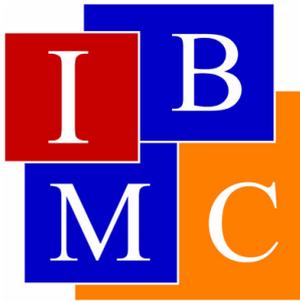


UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



# Expresión y purificación de una proteína que funciona como un canal iónico de potasio (KcsA)

TRABAJO FIN DE GRADO  
Adela María Bernabeu Zornoza

TUTORA  
Dra. Asia Fernández Carvajal

Curso académico 2014/2015  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Experimentales  
Grado en Biotecnología

---

## Agradecimientos

Querría expresar mi reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas que, gracias a su colaboración, han contribuido a la realización de este Trabajo Fin de Grado:

En primer lugar a mi profesora y tutora, Asia, por haber confiado en mí desde el primer momento, por haberme dado la oportunidad de aprender y de formarme como persona. Por su apoyo y disposición durante estos cuatro años de carrera.

A Marcela y Eva, personal investigador y técnico de laboratorio, por su entusiasmo y disposición en cualquier momento y situación, por haberme ofrecido su ayuda sin necesidad de pedirla y de haber puesto a mi servicio sus capacidades para solucionar cualquier imprevisto.

A mis padres y hermano, por su apoyo incondicional en todo momento. Por haberme escuchado siempre que los he necesitado y por su infinita paciencia en los momentos más tensos. Por su cariño y comprensión, sin su ayuda no hubiera llegado donde estoy y no sería la persona que soy.

Por último, a mis compañeras y amigas, por acompañarme durante estos cuatro años, por los buenos momentos que hemos pasado juntas, por escucharme, permitirme desahogarme y hacerme reír en los momentos más complicados. Gracias a ellas, toda esta etapa ha sido más llevadera.

## Índice

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	5
1.1. Los canales iónicos: generalidades y función.....	5
1.2 Los canales de potasio.....	5
1.3 El canal de potasio KcsA. ....	6
1.3.1 Características generales.....	6
1.3.2 Características funcionales.....	7
1.3.3 Características estructurales. ....	8
1.4 Producción de proteínas recombinantes mediante expresión heteróloga en <i>E.coli</i> . ....	9
2 OBJETIVOS .....	12
3 METODOLOGÍA.....	12
3.1 Obtención de las proteínas recombinantes expresadas en <i>E.coli</i> .....	12
3.2 Técnica cromatográfica. ....	15
3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).....	16
3.4 Espectroscopia UV-Visible.....	17
3.5 Reconstitución de KcsA- WT en liposomas de asolectina. ....	18
3.6 Medidas funcionales. ....	20
3.6.1 Condiciones registros. ....	22
4 RESULTADOS.....	23
4.1 Purificación de KcsA en BL21.....	23
4.2 Purificación de KcsA en M15. ....	25
4.3 Actividad de KcsA expresado en BL21.....	27
4.4 Actividad de KcsA expresado en M15. ....	28
5 DISCUSIÓN .....	30
5.1 Rendimiento .....	30
5.2 Actividad.....	30
6 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA. ....	31
7 REFERENCIAS .....	31

**Resumen:** La importancia de los canales iónicos radica, no sólo en su implicación en procesos biológicos clave, sino en el hecho de que son dianas terapéuticas reales y potenciales. Son la diana de más del 50% de los medicamentos que actualmente se prescriben. Entre estos canales iónicos encontramos los canales de potasio, involucrados en numerosos procesos celulares de vital importancia. Debido a la complejidad de estas proteínas, durante los últimos años se ha prestado especial atención a la expresión de sus homólogos procariontes, en este sentido, el canal KcsA constituye un modelo sencillo para el estudio de canales de potasio eucariotas más complejos. Durante este proyecto, se ha llevado a cabo la expresión y caracterización funcional de un canal de potasio de origen procarionte: KcsA. Para ello se han utilizado dos cepas de *E.coli*: BL21 y M15, debido a su capacidad de expresión de la proteína de interés. Con este trabajo, se pretende determinar el rendimiento de expresión de la proteína en ambas cepas y estudiar sus características funcionales. Tras finalizar los experimentos de expresión de la proteína y purificación, se obtuvo que la cepa BL21 presentó mayor rendimiento que la cepa M15 a la hora de expresar el canal KcsA. Por otra parte, mediante medidas electrofisiológicas se obtuvieron registros de rampas y continuos a -150 y +150mV similares en KcsA-WT expresado en ambas cepas. Por todo lo expuesto se concluye que se puede expresar indistintamente KcsA-WT en ambas cepas con resultados satisfactorios, siendo la cepa BL21 la que presenta un mayor rendimiento.

**Abstract:** The importance of ionic channels not only consists in their involvement in biological processes, but also they are actual and potential therapeutic targets. Ion channels are the target of more than 50% of medicines currently prescribed. Among these ion channels, potassium channels, are involved in numerous cellular processes of vital importance. Due to the complexity of these proteins, during the last years, particular attention has been paid to the expression of their counterparts prokaryotes. In this sense, KcsA channel is a simple model for the study of eukaryotic potassium channels that are more complex. In this project, we have been carried out the expression and functional characterization of a prokaryotic potassium channel: KcsA. We have used two strains of *E. coli*: BL21 and M15, due to its capacity to express the protein of interest. The aim of this work is to determine the expression of the protein in both strains and to study their functional characteristics. We have observed that the BL21 strain presented higher KcsA expression. On the other hand, electrophysiological measures were obtained, we did records of ramps and continuous to - 150 and 150 mV and we observed that the activity of the ion channel KcsA, expressed by both cells, was similar. Taking together this data, we concluded that KcsA-WT can be expressed in both strains with satisfactory results, being the BL21 strain which has a higher expression.

**Palabras clave:** Canal iónico, KcsA, Expresión proteínas, Cepa M15, Cepa BL21.

## 1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

### 1.1. Los canales iónicos: generalidades y función.

Los canales iónicos son un grupo diverso de proteínas formadoras de poros que atraviesan la membrana celular y conducen iones de manera selectiva a través de esta barrera. Son proteínas que cambian entre dos conformaciones, abierta y cerrada, en respuesta a un estímulo externo en un proceso conocido como apertura o “gating” (Jiang, Y. y col. (2002)).

Cuando un canal iónico se abre, los iones conductores son capaces de moverse a través de él y la dirección en que se mueven está determinada por el gradiente electroquímico, que representa la suma del gradiente químico a través de la membrana plasmática y el campo eléctrico que experimenta el ión. Los canales iónicos se pueden clasificar en función del tipo de estímulo para su apertura o cierre en:

- Canales activados por voltaje: dentro de esta familia se encuentran canales de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{K}^+$ , de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Cl}^-$ .
- Canales activados por ligando: se clasifican en: a) receptores ionotrópicos: por unión directa al ligando; b) Canales metabotrópicos: por unión del neurotransmisor (ligando) al receptor provocando una cascada de eventos enzimáticos y la activación de proteínas G que promueven la apertura del canal debido a la actuación de enzimas fosforiladoras.
- Canales mecanosensibles: regulados por distintos estímulos físicos.

La importancia de los canales iónicos radica no sólo en su implicación en procesos biológicos clave, sino en el hecho de que son dianas terapéuticas reales y potenciales. Son la diana de más del 50% de los medicamentos que actualmente se prescriben.

### 1.2 Los canales de potasio.

Desde el punto de vista estructural, los canales de  $\text{K}^+$  son proteínas integrales de membrana que forman un poro acuoso central por el que fluye específicamente el catión  $\text{K}^+$  a favor de gradiente electroquímico.

La conducción de  $\text{K}^+$  se haya involucrada en numerosos procesos celulares incluyendo la regulación del volumen celular, la secreción hormonal y la formación del impulso nervioso en células excitables (Catterall, W. A. y col. (1995); Suzuki, M. y col. (1994); Schrempf, H. y col. (1995)).

Actualmente se conocen varias subfamilias moleculares de canales de  $K^+$ , algunos sensibles a voltaje, otros a la concentración de  $Ca^{2+}$  y otros a la unión de proteínas G o a poliaminas.

Existen entre 30 a 100 genes de canales de  $K^+$  en el ADN de organismos eucariotas tales como *Drosophila*, *C.elegans* o el ADN humano, cuyos ARN<sub>m</sub> pueden ser también sometidos a procesos de *splicing* alternativo, lo que aumenta aún más la diversidad de estas proteínas (Miller, C. y col. (2000)). Ciertas enfermedades o síndromes tales como arritmias cardíacas, sordera, epilepsia, diabetes y alteraciones en la presión arterial han sido relacionados con mutaciones en genes que codifican canales de  $K^+$ .

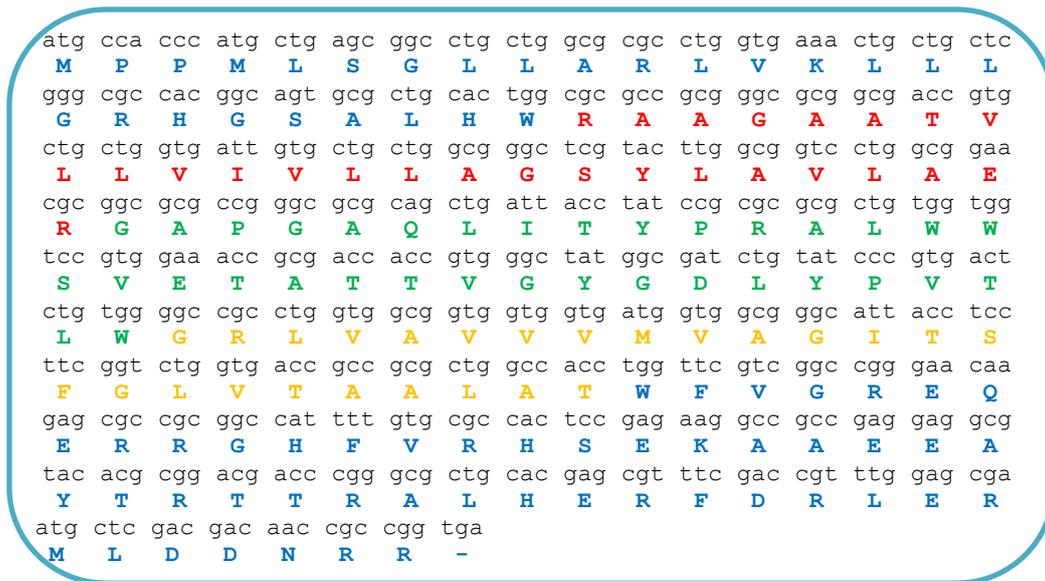
### 1.3 El canal de potasio KcsA.

#### 1.3.1 Características generales.

El canal KcsA (canal de potasio de *Streptomyces lividans*) fue identificado y clonado a partir de la bacteria del suelo *Streptomyces lividans* (Schrempf, H. y col. (1995)) y pudo ser purificado mediante expresión heteróloga en *E.coli* en cantidades suficientes para realizar diferentes estudios biofísicos (Heginbotham, L. y col. (1999); Meuser y col. (1998); Splitt, H. y col. (2000)).

Desde un punto de vista estructural presenta una elevada similitud con los canales de potasio eucariotas, sobre todo en la región del poro. Desde el punto de vista funcional presenta muchas similitudes con los correspondientes canales eucariotas homólogos (Meuser y col. (1998); Zagotta, W. N. y col. (2006); Bixby, K. A. y col. (1999); LeMasurier, M. y col. (2001); Molina, M. L. y col. (2006); Cordero-Morales, J. F. y col. (2007)).

El gen *kcsA* presenta una pauta de lectura abierta que consta de 483 pb con un alto contenido de G+C (70,6%) y codifica para una proteína de 17.6 kDa (Fig. 1). En la secuencia primaria se reconoce fácilmente la secuencia del filtro de selectividad típica de los canales de  $K^+$  y el análisis de hidrofobicidad predice la existencia de dos hélices transmembrana (Schrempf, H. y col. (1995)). Mediante la purificación posterior a la clonación se comprobó que KcsA es una proteína de membrana homotetramérica que funciona como un canal selectivo a  $K^+$  (Heginbotham, L. y col. (1998); LeMasurier, M. y col. (1999)) y es bloqueado por  $Na^+$ ,  $Ba^{2+}$  y sales de amonio cuaternarias, entre otros (LeMasurier, M. y col. (1999); Kutluay, E. y col. (2005)).



**Figura 1:** Secuencia nucleotídica (negro) y aminoacídica (color) del canal de potasio KcsA. La secuencia comienza en el extremo N-terminal y finaliza en el C-terminal. En rojo se resalta los aminoácidos que forman la hélice transmembrana 1 (M1) y en amarillo la M2. En verde se muestra la zona del poro, y subrayada se presenta la secuencia de la firma que forma el filtro de selectividad. En azul se presentan los aminoácidos correspondientes a los dominios N y C- terminales.

Otra consecuencia de la purificación exitosa de esta proteína de membrana fue la obtención de cristales y su resolución por difracción de rayos X, lo cual supuso la definición por primera vez de la estructura de un canal iónico a nivel atómico (Doyle, D. A. y col. (1998)).

En este cristal se observó que KcsA es una proteína organizada como un homotetrámero con subunidades de 160 aminoácidos, cada una de las cuales posee un extremo N- y C-terminal citoplásmicos, además de dos hélices transmembrana conectadas por otra hélice corta y la llamada región del poro que contiene la secuencia consenso característica que define el filtro de permeabilidad iónico (TVGYG) de los canales de potasio.

### 1.3.2 Características funcionales.

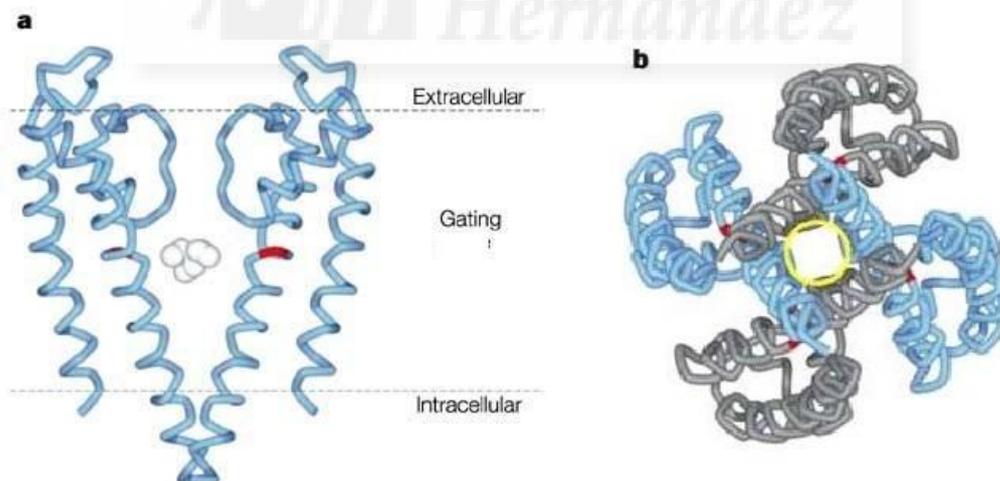
KcsA presenta una alta selectividad por  $K^+$  frente a  $Na^+$  activándose mediante protones que actúan en la zona intracelular de la proteína (Cuello, L. G. y col. (1998); Heginbotham, L. y col. (1999); Thompson, A. N. y col. (2008)) y tras la apertura, el canal entra en un estado inactivado del cual se recupera lentamente, por lo cual su probabilidad de apertura es bastante baja ( $\sim 0,1$ ). (Chakrapani, S. y col. (2007); Gao, L. y col. (2005); Cordero-Morales, J. F. y col. (2006)).

Blunck y col. (2006) detectaron mediante técnicas fluorescentes que KcsA posee lo que denominaron dos puertas de “gating”. Una de ellas está representada por el entrecruzamiento entre la zona C-terminal de las hélices M2 (residuos 112 a 119), la cual es sensible a pH ácido (Cuello, L y col. (1998); Heginbotham, L. y col. (1999)). La segunda puerta de “gating” correspondería al filtro de selectividad, el cual, dado sus características dinámicas, puede cambiar su conformación de acuerdo al tipo de iones presentes, al voltaje aplicado y al paso desde el estado abierto al estado inactivado.

### 1.3.3 Características estructurales.

Como se ha mencionado previamente, la obtención de la estructura cristalográfica de alta resolución de KcsA, llevada a cabo por el grupo de Roderick MacKinnon en 1998, supuso una revolución en el campo de los canales iónicos, ya que permitió conocer en detalle la organización de dichas proteínas y permitió establecer las bases estructurales de la conducción iónica.

La primera estructura se estableció a 3,2 Å de resolución, aunque ésta fue posteriormente mejorada hasta 2,0 Å mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que se une a la zona extracelular del canal. En ambas publicaciones se pudo determinar únicamente la región transmembrana de KcsA (residuos 23-119), la cual presenta forma de cono invertido, participando la región del poro en el canal acuoso por donde transitan los iones. El diámetro del lado intracelular es de unos 25 Å, mientras que el lado periplásmico mide unos 40 Å. La región transmembrana tiene unos 34 Å de longitud. (Fig. 2).



**Figura 2:** Representación de la topología del canal de potasio KcsA, un tetrámero formado por cuatro monómeros. **A:** Vista lateral insertado en la membrana. **B:** Vista desde arriba. Figura tomada de Kenton J. Swartz. Towards a structural view of gating in potassium channels. Nature Reviews Neuroscience 5, 905-916 (Diciembre 2004).

## 1.4 Producción de proteínas recombinantes mediante expresión heteróloga en *E.coli*.

La expresión de genes clonados en *E.coli* para la producción de proteínas recombinantes ha proporcionado un valioso sistema para el estudio de la estructura y función de estas macromoléculas. De hecho, un gran número de proteínas, tanto procariotas como eucariotas, han logrado ser purificadas en estos sistemas, lo que supone una de las bases de la industria biotecnológica.

Las proteínas pueden ser producidas tanto en el citoplasma como en el espacio periplásmico de *E.coli*. Aunque las primeras suelen purificarse más fácilmente, suelen presentar problemas de formación de agregados dentro de cuerpos de inclusión insolubles. En nuestro caso de interés, KcsA, al ser una proteína de membrana, se ubica fundamentalmente en la membrana plasmática de *E.coli*.

El primer paso en la producción de proteínas recombinantes lo constituye la selección de un vector de expresión y de una cepa bacteriana adecuados. En general se utilizan cepas de *E.coli* que presentan resistencia a algún antibiótico, la cual facilita posteriormente la selección de colonias que porten el plásmido, y a su vez evita la posible contaminación del cultivo durante el proceso de producción. Los avances en el conocimiento de la fisiología de *E.coli* y en el desarrollo de herramientas moleculares han permitido la obtención de cepas diseñadas específicamente para la producción de proteínas recombinantes. En el caso de KcsA, las cepas utilizadas son *E.coli* M15 y BL21. La cepa recombinante M15 es la más utilizada actualmente en el laboratorio donde se ha realizado este proyecto, entre sus características se destaca la resistencia intrínseca a kanamicina. Por otra parte la cepa recombinante BL21 es la preferida en el ámbito industrial. Además de carecer de las proteasas Lon y Omp-t (lo cual reduce considerablemente la degradación de la proteína recombinante dentro de la bacteria), produce bajas cantidades de acetato (un subproducto metabólico altamente indeseable), lo que resulta ampliamente atractivo.

Con respecto a la selección del vector, ésta dependerá de la cepa de *E.coli* elegida y del tipo de regulación necesaria sobre la expresión proteica basal. Los vectores de expresión son plásmidos que contienen, entre otros, los siguientes elementos:

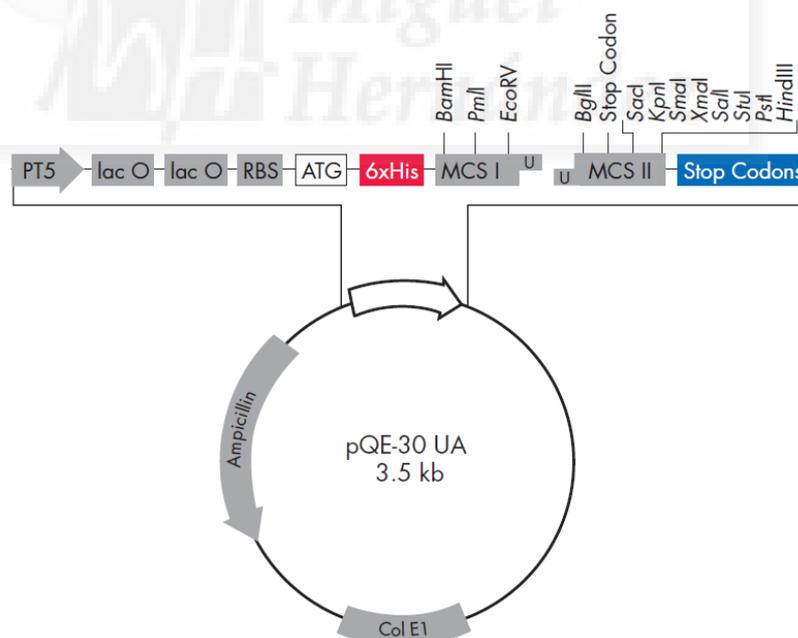
- Un promotor eficiente, dotado de las regiones conservadas -35 (TTGACA o parecida) y -10 (TATAAT o parecida).
- A corta distancia del promotor, una región que al transcribirse suministre el sitio de entrada al ribosoma: la denominada secuencia de Shine-Delgarno, que es complementaria al extremo 3' del ARNr 16S.

- A unos 3-11 pb aguas abajo de la secuencia de Shine-Delgarno, debería situarse el codón ATG que señala el comienzo de la traducción del ARNm. Este codón lo puede suministrar el gen a clonar, o bien el vector puede disponer de ese codón, seguido de alguna diana que permita la inserción del gen a expresar.
- Situado al lado 3' de todo lo anterior, una secuencia que funcione como terminador de la transcripción (que en su forma de ARN constituye la típica horquilla por emparejamiento intracatenario, donde la ARN polimerasa se disocia del ARN recién formado).
- Sistema de inducción de expresión de la proteína de interés.
- Gen de resistencia a antibiótico.

Los promotores regulables de *E. coli* que se emplean en los vectores de expresión más habituales son promotores fuertes pero que bajo ciertas condiciones están reprimidos por las correspondientes proteínas represoras, lo que suministra la base para inducir o desreprimir el gen adyacente a voluntad. Entre ellos se encuentra el operón lac ó el trp.

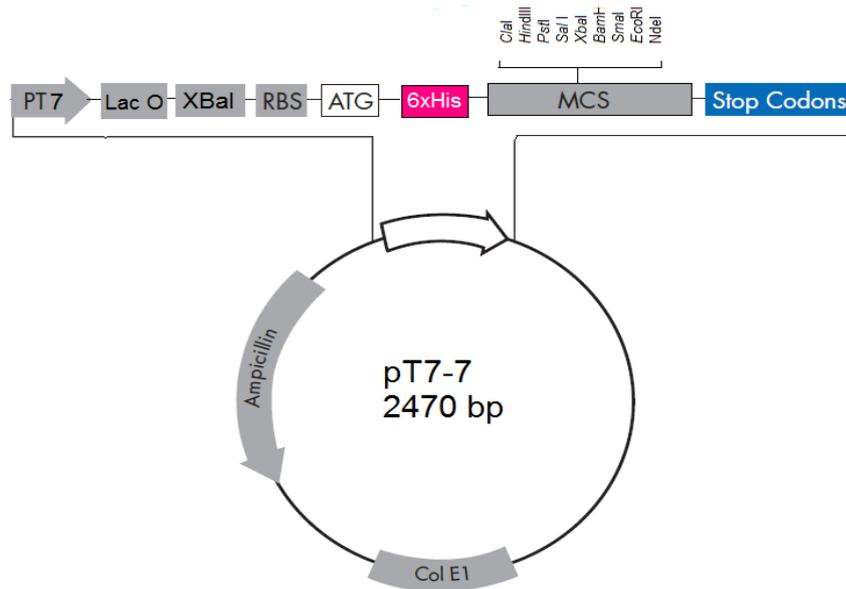
Los vectores de expresión utilizados actualmente en el laboratorio para la producción de KcsA son:

- El vector pQE30 (Qiagen) para las células M15-WT, que presenta los siguientes componentes:



**Figura 3: componentes del plásmido pQE30.** PT5: promotor de T5, lac O: operador lac, RBS: sitio de unión del ribosoma, ATG: codón de iniciación, 6xHis: secuencia de hexahistidinas (*tag*), MCS I y MCS II: sitios de clonado múltiples, Stop Codons: codones de terminación para los tres marcos de lectura, Col E1: origen de replicación, Ampicillin: gen de resistencia a ampicilina.

- El vector pT7-7 KcsA para las células BL21-WT, que presenta los siguientes componentes:



**Figura 4: componentes del plásmido pT7-7.** PT7: promotor de T7, lac O: operador lac RBS: sitio de unión del ribosoma, ATG: codón de iniciación, MCS: sitios de clonado múltiples, 6xHis: secuencia de hexahistidinas (*tag*), Stop Codons: codones de terminación para los tres marcos de lectura, Col E1: origen de replicación, Ampicillin: gen de resistencia a ampicilina.

La inserción del vector plasmídico en las bacterias se denomina transformación. Para llevar a cabo este proceso, las células deben ser competentes, es decir, deben permanecer en un estado en el que se permita la captación de ADN del medio ambiente que las rodea. Algunas bacterias son naturalmente competentes, pero las cepas utilizadas en el laboratorio deben ser sometidas a procesos como electroporación o tratamiento con cloruro de calcio para alcanzar este estado. Durante el proceso de transformación, las bacterias competentes son incubadas con el vector de expresión y sometidas a un choque térmico que permite la entrada del material genético dentro de la célula. Como se ha comentado previamente, las células que sí incorporaron el plásmido son seleccionadas mediante siembra en medio sólido (normalmente LB-agar) en presencia de concentraciones suficientes de antibióticos en las que sólo sobrevivirán las bacterias transformadas exitosamente. Como los vectores pQE30 y pT7-7KcsA con el gen presentan resistencia a ampicilina, la selección de las bacterias transformadas se realiza en presencia de kanamicina y ampicilina para la cepa M15 y en presencia de ampicilina para la cepa BL21.

## 2 OBJETIVOS

Los objetivos del presente proyecto son:

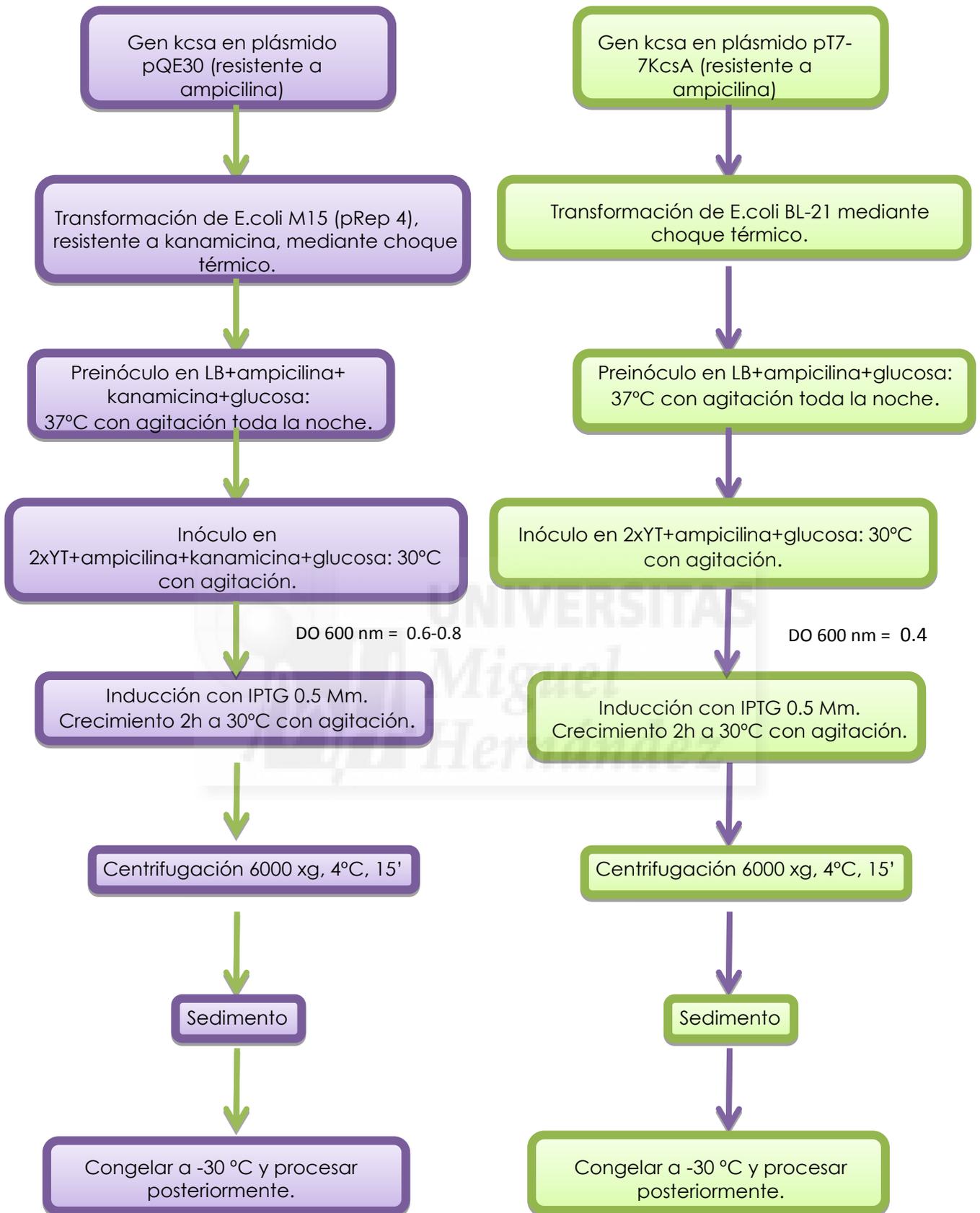
- ❖ Comparar el rendimiento de la expresión de KcsA-WT en las cepas BL21 y M15.
- ❖ Comparar la función de KcsA expresado en BL21 y M15.

## 3 METODOLOGÍA

### 3.1 Obtención de las proteínas recombinantes expresadas en *E.coli*.

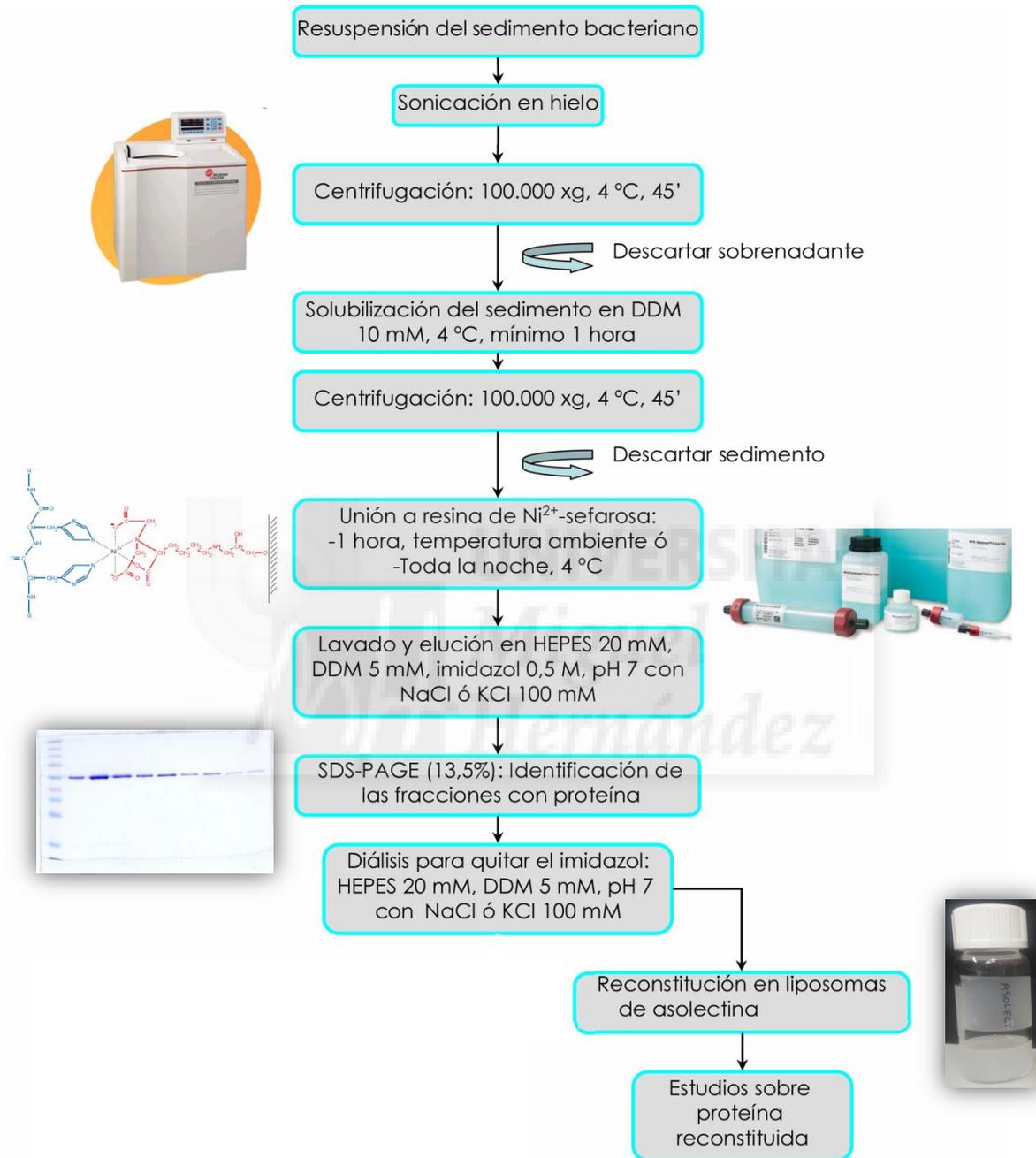
Tras el proceso de transformación y la posterior incubación de las células competentes, se selecciona una de las colonias positivas y se les inocula en medio líquido suplementado con los antibióticos adecuados. Se las deja crecer en condiciones apropiadas de temperatura y agitación hasta alcanzar la fase semilogarítmica del crecimiento.

Alcanzada esta fase se procede a la inducción de la expresión proteica recombinante mediante diversas sustancias químicas tales como isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG), análogo de la lactosa y regulador por tanto del operón lac que controla la expresión de la información contenida en nuestro plásmido. El período y condiciones para la expresión posterior a la inducción son muy variables y deben ser ensayadas para cada proteína. En el caso de KcsA, la inducción se realiza mediante la adición al medio de cultivo de IPTG 0,5 mM y se deja crecer a las células durante 2 horas a 30 °C con agitación (Esq 1.).



**Esquema 1:** representación de los principales pasos a seguir para la producción heteróloga del canal KcsA en *E.coli*.

Finalizada la expresión proteica, el sedimento bacteriano obtenido se somete a diferentes procesos de ruptura y homogenización para la posterior purificación de la proteína, generalmente mediante algún tipo de procedimiento cromatográfico (Esq 2.)



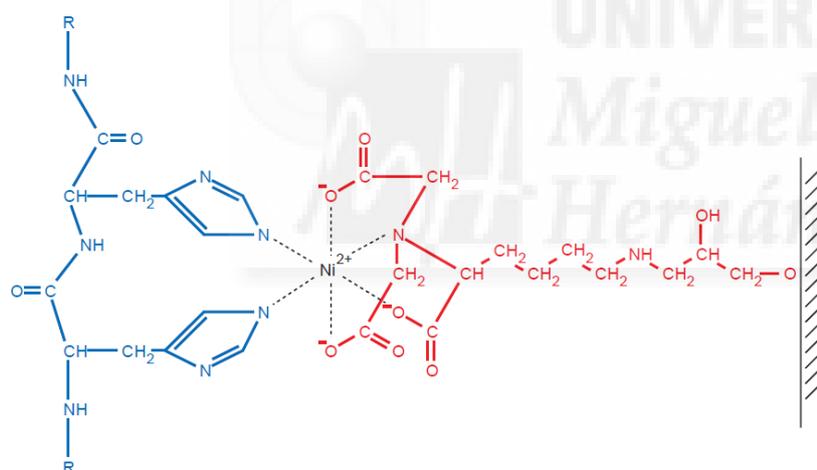
**Esquema 2:** ilustración resumida de la purificación de KcsA a partir de los sedimentos de *E.coli* donde se indujo la producción de la proteína.

### 3.2 Técnica cromatográfica.

La cromatografía es una técnica que permite separar físicamente distintos compuestos de una mezcla (Splitt, H. y col. (2000)).

A lo largo de este trabajo hemos empleado principalmente la cromatografía de afinidad. Particularmente, esta técnica se ha utilizado durante la purificación de KcsA del extracto de proteínas de membrana de *E.coli* solubilizado en el detergente  $\beta$ -D-dodecilmaltósido (DDM).

Como se ha descrito previamente, tanto el plásmido pQE30 como el pT7-7, empleados para la expresión de KcsA, proveen al canal de una cola de seis histidinas ubicadas en el extremo N-terminal de la proteína. El uso de este tipo de “colas” de histidina permite su unión específica a una matriz o fase estacionaria que contiene grupos quelantes de  $\text{Ni}^{2+}$ , el cual forma un complejo de coordinación entre los componentes de la fase estacionaria y el grupo imidazol de los residuos de la cola de histidinas (Fig. 5). Este tipo particular de proceso también se denomina cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).



**Figura 5:** esquema de unión de 2 residuos de histidina presentes en la cola de 6xHis al  $\text{Ni}^{2+}$  conjugado a la fase estacionaria.

La unión de KcsA a la resina se lleva a cabo al menos durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se carga en una columna cromatográfica de tamaño adecuado y se lava con suficiente tampón para eliminar las proteínas que interaccionan débilmente o no interaccionan con la matriz. La elución de la fase estacionaria se lleva a cabo mediante la adición de tampón con imidazol a elevada concentración (0,5 M), el cual desplaza a las histidinas unidas al  $\text{Ni}^{2+}$ . De esta manera se recogen diferentes fracciones del eluido, entre las cuales están las que contienen la proteína. La detección de las fracciones proteicas se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (13,5%) con SDS y posterior tinción con azul de Coomasie.

### 3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Las biomoléculas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, son polielectrolitos que en solución acuosa y bajo la acción de un campo eléctrico, se moverán hacia el correspondiente electrodo, ánodo o cátodo, según su carga. A este fenómeno de transporte de partículas cargadas en solución se le denomina electroforesis. (Barceló Mairata, F. et col (2003)).

Las muestras se preparan en tampón de carga, que presenta una composición típica de: Tris 35 mM, pH 6.8, SDS 70 mM, glicerol 4% (aumenta la densidad de la solución) y azul de bromofenol 0,1% (marcador del frente de electroforesis). El gel donde se siembran las muestras mezcladas con el tampón de carga se forma por la polimerización de una mezcla de acril-bisacrilamida, en una proporción variable según el tamaño de las proteínas que se deseen observar. En el formato vertical de geles de poliacrilamida, el gel se prepara generalmente en dos fases. La primera (superior) corresponde al gel concentrador (Tabla 1), el cual tiene una baja concentración de acrilamida (~ 4%) y cuya función es concentrar la muestra previamente al paso por el gel separador (inferior), de mayor porcentaje (Tabla 2).

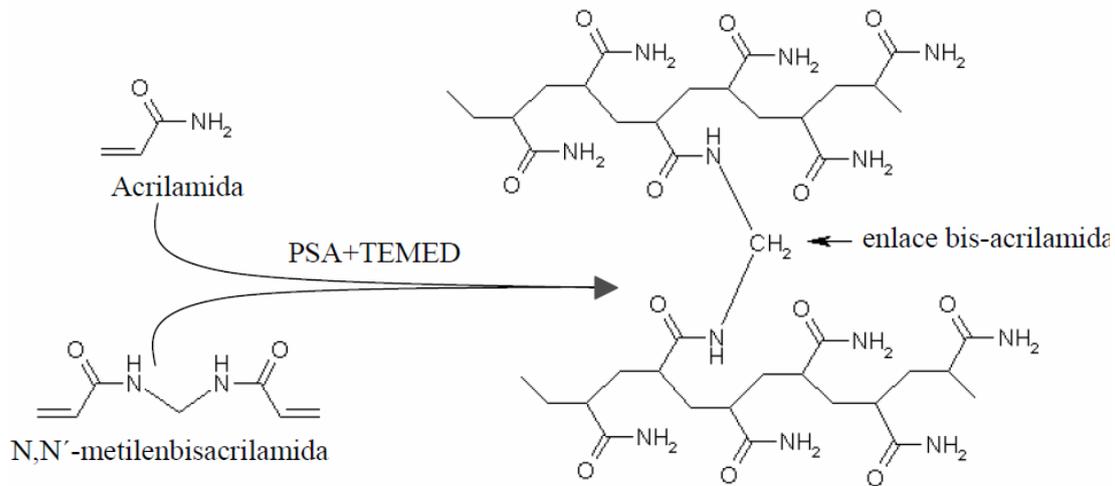
Gel Concentrador. Para 5 mL al 4%	
Agua Destilada	3,05 ml
Tris 0.5M, pH 6.8	1,25 ml
SDS 10%	50µl
Acril:bisacril	0,65 ml
PSA (50mg en 500 mL)	35µl
TEMED	5µl

**Tabla 1.** Composición del gel concentrador.

Gel Separador específico para KcsA	
%	13'5%
Agua Destilada	2,85 ml
Tris 0.5M, pH 8.8	2,5 ml
SDS 10%	100µl
Acril:bisacril	4,5 ml
PSA (50mg en 500 mL)	65µl
TEMED	7µl

**Tabla 2.** Composición del gel separador.

La reacción de polimerización se detalla en el siguiente esquema:



**Figura 6:** esquema de la reacción de polimerización de la acrilamida para la obtención de la poliacrilamida (gel).

Tal como se detalla en la Fig. 6, a la mezcla de los monómeros acrilamida y N,N'-metilbisacrilamida se añaden los compuestos persulfato amónico (PSA) y tetrametilendiamina (TEMED). El primero actúa como iniciador de la reacción, ya que en presencia de luz se descompone dando lugar a radicales libres en solución. Por otra parte, el TEMED actúa como catalizador de la polimerización, formando radicales libres estables propagadores de la reacción. La solución tamponadora (Tris, pH8) contiene también un electrolito (generalmente glicina), que actúa como conductor.

Posteriormente a la electroforesis, los geles deben teñirse para poder observar las bandas correspondientes a las proteínas. La tinción más usual, y la que hemos utilizado, es el azul de Coomasie (Metanol, Ác. Acético, Agua (5:1:5) + 0,05% Azul de Coomasie), aunque si la cantidad de proteína es pequeña puede realizarse una tinción con nitrato de plata.

### 3.4 Espectroscopia UV-Visible.

La cuantificación de la proteína se realizó mediante espectroscopia, utilizando el coeficiente de extinción molar del KcsA (Renart, M.L (2010)).

La espectroscopia UV-Visible es, probablemente, la técnica espectroscópica más ampliamente utilizada. Se basa en la absorción de radiación ultravioleta o visible por parte de una molécula, promoviendo el paso de un electrón desde un orbital molecular fundamental a un orbital excitado.

La absorbancia (A) puede calcularse a partir de la intensidad de luz absorbida por una muestra mediante la ley de Lambert-Beer:

$$A = -\log_{10} (I/I_0) = \epsilon \cdot c \cdot l$$

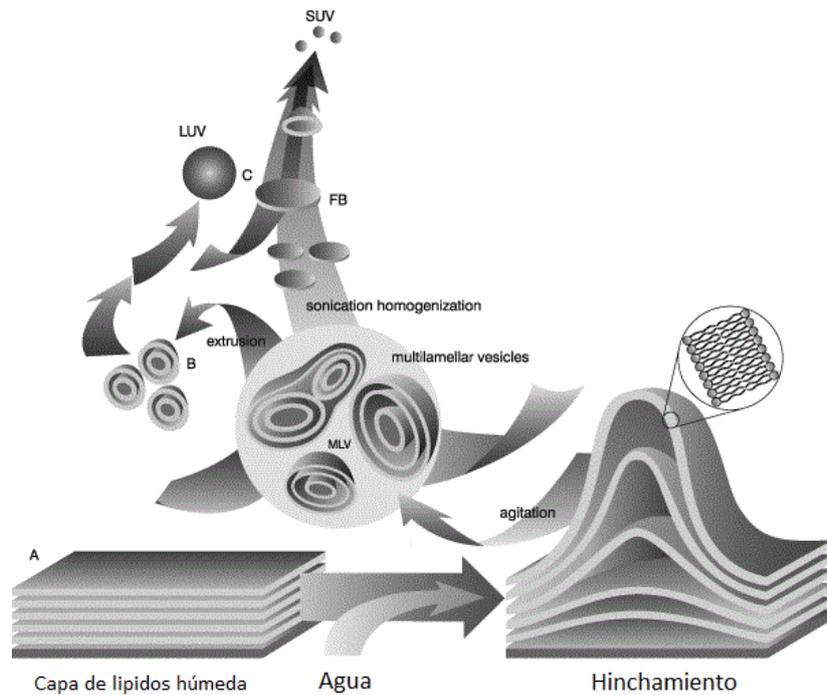
donde I e  $I_0$  corresponden a la intensidad saliente y entrante, c y l designan respectivamente la concentración molar de la muestra y el paso óptico utilizado en la medida (en cm) y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda determinada, cuyas unidades son  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

Esta ecuación puede también expresarse en términos de absorbancia, que corresponde al logaritmo de la relación entre I e  $I_0$ .

En el caso más habitual donde disponemos de suficiente cantidad de proteína pura, el método de elección para su cuantificación es la determinación espectrofotométrica de su absorbancia y el cálculo de su concentración utilizando su coeficiente de extinción molar a 280 nm y la ley de Lambert-Beer. En el caso de KcsA recién purificado, su cuantificación se realiza mediante esta metodología, utilizando su absorbancia a 280nm y un valor teórico de  $\epsilon$  de  $34.950 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  para el canal silvestre.

### 3.5 Reconstitución de KcsA- WT en liposomas de asolectina.

KcsA-WT se reconstituye en vesículas lipídicas compuestas de asolectina (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, Soy PC, Avanti Polar Lipids). La asolectina se disuelve en cloroformo y metanol con una relación 2:1. Los disolventes utilizados se evaporan usando un rotavapor. A continuación, la película lipídica seca se debe hidratar en HEPES 10 mM (pH 7,0), KCl 100 mM, a 5 mg / ml, y se sonica hasta su homogeneidad. Los liposomas de asolectina se almacenan en nitrógeno líquido hasta su uso (Fig. 7).



**Figura 7:** Preparación de liposomas, formación de vesículas de asolectina.

Para la reconstitución de proteínas, las vesículas de asolectina se solubilizan con DDM a una relación molar de 0,8 detergente / lípido y se mezclan con KcsA purificado a una relación molar de 10.000: 1. La mezcla se incuba al menos 1 hora a temperatura ambiente.

El detergente se elimina utilizando Bio-Beads SM-2. Las Bio-Beads se agregan a una relación molar de 100:1 atendiendo a la cantidad de DDM utilizado y luego se dejan en la noria durante toda la noche. Después de desechar las Bio-Beads, las vesículas reconstituidas que contienen las proteínas se recogen por centrifugación (60 minutos a 300.000 xg). Finalmente el sedimento se suspende en 10 mM HEPES (pH 7,0), KCl 100 mM a una concentración de lípido de 0,3 mg / L.

Las muestras que se obtienen se almacenan a -80 °C.

Para formar liposomas gigantes multilaminares, se colocan 5 µl de la mezcla de las proteínas con los liposomas en un portaobjetos de vidrio y se deja secar durante toda la noche en un desecador a 4°C. Al día siguiente la muestra se rehidrata con 20 o 10 µL de HEPES (pH 7.0).

### 3.6 Medidas funcionales.

Para la caracterización funcional del canal KcsA obtenido se llevaron a cabo medidas electrofisiológicas.

La electrofisiología tuvo su origen en los trabajos de los pioneros sobre el estudio de la excitabilidad del nervio y del músculo, y dio lugar a descripciones fenomenológicas y cuantitativas de la excitación mucho antes de que se tuviera conocimiento de los componentes moleculares de las membranas biológicas. Las primeras aproximaciones experimentales al estudio de las membranas excitables consistían en la aplicación externa de corrientes y la determinación de los cambios que tenían lugar en el potencial de membrana.

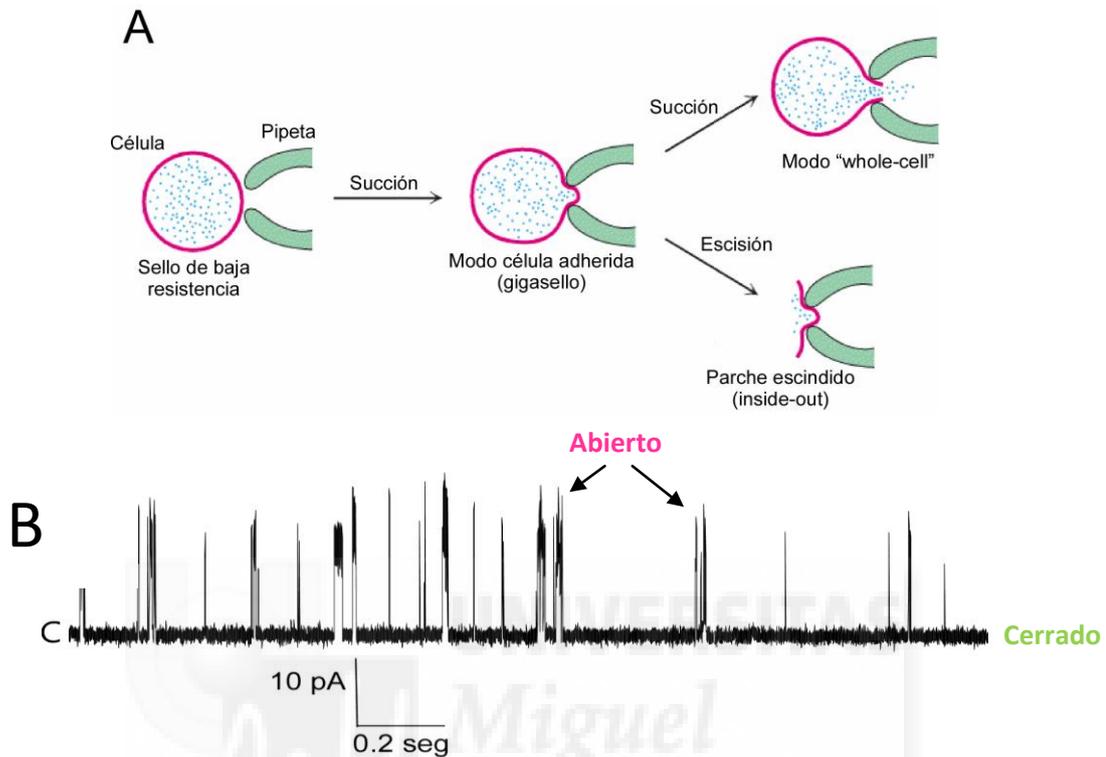
Sin embargo, el avance primordial en la biofísica del impulso nervioso no tuvo lugar hasta la aparición de la técnica de pinzamiento de voltaje (o *voltaje clamp*). Esta técnica fue desarrollada por Marmont, Cole, Hodgkin, Huxley y Katz, alrededor del año 1949. Aunque cabe destacar que la mayor parte de nuestro conocimiento actual de los canales iónicos procede de la técnica del pinzamiento zonal de membrana (*patch-clamp*), desarrollada en 1976 por Edwin Neher y Bert Sakmann, que les valió el Premio Nobel en 1991. Esta técnica permite el registro de corrientes iónicas a través de zonas minúsculas de membranas celulares (o *parches*).

La técnica consiste esencialmente en formar un sello de alta resistencia entre la punta de una micropipeta de vidrio (que actúa como electrodo) y la superficie de la membrana. Hacia 1982 ya se habían desarrollado técnicas para cerrar el fragmento de membrana contra la pipeta obteniéndose resistencias de registro del orden de gigaohmios (*gigaseal*), lo que permitía registrar corrientes de hasta 0,1 pA.

Este grado de sensibilidad permitió detectar las corrientes iónicas debidas a canales iónicos aislados, de ahí la importancia de esta técnica en el estudio de estas proteínas de membrana. El flujo de iones que circulan a través de un solo canal y las transiciones entre sus estados abierto y cerrado pueden visualizarse directamente con un tiempo de resolución de microsegundos. Además puede observarse directamente la actividad de los canales en su entorno de membrana nativa e incluso en células intactas.

La técnica de pinzamiento zonal de membrana admite diversas variantes. El registro puede realizarse sobre "célula completa" (*whole-cell recording*) o sobre un parche escindido de una membrana celular o artificial.

Según como se realice este parche, el contenido intracelular puede quedar en contacto con el baño (configuración interior-fuera o *inside-out*) o con el interior de la pipeta (configuración exterior-fuera o *outside-out*) (Fig. 8, panel A)



**Figura 8. A:** representación de la formación del sello de alta resistencia en la técnica de patch-clamp, en dos de sus variantes, “*whole-cell*” y parche escindido “*inside-out*”. **B:** representación de un registro de KcsA de canal único. El eje x representa el tiempo, y el eje Y la corriente medida. Los pulsos que aparecen en un registro de canal unitario son cuadrados y corresponden a las transiciones finitas entre los estados cerrado (no conductor) y abierto (conductor) del canal. En este caso, la corriente transportada es de 10 pA y el estado abierto lo representan las espigas que “caen” desde la línea base (estado cerrado).

Las corrientes iónicas registradas en los experimentos típicos de pinzamiento zonal de membrana responden a la apertura o cierre de un número pequeño de canales aislados y son, por lo tanto, de naturaleza aleatoria. La apertura del canal se refleja en aumentos o disminuciones repentinas en la intensidad de corriente registrada por el dispositivo de medida, según el sentido de la corriente iónica (Fig. 8 panel B). La intensidad de corriente se considera positiva cuando está dirigida desde el interior celular al exterior.

Los canales iónicos permiten corrientes de varios picoamperios, que corresponden al paso de unos  $10^8$  iones por segundo a través de un canal. La conductancia de los canales iónicos varía entre 2 y 500 pS. El análisis de los fenómenos unitarios es de naturaleza estadística.

La altura del pulso corresponde a la intensidad de corriente que atraviesa un único canal, de este modo, si en el registro hay dos canales activos, se observará una mezcla de intensidad unitaria y doble, que corresponderá a la apertura simultánea de los dos canales. Otros parámetros derivados del análisis de una población estadísticamente significativa de aperturas y cierres son:

- Tiempos de residencia en los estados abierto y cerrado
- Histograma de amplitudes
- Conductancia unitaria
- Probabilidad de apertura

Además, la posibilidad de añadir diferentes sustancias a la disolución que baña el sello permite evaluar la capacidad de una sustancia de bloquear o modificar la conducción iónica del canal en estudio. También puede estimarse la selectividad del canal mediante la comparación de las intensidades de corriente registradas en condiciones bi-iónicas, es decir, en presencia del ión permeante y del que se quiera evaluar.

### 3.6.1 Condiciones registros.

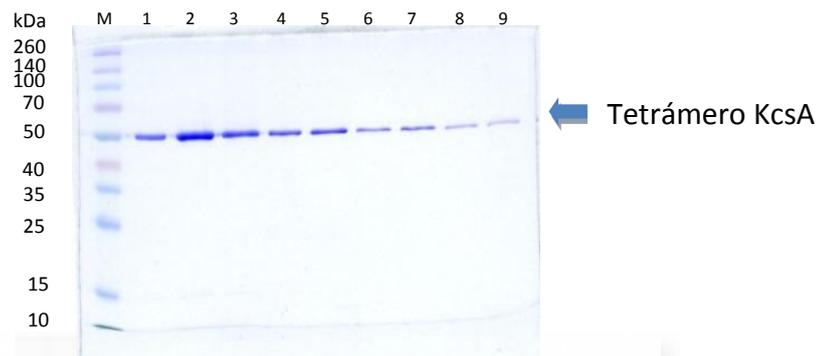
Los registros de patch clamp se realizaron en parches formados por liposomas gigantes usando un sistema automático de patch clamp (Nanion Technologies, Germany). Se utilizaron chips de borosilicato con resistencias de 8 M $\Omega$ . Al comenzar, se aplicó una presión negativa para colocar una vesícula de asolectina en la abertura del chip y como resultado se formó una bicapa lipídica planar en la apertura, dando lugar a un sello. Después de la formación del sello, se llevó a cabo un lavado con el correspondiente buffer intracelular. Las corrientes se registraron usando un amplificador EPC-10 con una ganancia de 50 mV/PA. Los datos fueron digitalizados a 8 kHz y se analizaron utilizando el programa de ordenador Clampfit. Todas las medidas fueron tomadas a temperatura ambiente, con una solución extracelular compuesta por el buffer 10 mM HEPES (pH 7) y una solución intracelular compuesta por el buffer 10 mM MES (pH 4), ambas soluciones con las condiciones iónicas indicadas (100 mM KCl).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Purificación de KcsA en BL21.

En la producción heteróloga del canal KcsA en *E.coli*, después del paso de centrifugación, se obtuvo un sedimento de 99,4 gramos para la cepa BL21.

Tras realizar la purificación de la proteína, producida por ambas cepas, realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida obteniendo los siguientes datos:

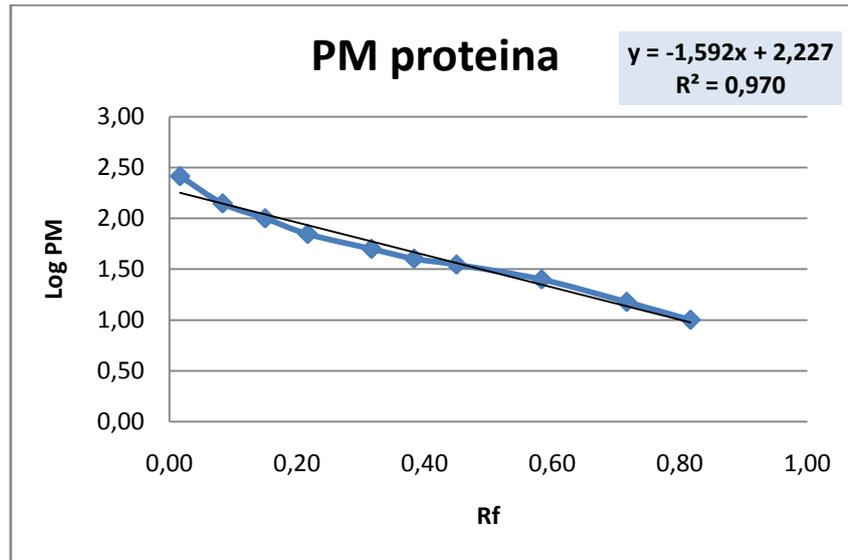


**Figura 9.** Gel obtenido tras realizar la purificación de la proteína KcsA producida por la cepa BL21.

Con los datos que sacamos de este gel podemos obtener el peso molecular.

PM (kDa)	log PM	cm bandas	Rf
260	2,41	0,1	0,02
140	2,15	0,5	0,08
100	2,00	0,9	0,15
70	1,85	1,3	0,22
50	1,70	1,9	0,32
40	1,60	2,3	0,38
35	1,54	2,7	0,45
25	1,40	3,5	0,58
15	1,18	4,3	0,72
10	1,00	4,9	0,82

\*Para el cálculo de la Rf, la longitud total del gel fue de 6 cm.



Mediante la ecuación obtenida de la recta ( $y = -1,592x + 2,227$ ) y sabiendo que nuestra banda de proteína está a una Rf (x) de 0,27 podemos calcular el PM (y) de la proteína obtenida.

$$y = -1,592 \cdot 0,27 + 2,227 \rightarrow y = 1,8$$

Como el resultado obtenido es el logaritmo del peso molecular, sacamos el peso molecular.

$$\text{PM proteína} = 10^{1,8} = \mathbf{63,1}$$

Para medir la concentración de la proteína, primeramente quitamos el imidazol de la muestra mediante una diálisis, para este paso separamos la muestra en dos tubos. Uno de los tubos contiene la proteína concentrada que se corresponde con las calles 1, 2 y 3 del gel, mientras que el otro tubo contiene la proteína diluida que se corresponde con las calles 4, 5, 6, 7 y 8. Esta división de la proteína se lleva a cabo para que se puedan realizar experimentos tanto a nivel funcional como a nivel estructural. Posteriormente se midió la absorbancia a 280 nm de ambos tubos para obtener la concentración de la proteína. Para poder realizar este último paso es necesario diluir ya que nuestro volumen de muestra es grande, por esta razón, tuvimos que diluir ambos tubos 13 veces con tampón. Una vez obtenida la absorbancia realizamos el siguiente cálculo:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Donde A es la absorbancia de la muestra,  $\epsilon$  es  $34.950 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  c es la concentración de la proteína y l es 1 cm.

a) Proteína concentrada, absorbancia a 280 nm de 0,036 en 4mL.

$$0,036 = 34950 \cdot c \cdot 1$$

$$c = 1,05 \mu\text{M} \cdot 13 = \mathbf{13,61 \mu\text{M}}$$

b) Proteína diluida, absorbancia a 280 nm de 0,016 en 7mL.

$$0,016 = 34950 \cdot c \cdot 1$$

$$c = 0,47 \mu\text{M} \cdot 13 = \mathbf{6,17 \mu\text{M}}$$

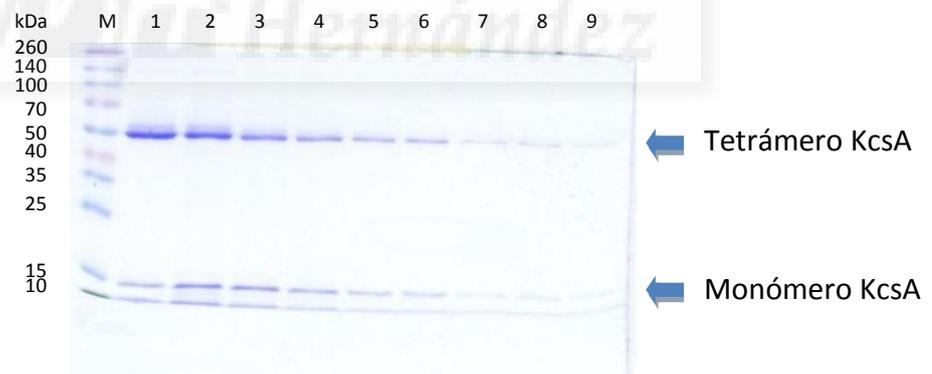
c) Proteína total.  $M = \text{mol/L}$ ; 1 mol de proteína = 17,6936 mg de proteína.

$\mu\text{M}$ Proteína	mg/ml Proteína	mg Proteína
19,78	0,35	1,72

## 4.2 Purificación de KcsA en M15.

En la producción heteróloga del canal KcsA en *E.coli*, después del paso de centrifugación, se obtuvo un sedimento de 97,3 gramos para M15.

Tras realizar la purificación de la proteína, producida por ambas cepas, realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida obteniendo los siguientes datos:

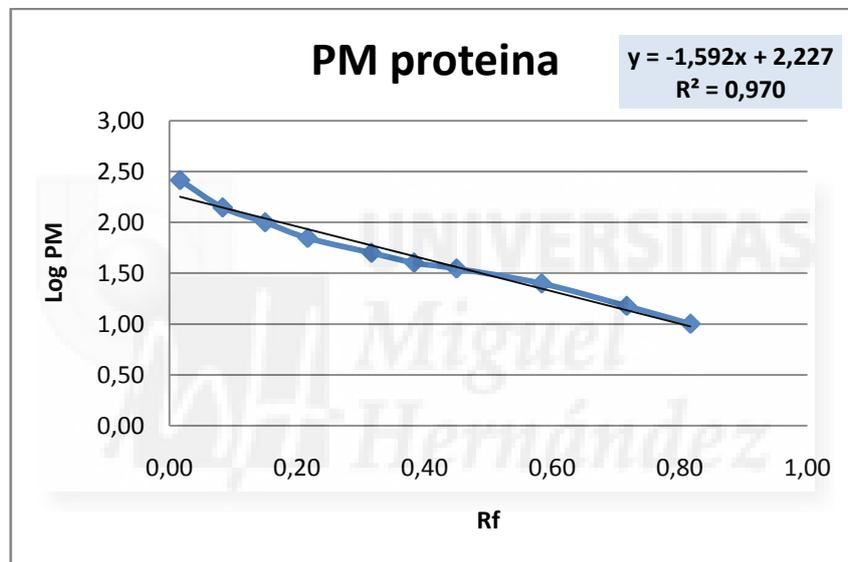


**Figura 10.** Gel obtenido tras realizar la purificación de la proteína KcsA producida por la cepa M-15.

Con los datos que sacamos de este gel podemos obtener el peso molecular.

PM (kDa)	log PM	cm bandas	Rf
260	2,41	0,1	0,02
140	2,15	0,5	0,08
100	2,00	0,9	0,15
70	1,85	1,3	0,22
50	1,70	1,9	0,32
40	1,60	2,3	0,38
35	1,54	2,7	0,45
25	1,40	3,5	0,58
15	1,18	4,3	0,72
10	1,00	4,9	0,82

\*Para el cálculo de la Rf, la longitud total del gel fue de 6 cm.



Mediante la ecuación obtenida de la recta ( $y = -1,592x + 2,227$ ) y sabiendo que nuestra banda de proteína está a una Rf (x) de 0,27 podemos calcular el PM (y) de la proteína obtenida.

$$y = -1,592 \cdot 0,27 + 2,227 \rightarrow y = 1,8$$

Como el resultado obtenido es el logaritmo del peso molecular, sacamos el peso molecular.

$$\text{PM proteina} = 10^{1,8} = \mathbf{63,1}$$

En este caso, encontramos también otra banda, en la parte inferior (Rf= 0,70) del gel cuyo peso molecular es de:

$$y = -1,592 \cdot 0,70 + 2,227 \rightarrow y = 1,11$$

$$\text{PM proteina} = 10^{1,11} = \mathbf{13}$$

Concentración de la proteína:

a) Proteína concentrada, absorbancia a 280 nm de 0,052 en 3'5mL.

$$0,052 = 34950 \cdot c \cdot 1$$

$$C = 1,49 \mu\text{M} \cdot 13 = \mathbf{19,45 \mu\text{M}}$$

b) Proteína diluida, absorbancia a 280 nm de 0,009 en 5mL.

$$0,009 = 34950 \cdot c \cdot 1$$

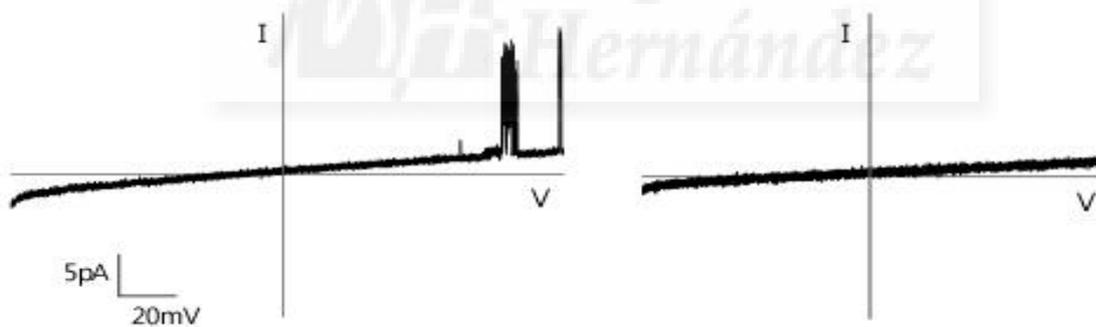
$$C = 0,28 \mu\text{M} \cdot 13 = \mathbf{3,72 \mu\text{M}}$$

c) Proteína total. M = mol/L; 1 mol de proteína = 17,6936 mg de proteína.

$\mu\text{M}$ Proteína	mg/ml Proteína	mg Proteína
23,17	0,41	1,53

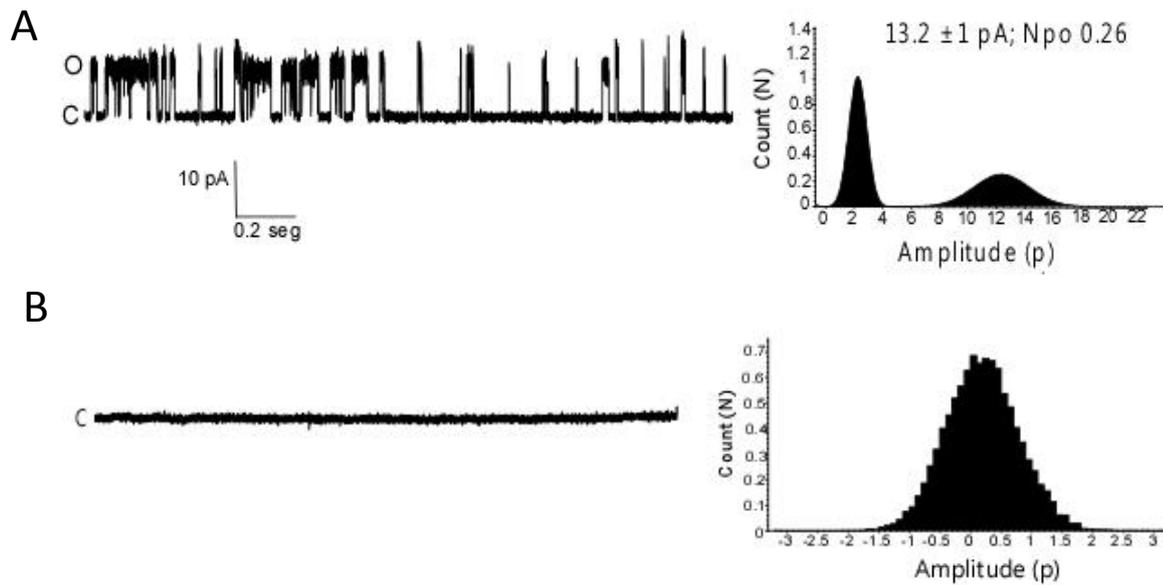
#### 4.3 Actividad de KcsA expresado en BL21.

Tras realizar la reconstitución de la proteína en lípidos de asolectina, se procedió a la medida de la actividad mediante la técnica patch-clamp obteniendo los siguientes datos:

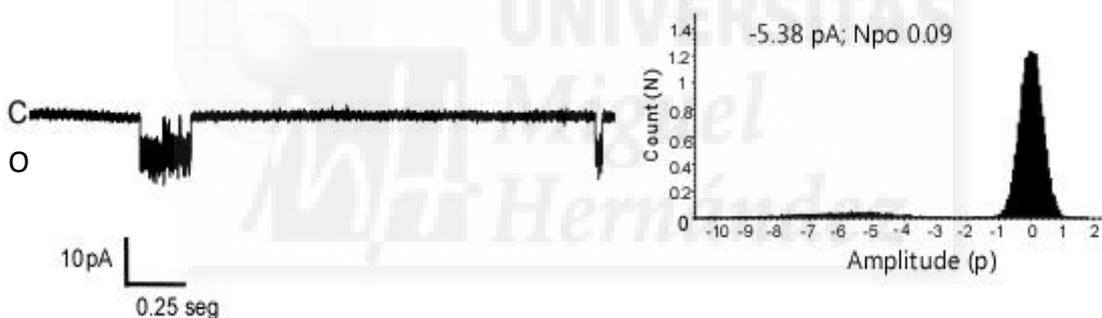


**Figura 11.** Rampas I/V obtenidas del canal iónico KcsA producido por la cepa BL21. **A:** Con 10 mM MES a pH 4.

**B:** Con 100 mM KCl, 10 mM HEPES a pH 7.



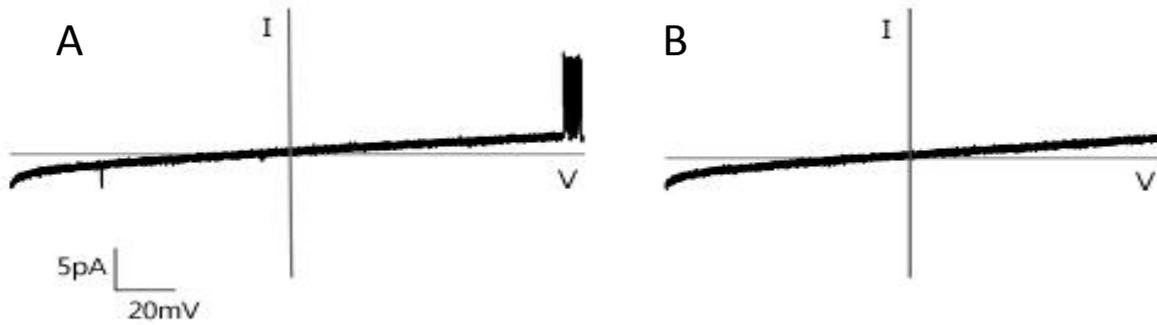
**Figura 12.** Registro de 2 segundos obtenido del canal iónico KcsA producido por la cepa BL21, en condiciones simétricas a una concentración de 100mM de KCl y a un voltaje de +150mV. **A:** Con 10 mM MES a pH 4. **B:** Con 100 mM KCl, 10 mM HEPES a pH 7.



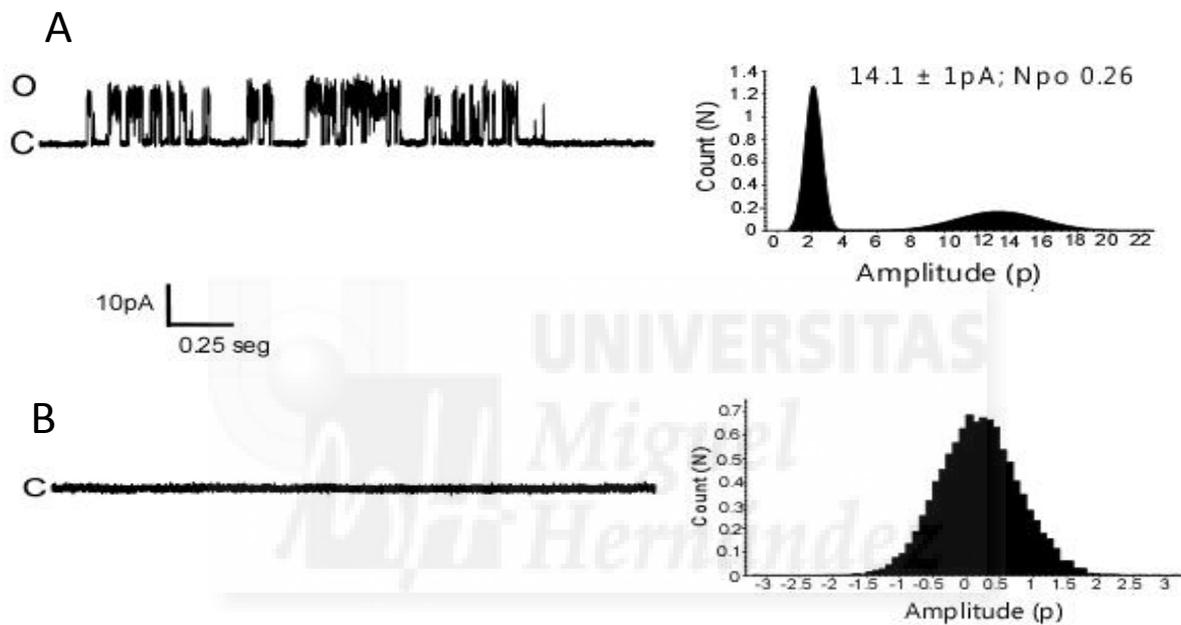
**Figura 13.** Registros de 2 segundos obtenidos del canal iónico KcsA producido por la cepa BL21, en condiciones simétricas a una concentración de 100mM de KCl y a un voltaje de -150 mV con 10 mM MES a pH 4.

#### 4.4 Actividad de KcsA expresado en M15.

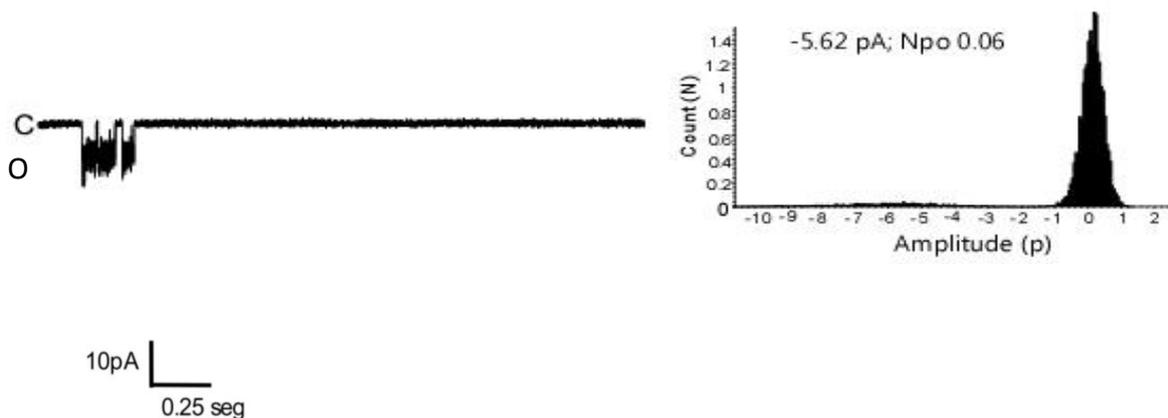
Tras realizar la reconstitución de la proteína en lípidos de asolectina, se procedió a la medida de la actividad mediante la técnica patch-clamp obteniendo los siguientes datos:



**Figura 14.** Rampas I/V obtenidas del canal iónico KcsA producido por la cepa M15. **A:** Con 10 mM MES a pH 4. **B:** Con 100 mM KCl, 10 mM HEPES a pH 7.



**Figura 15.** Registro de 2 segundos obtenido del canal iónico KcsA producido por la cepa M15, en condiciones simétricas a una concentración de 100mM de KCl y a un voltaje de +150mV. **A:** Con 10 mM MES a pH 4. **B:** Con 100 mM KCl, 10 mM HEPES a pH 7.



**Figura 16.** Registros de 2 segundos obtenidos del canal iónico KcsA producido por la cepa M15, en condiciones simétricas a una concentración de 100mM de KCl y a un voltaje de -150 mV con 10 mM MES a pH 4.

## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 Rendimiento

La cepa BL21 presentó un mayor rendimiento a la hora de producir el canal KcsA, tanto en la cantidad de proteína total obtenida como en la visualización del gel (Figs. 9 y 10).

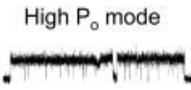
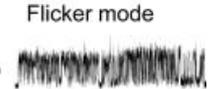
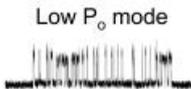
En dos litros de cultivo de BL21 y 99,4 gramos de sedimento, el rendimiento obtenido fue de 1,72 mg de proteína total y en dos litros de cultivo de M15 y 97,3 gramos de sedimento, el rendimiento obtenido fue de 1,53 mg de proteína total.

En cuanto al gel de la cepa M15 (Fig. 10) podemos observar la existencia de una banda a 13 kDa de peso molecular, correspondiente al monómero que forma parte de nuestro canal iónico cuando forma un tetrámero. Esto puede indicar que durante la purificación se ha podido producir una desnaturalización parcial de la proteína. Además, nos indica que la cepa adecuada para la realización de experimentos a nivel de estructura de este canal sería BL21 ya que la presencia de monómero en M15 podría mostrarnos resultados erróneos. En cuanto a nivel funcional, la presencia de monómero no influiría, por lo que ambas cepas son adecuadas para medir actividad.

### 5.2 Actividad

La actividad del canal en ambas cepas fue similar. Esta afirmación la podemos observar en todos los registros de actividad obtenidos.

Ha sido ampliamente documentado en la bibliografía que el canal iónico KcsA-WT puede presentar tres modos de actividad distintos (Chakrapani, S. y col. (2007)):

- 1) Alta probabilidad de apertura. 
- 2) Modo flicker. 
- 3) Baja probabilidad de apertura. 

Esta elevada variabilidad la hemos observado en el KcsA expresado por ambas cepas. En los registros de 2 segundos realizados, se puede observar que el KcsA obtenido, presenta en algunos casos el modo de baja probabilidad de apertura y en otros casos el de alta probabilidad de apertura (Figs. 12 y 15).

En nuestro caso, en estos experimentos, la conductancia con la que se abre el canal, en ambas cepas, ronda los 14 pA. Si bien en la bibliografía aparecen aperturas de diversa amplitud de corriente, esta variabilidad puede ser debida a las distintas formas de reconstitución que se llevan a cabo en los distintos laboratorios, como pueden ser bicapas planas, liposomas resultantes de la eliminación de detergente por dilución o por biobeads (como es nuestro caso). También influye el método de medidas funcionales por electrofisiología, pudiendo ser patch manual o patch automático.

Por último, observamos que a voltajes negativos (-150 mV) el canal KcsA, tiene menor probabilidad de apertura (entre 0.06-0.09) que a voltajes positivos (+150 mV) (~0.26) (Figs. 13 y 16). Este fenómeno también ha sido observado por otros autores. Una de las consecuencias puede ser que a potenciales negativos, KcsA, se inactiva más que a potenciales positivos. Según Cordero-Morales y col. (2006) el canal iónico KcsA puede mostrar dependencia de voltaje que conduce a un incremento de la probabilidad de apertura.

## 6 CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.

- La cepa BL-21 presentó mayor rendimiento que la cepa M15.
- Presencia de monómero en M15.
- La actividad del canal en ambas cepas fue similar.

Por todo lo expuesto se concluye que se puede expresar KcsA-WT en ambas cepas con buen rendimiento y actividad similar, siendo la cepa BL21 las más indicada para estudios de estructura.

En este proyecto se han obtenido resultados de un solo experimento, por lo que las conclusiones se ciñen a lo que se ha observado en él, para poder asegurar que realmente la cepa BL21 se corresponde con la de mayor rendimiento, habría que realizar más pruebas. Además, con estos experimentos, se debería comprobar si realmente aparece el monómero siempre en la cepa M15 o es debido al proceso utilizado en este caso. Finalmente, se podría hacer un estudio más exhaustivo de estructura y función del KcsA en ambas cepas.

## 7 REFERENCIAS

- Alvaro R. Lara (2011) Recombinant protein production in Escherichia Coli, Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 10, No. 2 (209-223)
- Barceló Mairata, F. (2003) Técnicas Instrumentales en Bioquímica y Biología Universitat de les Illes Balears, Palma.

- Bixby, K. A., Nanao, M. H., Shen, N. V., Kreusch, A., Bellamy, H., Pfaffinger, P. J., and Choe, S. (1999) Zn<sup>2+</sup> binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K<sup>+</sup> channels, *Nat. Struct. Biol.* 6, 38-43.
- Blunck, R., Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Perozo, E., and Bezanilla, F. (2006) Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction, *J. Gen. Physiol* 128, 569-581.
- Catterall, W. A. (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels, *Annu. Rev. Biochem.* 64, 493-531.
- Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating I: macroscopic currents, *J. Gen. Physiol* 130, 465-478.
- Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F., and Perozo, E. (2007) A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents, *J. Gen. Physiol* 130, 479-496.
- Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., and Perozo, E. (2006) Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 319-322.
- Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2006) Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 311-318.
- Cordero-Morales, J. F., Jogini, V., Lewis, A., Vasquez, V., Cortes, D. M., Roux, B., and Perozo, E. (2007) Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1062-1069.
- Cuello, L. G., Romero, J. G., Cortes, D. M., and Perozo, E. (1998) pH dependent gating in the *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channel, *Biochemistry* 37, 3229-3236.
- Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity, *Science* 280, 69-77.
- Gao, L., Mi, X., Paajanen, V., Wang, K., and Fan, Z. (2005) Activation-coupled inactivation in the bacterial potassium channel KcsA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 17630-17635.
- Gómez Moreno-Calera, C. and Sancho Sanz, J. (2003) Estructura de proteínas Ariel Ciencia.
- Heginbotham, L., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1998) Functional reconstitution of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel, *J. Gen. Physiol* 111, 741-749.
- Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1999) Single streptomyces lividans K<sup>(+)</sup> channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation, *J. Gen. Physiol* 114, 551-560.
- Heginbotham, L., Odessey, E., and Miller, C. (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel, *Biochemistry* 36, 10335-10342.

- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels, *Nature* 417, 523-526.
- Kreusch, A., Pfaffinger, P. J., Stevens, C. F., and Choe, S. (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel, *Nature* 392, 945-948.
- Kutluay, E., Roux, B., and Heginbotham, L. (2005) Rapid intracellular TEA block of the KcsA potassium channel, *Biophys. J.* 88, 1018-1029.
- LeMasurier, M., Heginbotham, L., and Miller, C. (2001) KcsA: it's a potassium channel, *J. Gen. Physiol* 118, 303-314.
- Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R., and Schrempf, H. (1999) Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*, *FEBS Lett.* 462, 447-452.
- Miller, C. (2000) An overview of the potassium channel family, *Genome Biol.* 1, REVIEWS0004.
- Molina, M. L., Barrera, F. N., Fernandez, A. M., Poveda, J. A., Renart, M. L., Encinar, J. A., Riquelme, G., and Gonzalez-Ros, J. M. (2006) Clustering and coupled gating modulate the activity in KcsA, a potassium channel model, *J. Biol. Chem.* 281, 18837-18848.
- Renart, M.L (2010) Iones y fosfolípidos como efectores en la estructura y estabilidad del canal de potasio KcsA. Tesis doctoral Instituto de Biología Molecular y Celular, Elche.
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995) A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*, *EMBO J.* 14, 5170-5178.
- Shen, N. V. and Pfaffinger, P. J. (1995) Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins, *Neuron* 14, 625-633.
- Shimizu, H., Iwamoto, M., Konno, T., Nihei, A., Sasaki, Y. C., and Oiki, S. (2008) Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating, *Cell* 132, 67-78.
- Splitt, H., Meuser, D., Borovok, I., Betzler, M., and Schrempf, H. (2000) Pore mutations affecting tetrameric assembly and functioning of the potassium channel KcsA from *Streptomyces lividans*, *FEBS Lett.* 472, 83-87.
- Suzuki, M., Takahashi, K., Ikeda, M., Hayakawa, H., Ogawa, A., Kawaguchi, Y., and Sakai, O. (1994) Cloning of a pH-sensitive K<sup>+</sup> channel possessing two transmembrane segments, *Nature* 367, 642-645.
- Thompson, A. N., Posson, D. J., Parsa, P. V., and Nimigean, C. M. (2008) Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 6900-6905.