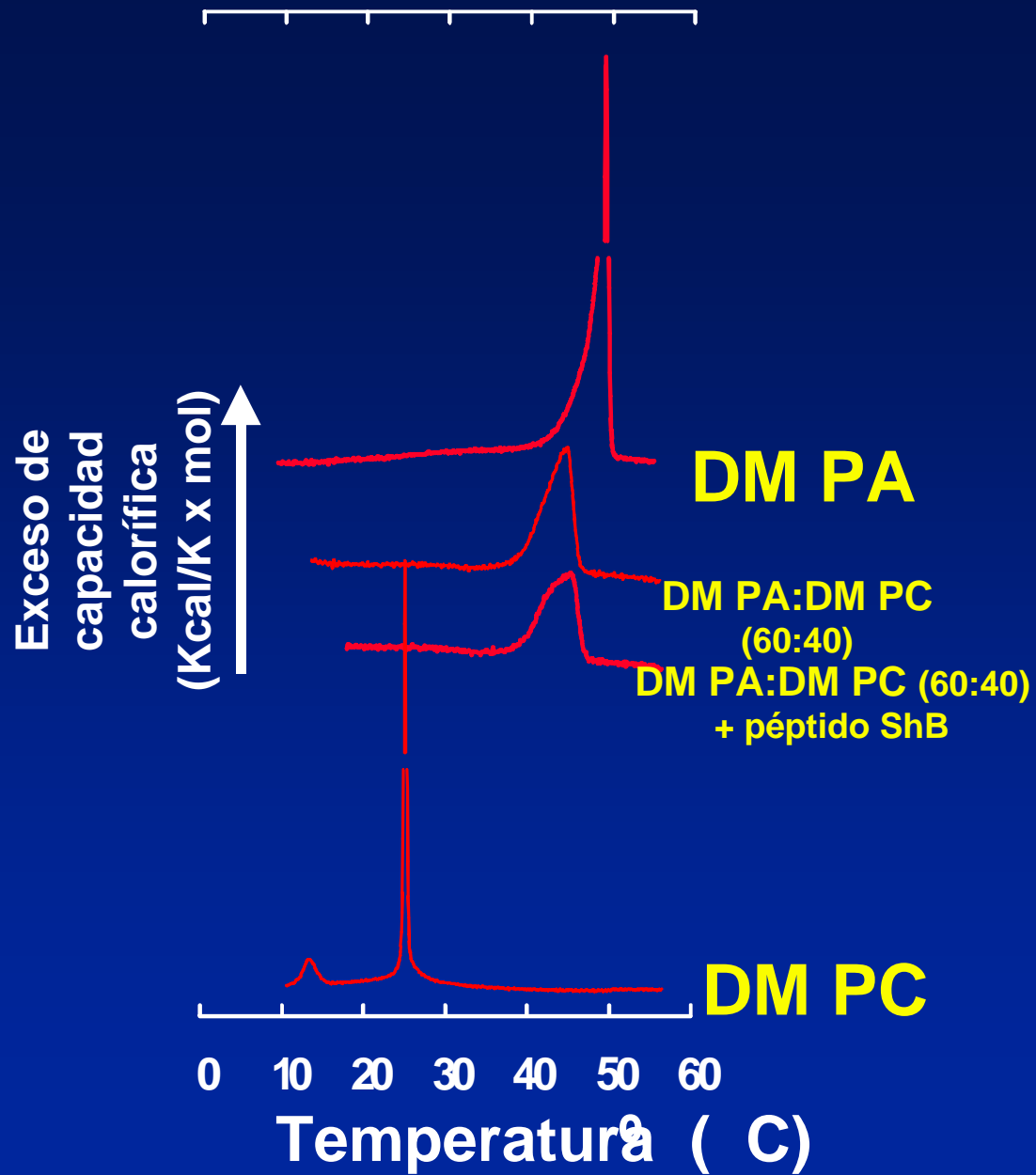


Fig. 17: El péptido ShB no produce segregación de dominios lipídicos aniónicos en mezclas binarias.

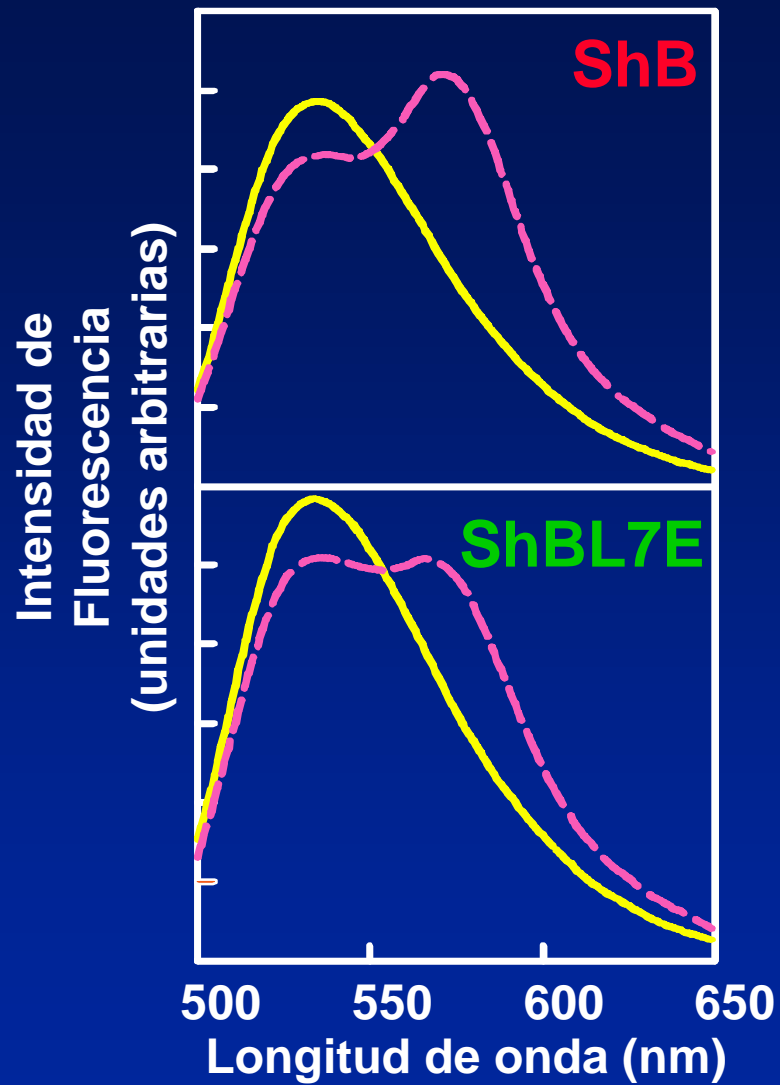
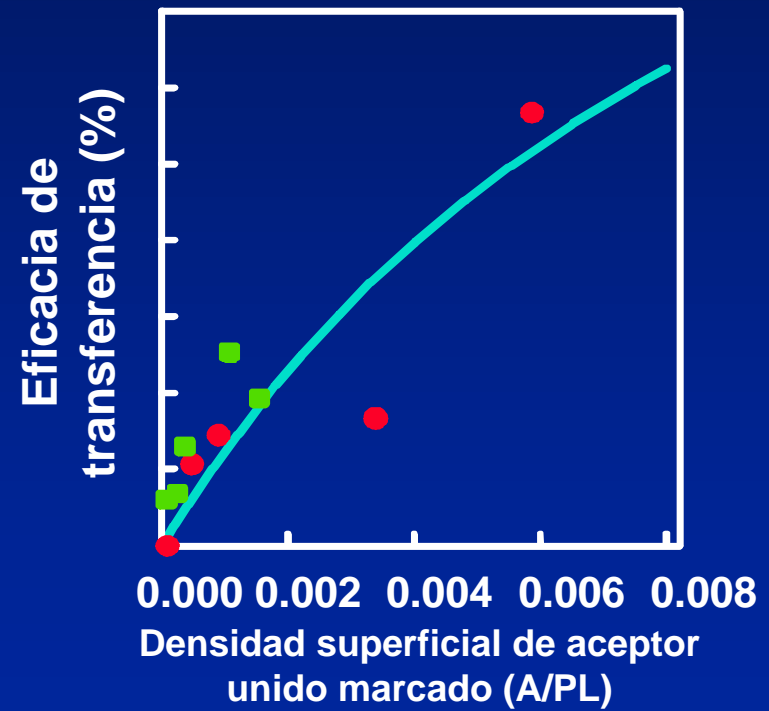


Fig. 18: No se produce transferencia de energía por resonancia, luego no hay agregación de los péptidos.



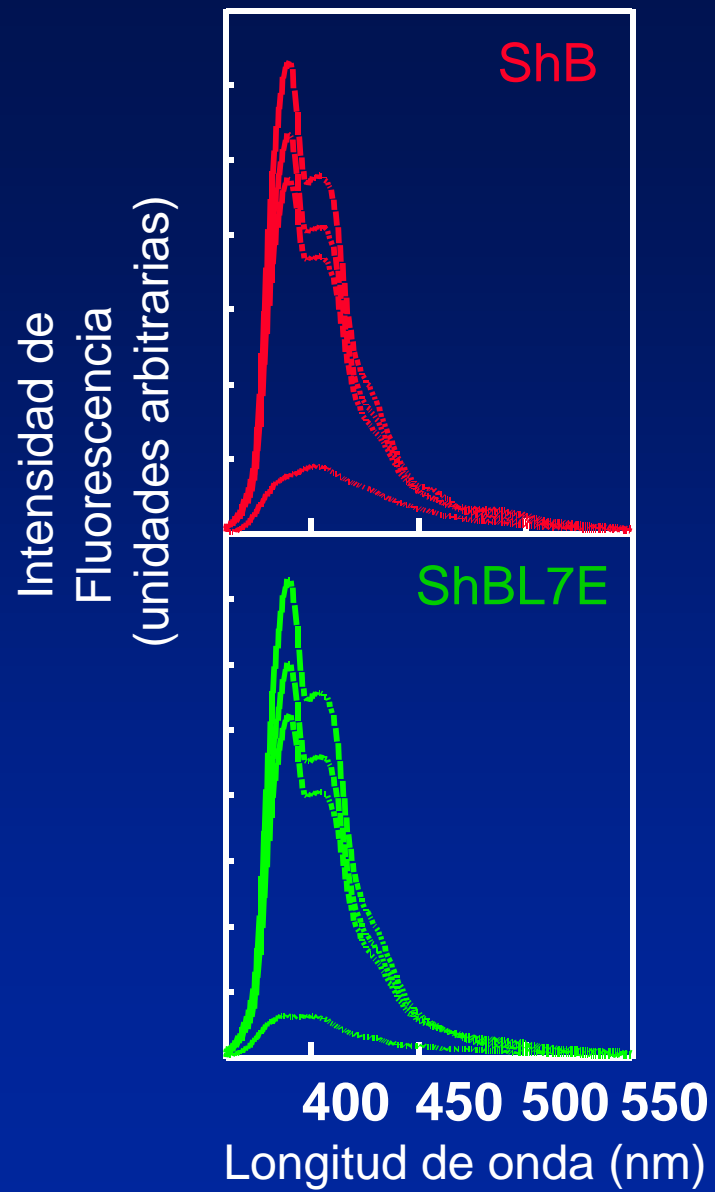


Fig. 19: No se produce formación de excímeros de pireno, lo que confirma la no agregación de los péptidos.

Fig. 20: El análisis de las réplicas de criofractura muestra que hay igual número de IMPs en la hemicapa interna que en la externa.

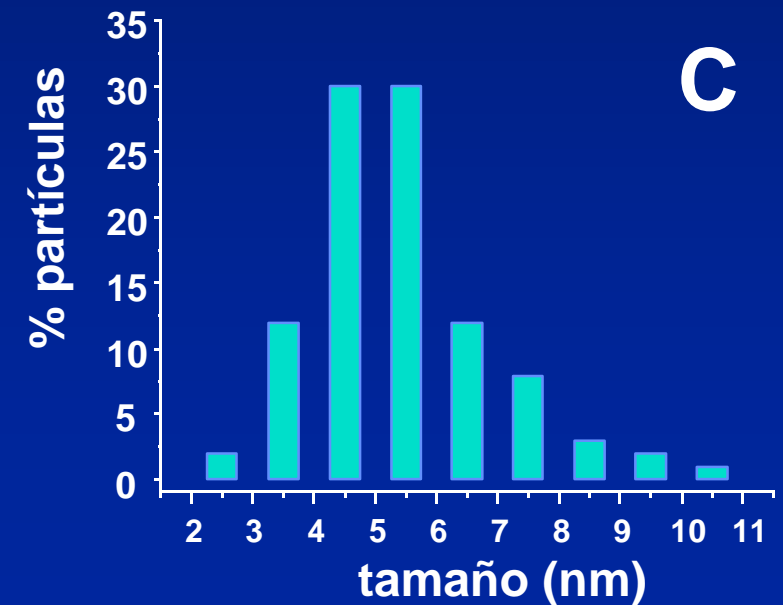
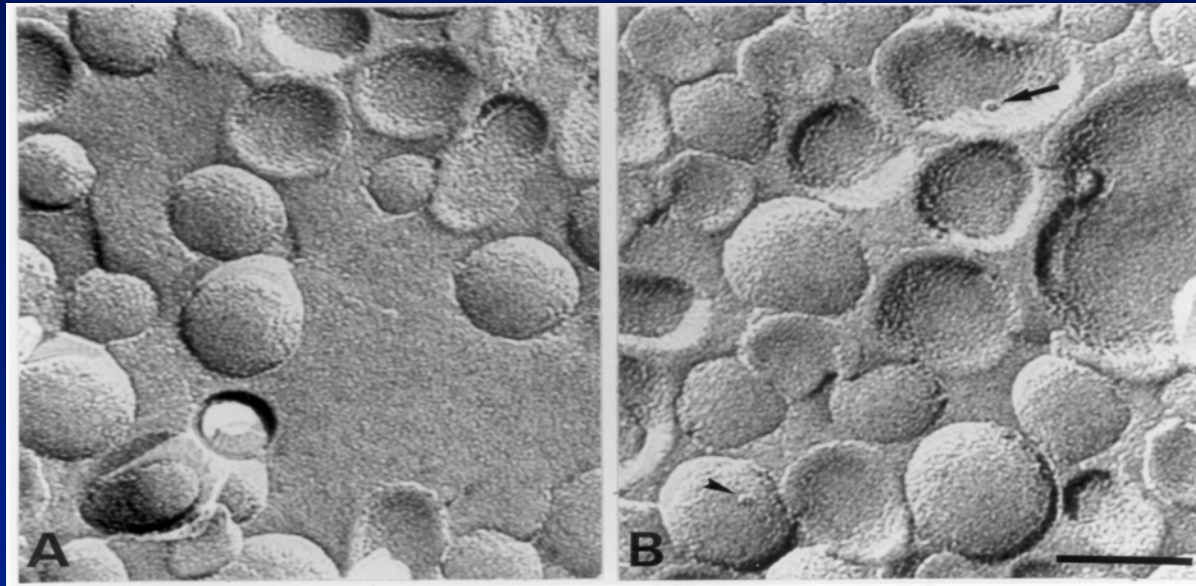


Fig. 21: La hidrólisis por tripsina sobre el extremo C-terminal del péptido ShB dificulta tanto la inserción como la adopción de estructura β .

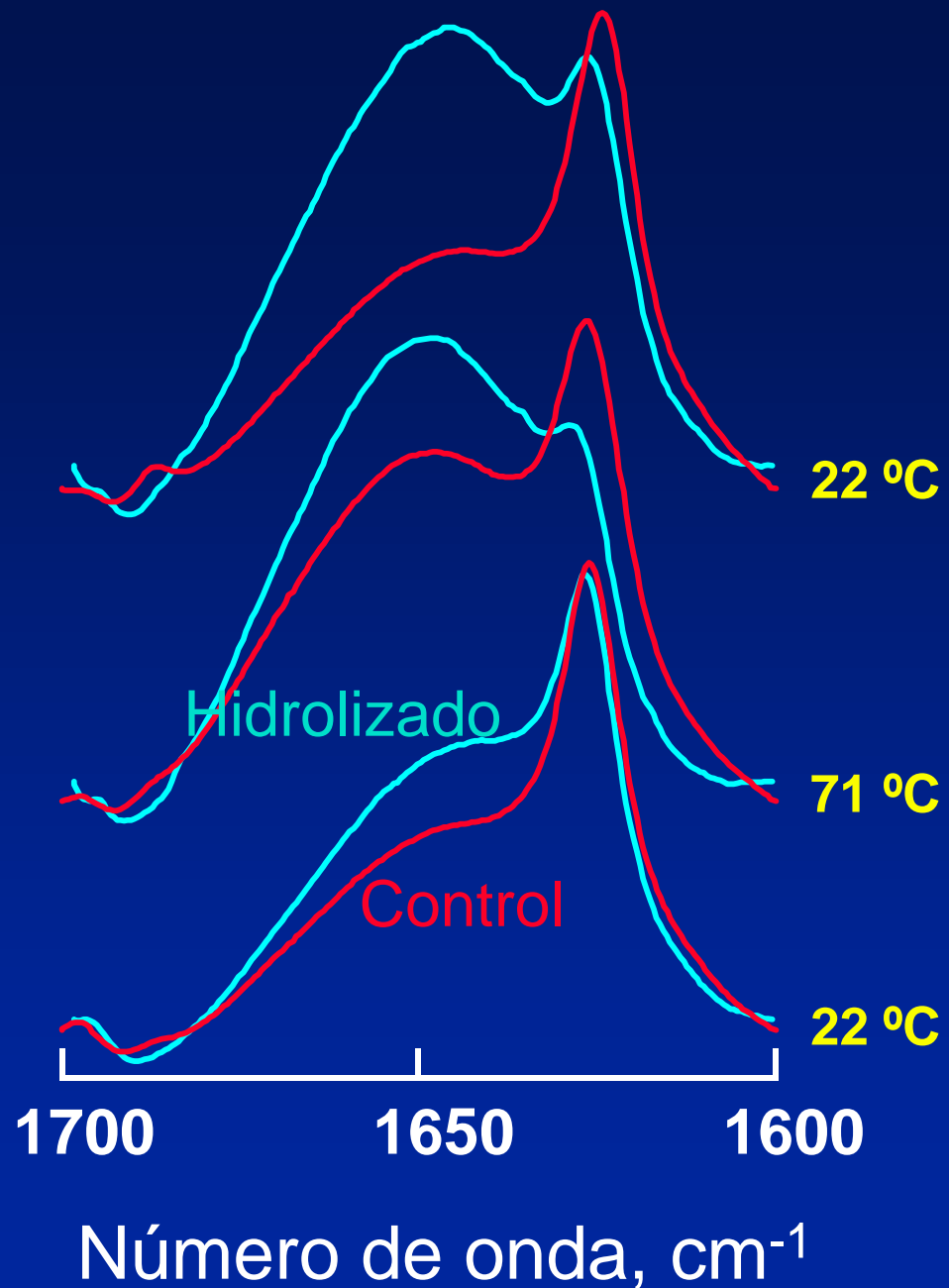
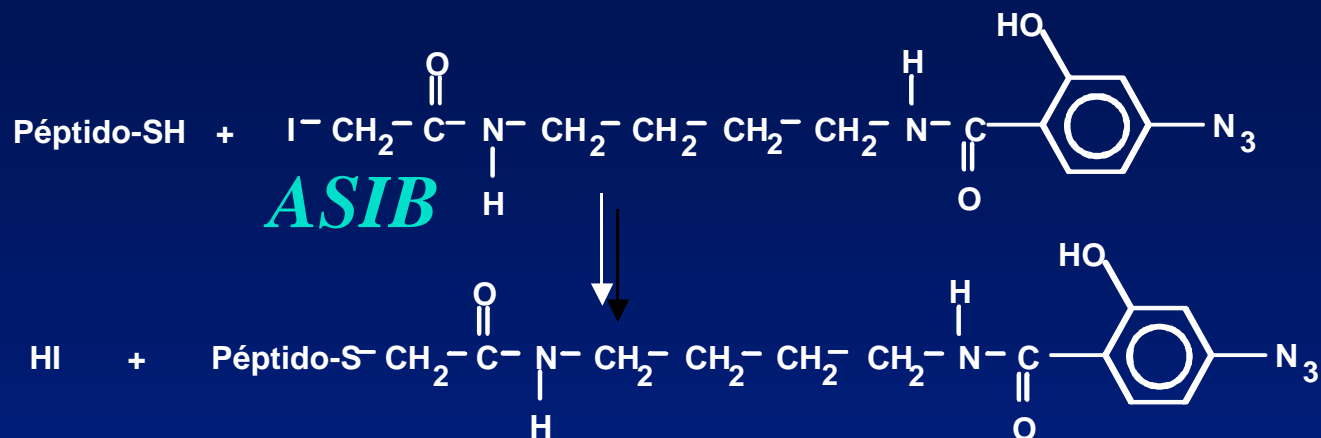


Fig. 22: Esquema de reacción entre el 1-(*p*-azidosalicilamido)-4-(iodoacetamido)butano (ASIB) y un péptido que contenga cisteína para dar lugar a un péptido derivatizado con ASIB.



ASIB-péptido

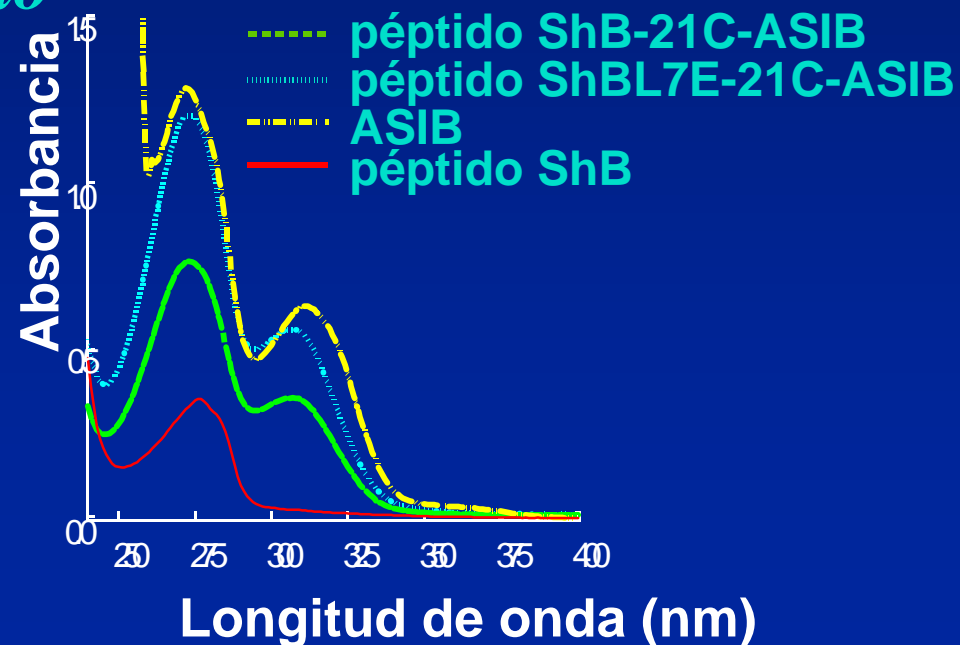


Fig. 23: El espectro de infrarrojo de los péptidos marcados con ASIB presenta una banda a 2115 cm^{-1} característica de las azidas aromáticas, que desaparece cuando son irradiados con luz ultravioleta.

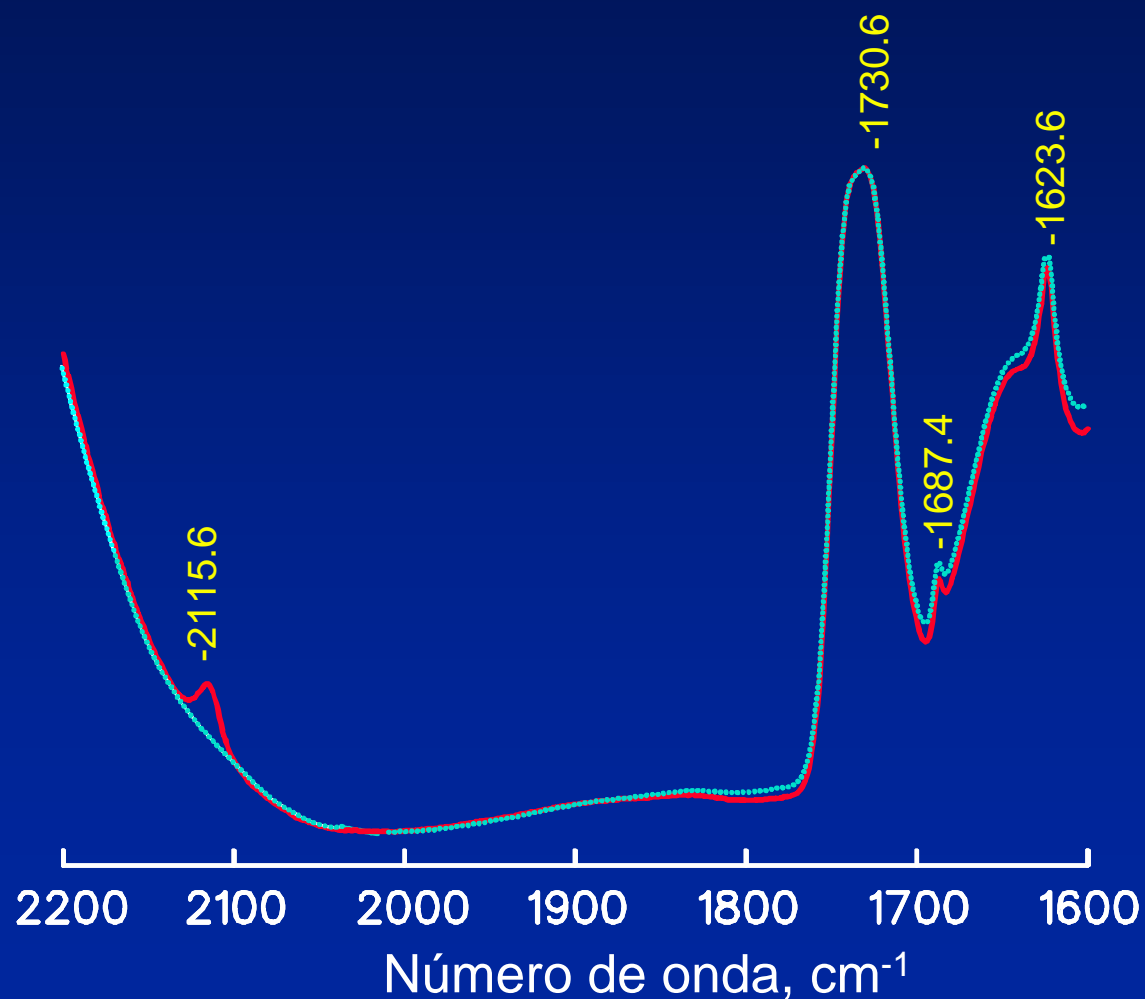


Fig. 24: Ningún péptido alteró la velocidad de activación del canal *Shaker* Δ 4-46.

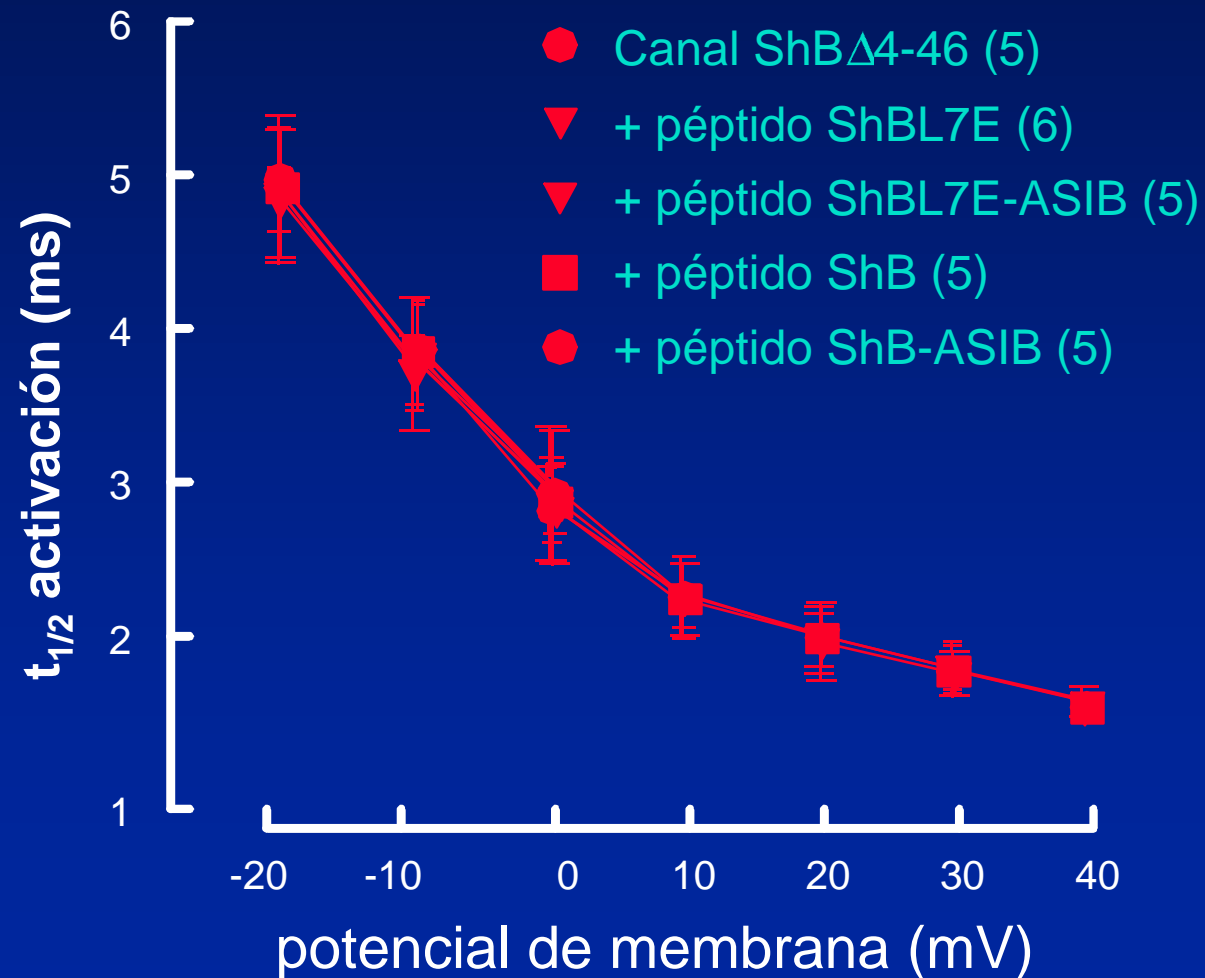
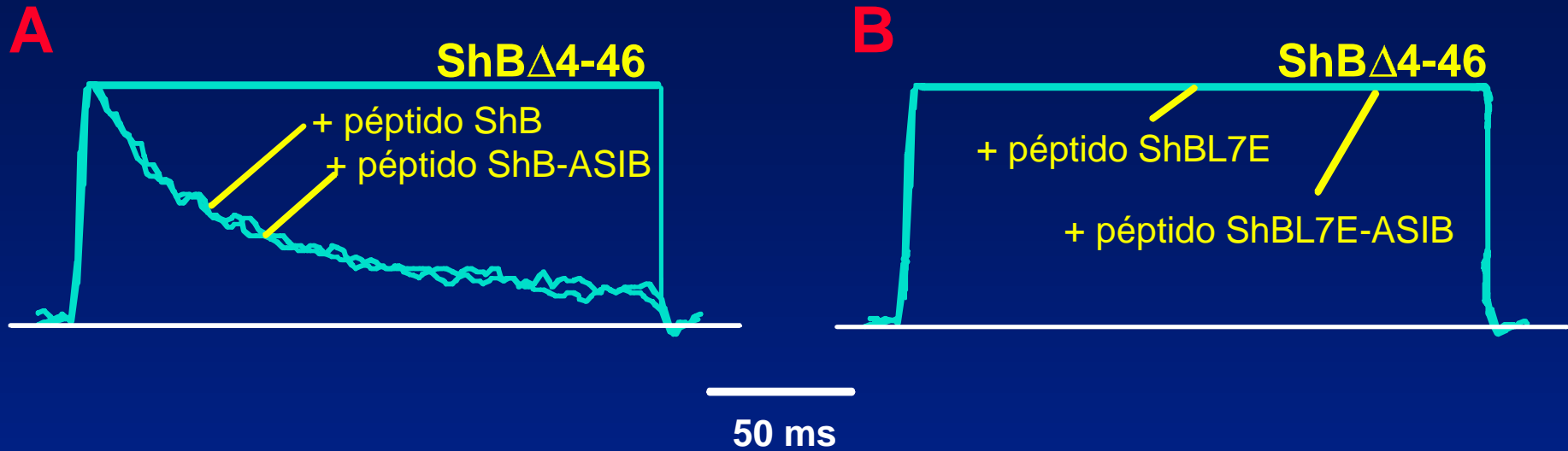


Fig. 25: El péptido ShB-ASIB es un análogo funcional del péptido ShB.

Inactivación tipo-N



Inactivación tipo-C

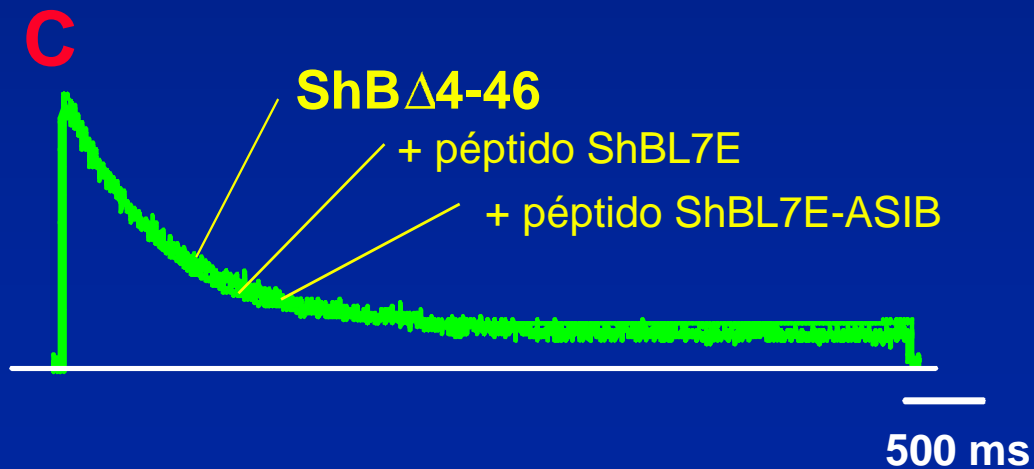


Fig. 26: Los péptidos ShB y ShB-ASIB presentan espectros de FTIR similares cuando interaccionan con vesículas fosfolipídicas.

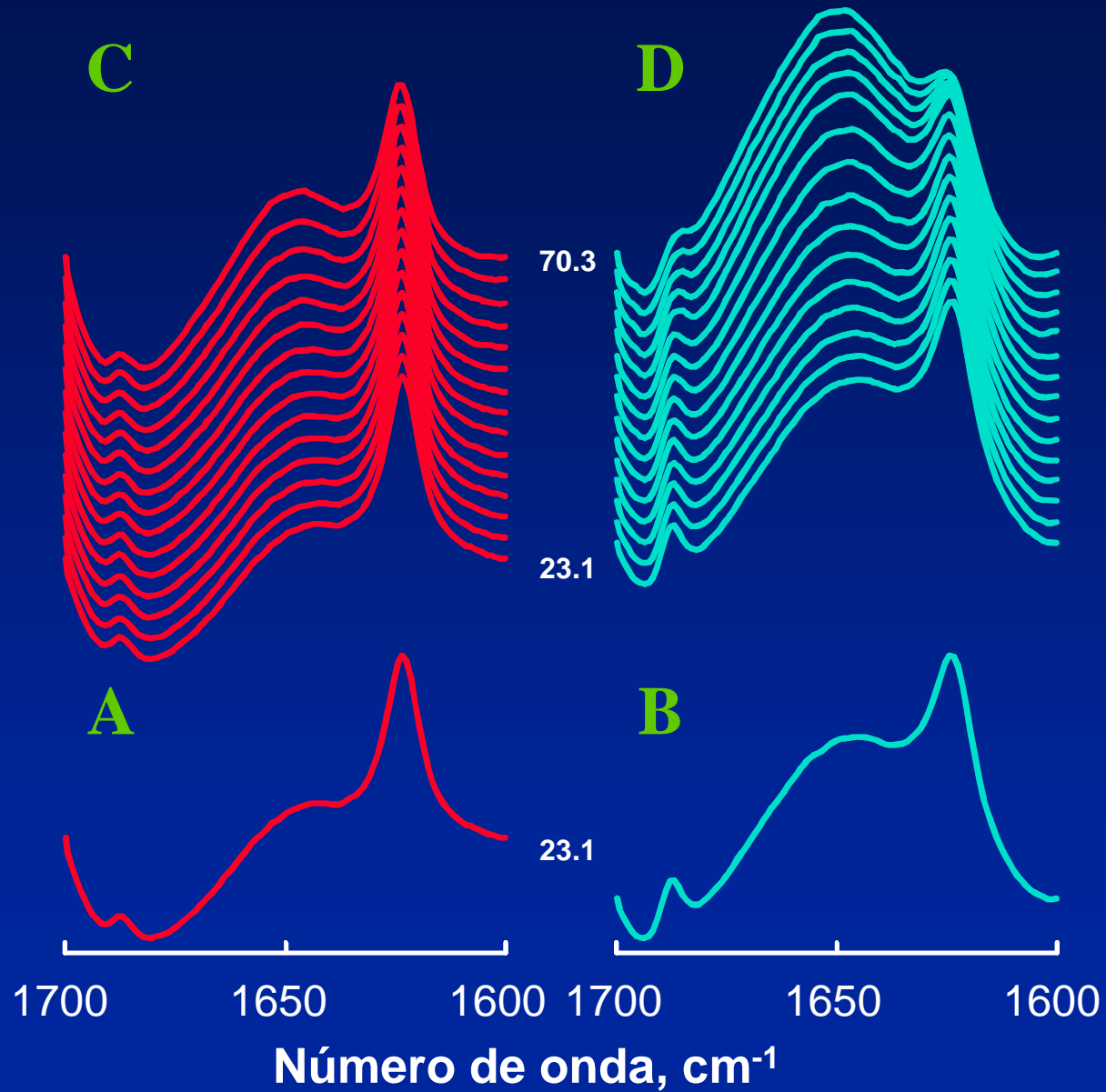


Fig. 27: Fotólisis de los péptidos ShB-21C-ASIB (A), ShBL7E-21-ASIB (B) y del ASIB (C).

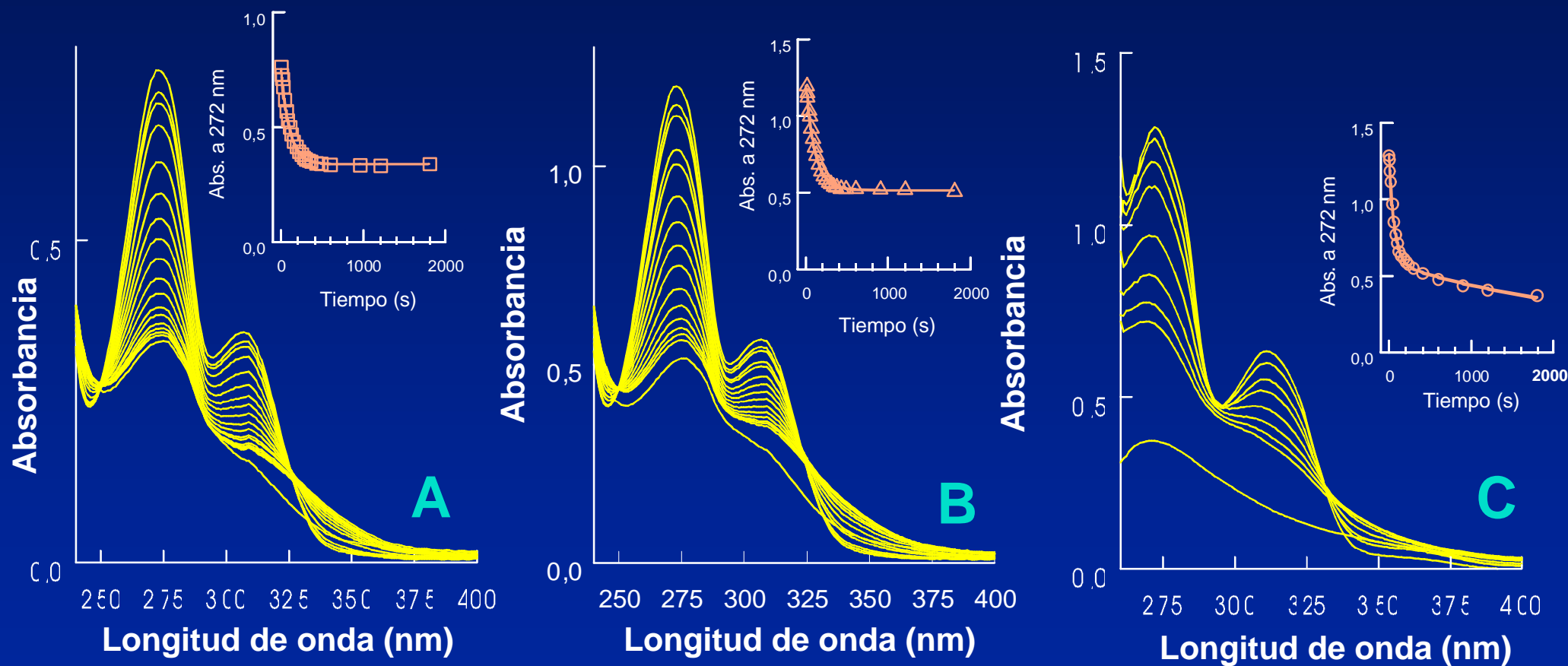




Fig. 29: El péptido ShBY8(P) no es inactivante.

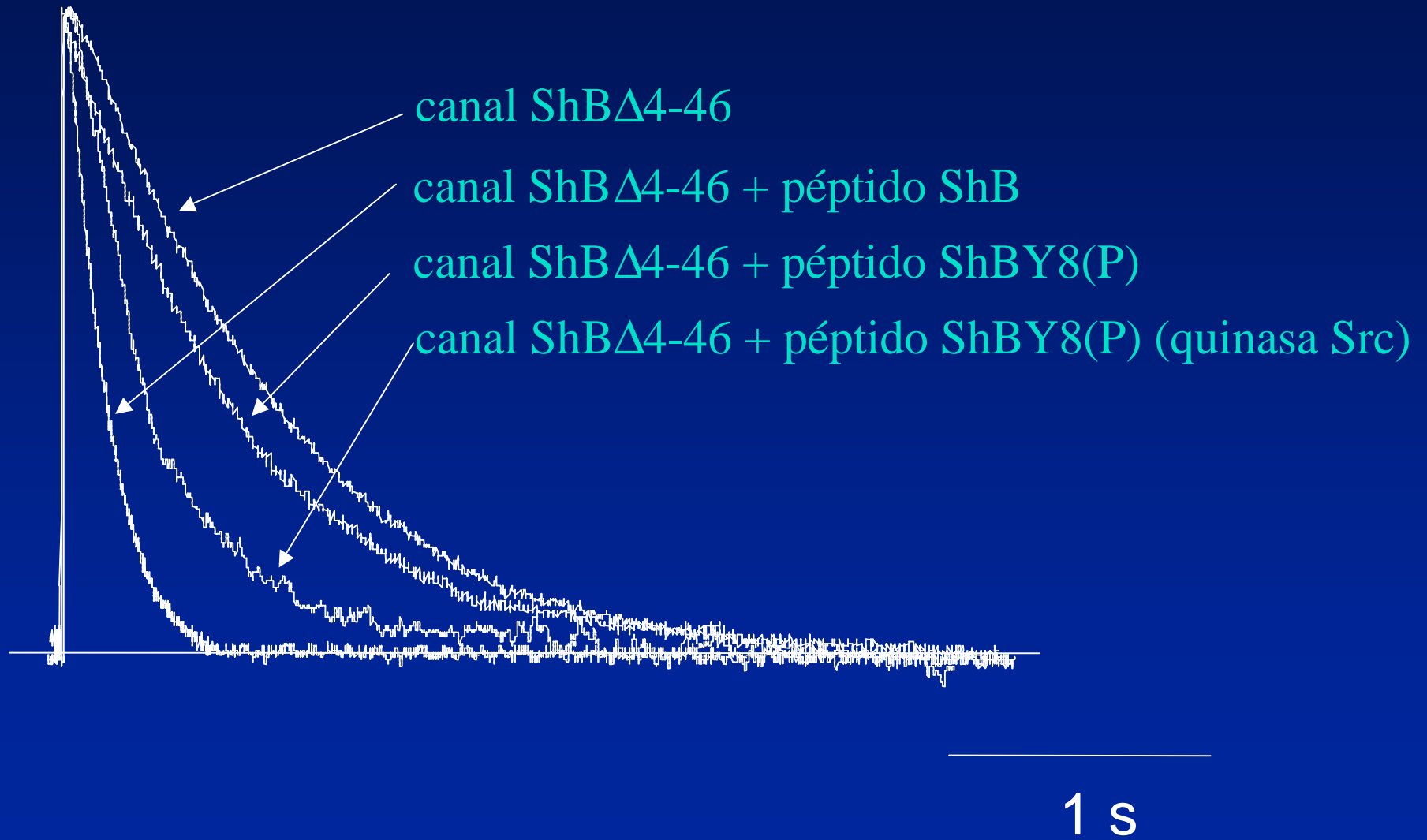


Fig. 30: El péptido ShBY8(P) se comporta estructuralmente como ShBL7E.

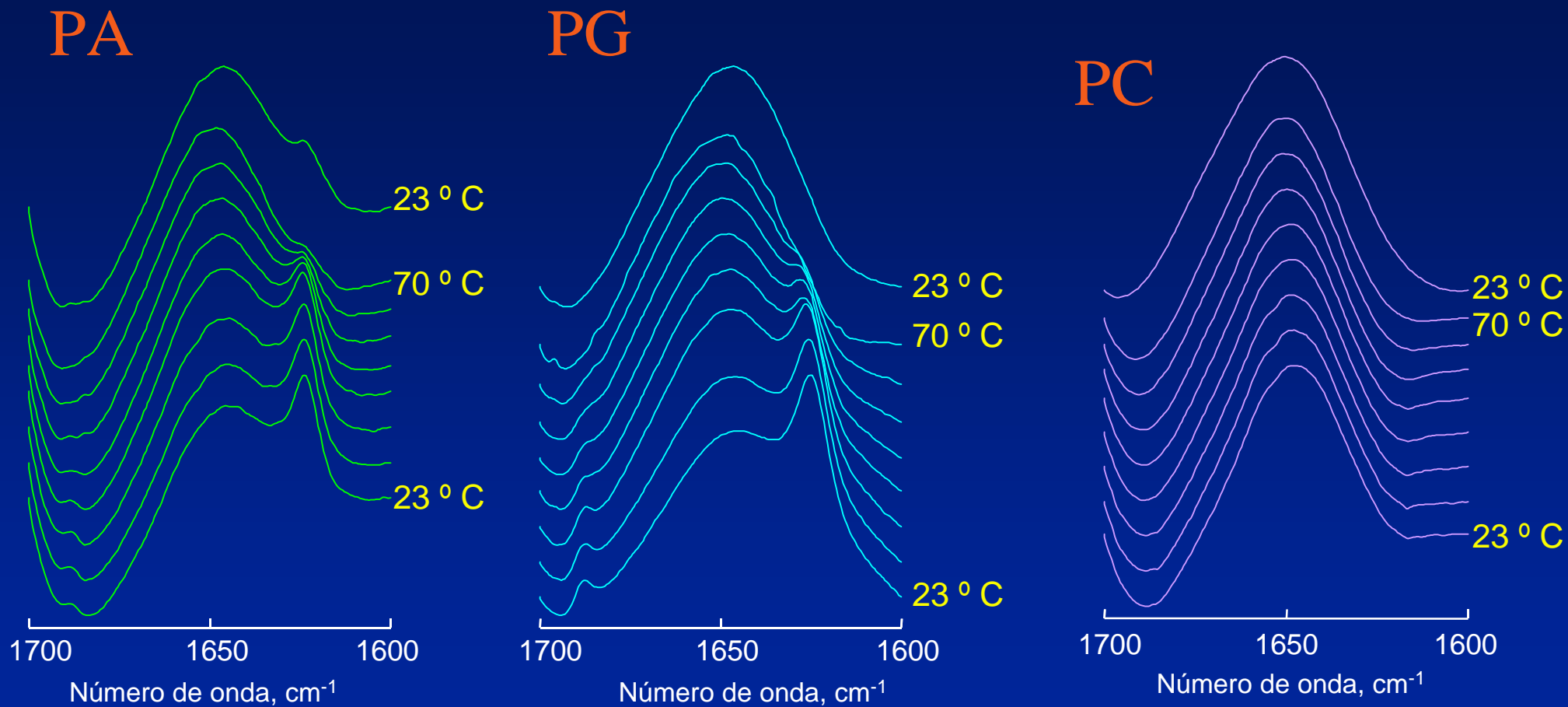


Tabla III: Efecto de diferentes péptidos sobre el curso temporal de la activación e inactivación de corrientes de K⁺ en canales ShBΔ6-46. La constante de activación ($\tau_{1/2}$) se mide como el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de la amplitud máxima de la corriente a diferentes potenciales. El valor de la constante de inactivación (τ) se estima ajustando el tramo de disminución de la corriente a una función exponencial de caída simple. Media \pm desviación estándar (n).

Péptido	t _{1/2} activación (ms)			t _{1/2} inactivación (ms)
	-20 mV	0 mV	+20 mV	+20 mV
Control (sin péptido)	5.63±1.12 (7)	3.28±0.43 (8)	2.32±0.21 (8)	1300±160 (6)
ShB	4.91±0.95 (5)	3.17±0.39 (7)	2.22±0.23 (6)	215±48 (6)
ShB-Y8(P)	5.87±1.03 (5)	3.39±0.47 (5)	2.38±0.36 (5)	766±87 (6)
ShB-Y8(P) (Quinasa Src)	5.65±0.89 (4)	3.35±0.32 (4)	2.17±0.29 (4)	634±81 (5)

Fig. 31: A pH básico el grupo fosforilo de la Tyr8 debe encontrarse en forma dianiónica, lo que impide la unión péptido-fosfolípido y la adopción de estructura β por parte del péptido.

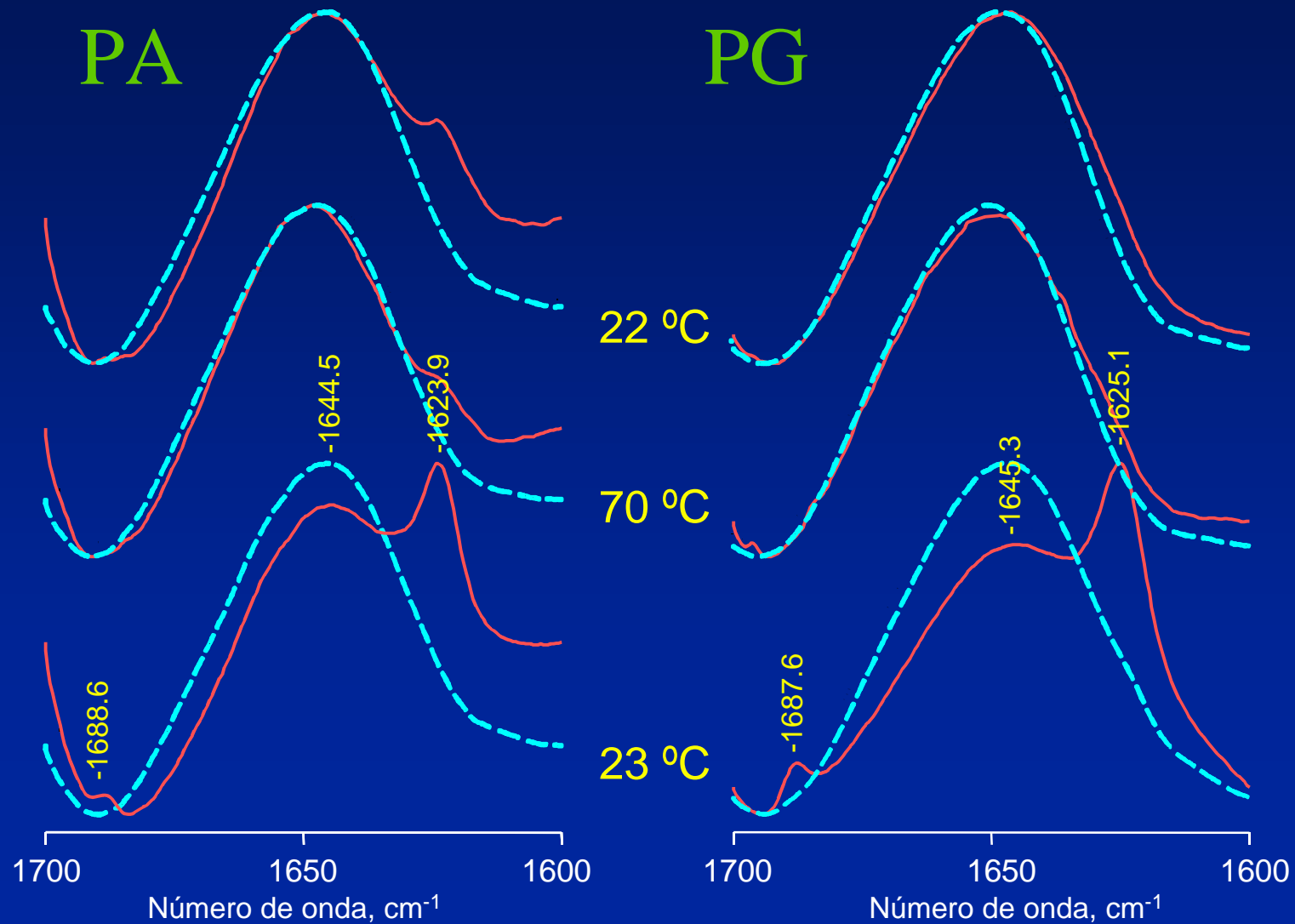


Fig. 32: El péptido ShBY8(P) presenta componentes de estructura β que dependen de la relación lípido-péptido.

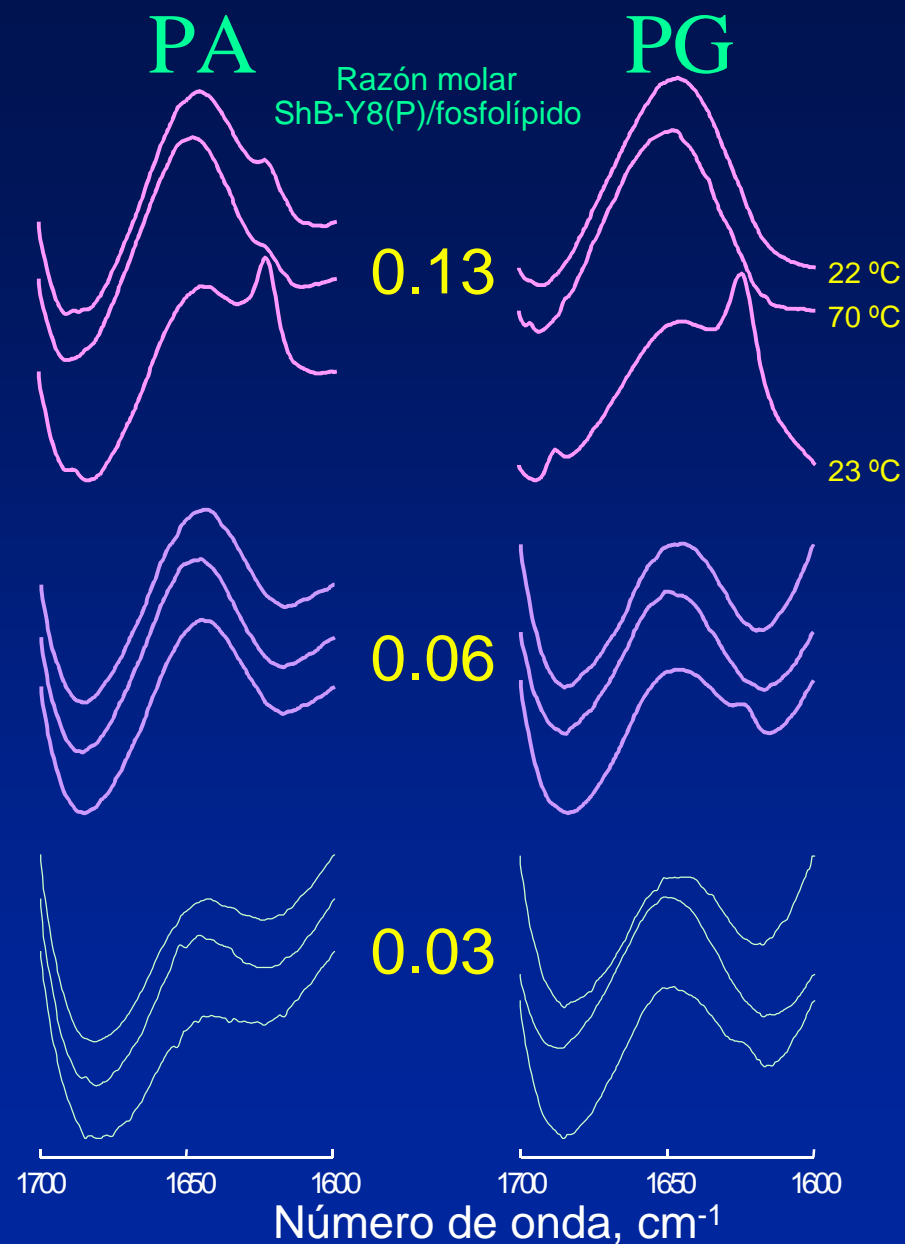


Fig. 33: El péptido ShBY8(P) no se inserta en vesículas fosfolipídicas.

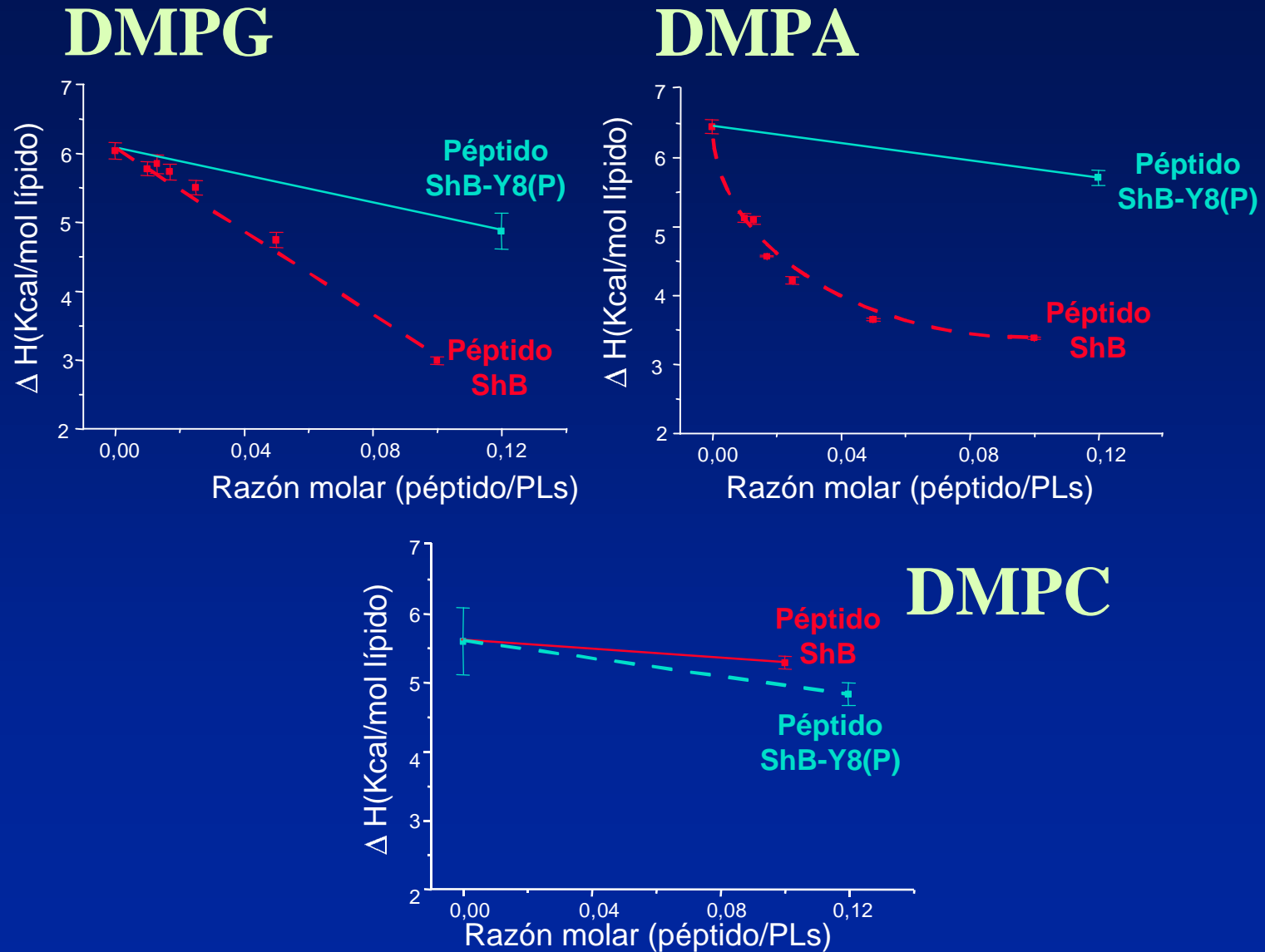
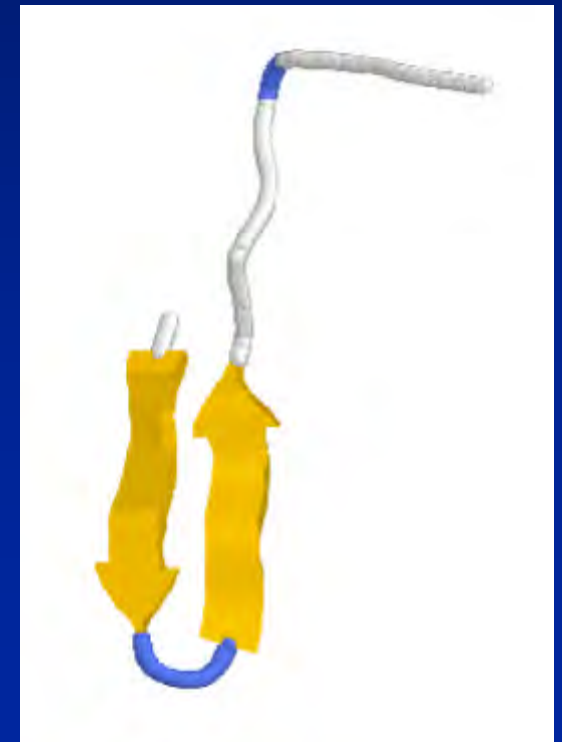
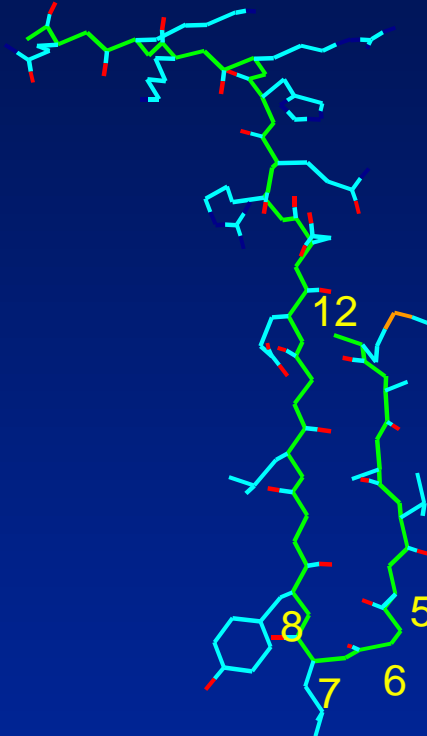
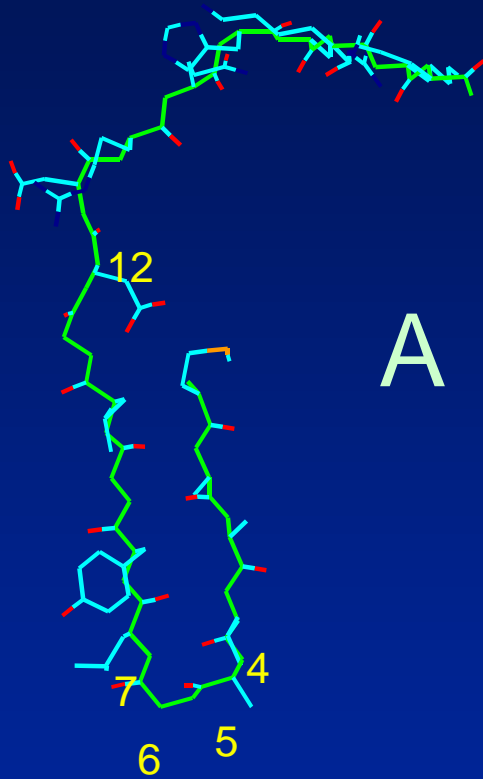


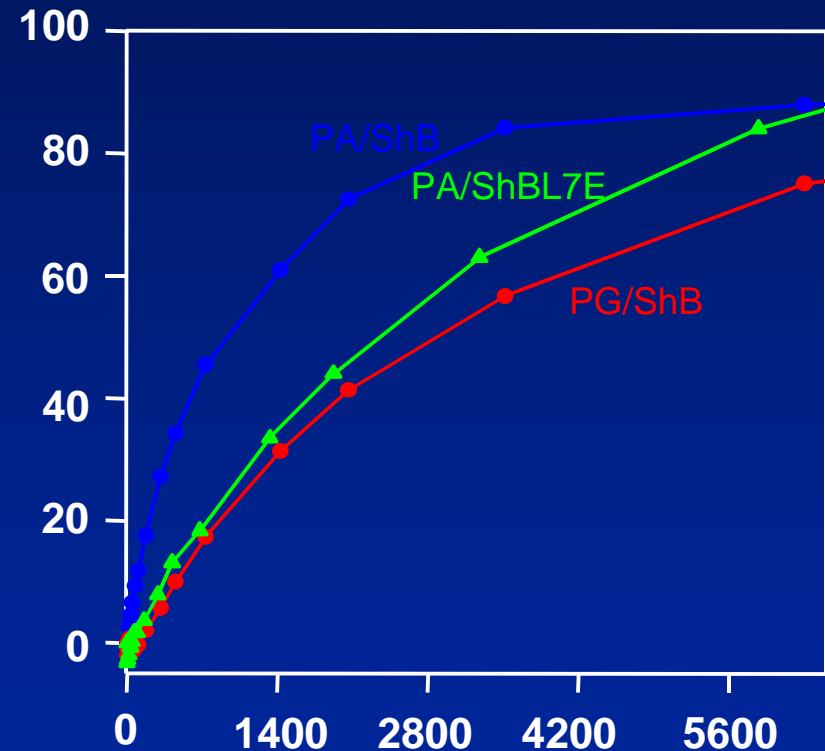
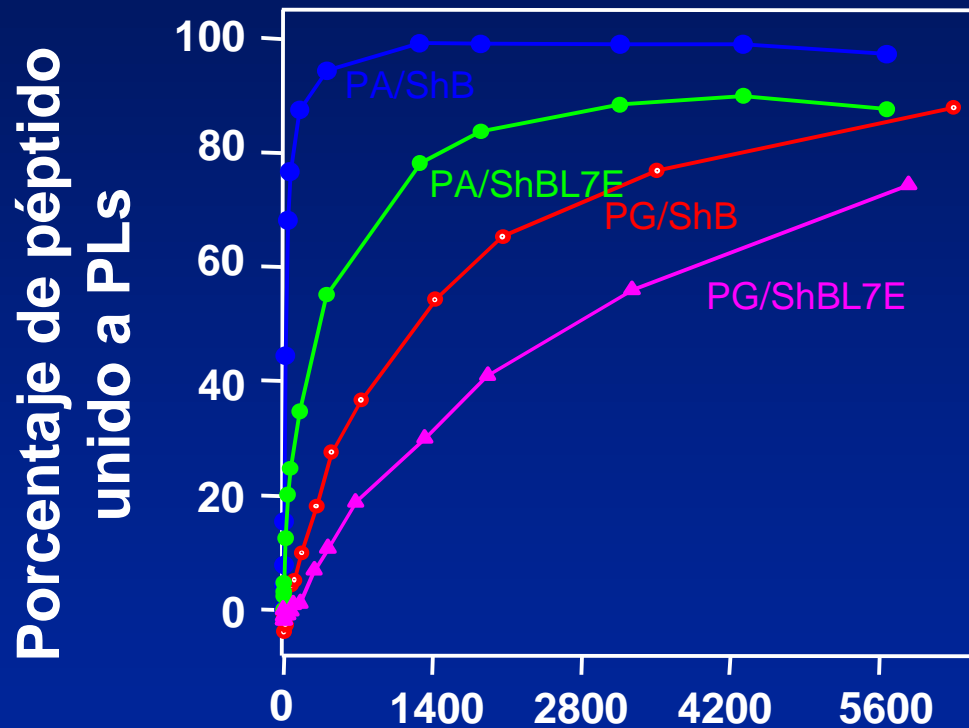
Fig. 34: Propuesta de dos modelos alternativos de estructura en “horquilla β ” para el péptido ShB insertado en vesículas fosfolipídicas aniónicas. El giro necesario para que se forme esta estructura puede tener lugar a partir de dos secuencias de tetrapéptido: VAGL (panel **A**) y AGLY (panel **B**).



Porcentajes de unión de los péptidos marcados con NBD a distintos fosfolípidos.

pH 7.0

pH 8.5



Relación molar PLs/péptido