

# Influencia de la polarización en la apertura de un canal Shaker wt

Guillermina Ramírez San Juan

22 de marzo de 2011



## Canales de $K^+$

- Tienen 4 subunidades idénticas, que rodean un poro central.
- Cada subunidad contiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6), las regiones N-terminal y C-terminal se encuentran en la parte intracelular de la membrana.
- El filtro de selectividad esta formado por una helice entre S5 y S6.
- El sensor de voltaje se encuentra en la región S4 y tiene múltiples cargas positivas.

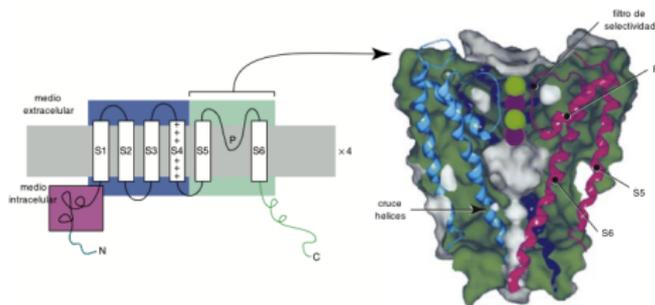
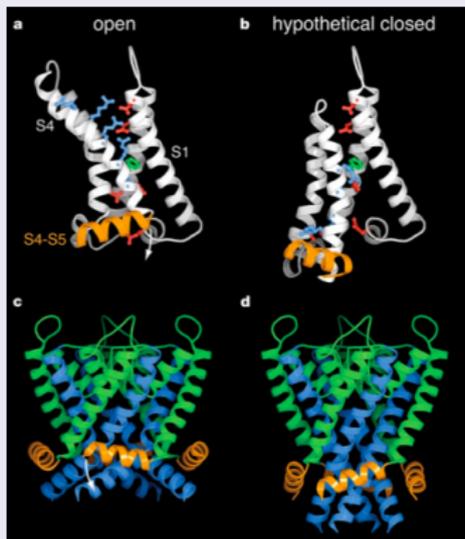


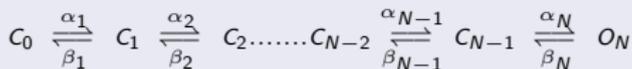
Figura: izq. Estructura esquemática de un canal de  $K^+$ . der. El canal de Potasio KcsA.

# Mecanismo de compuerta del Canal

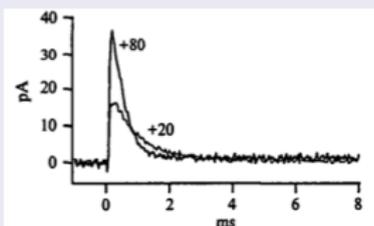
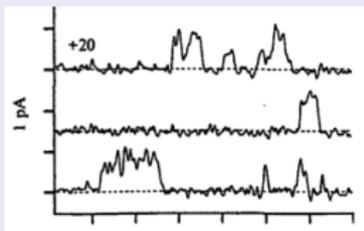
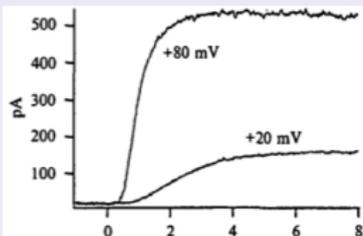
La secuencia de eventos que da lugar a la apertura del poro del canal involucra el movimiento de partículas cargadas sensibles a cambios en el potencial de membrana. Al pasar de un estado cerrado a un abierto, ocurre un cambio conformacional en la proteína.



**Figura:** Representación esquemática del cambio conformacional que da origen a la apertura de un canal de potasio. Cada cambio puede ser representado esquemáticamente como:



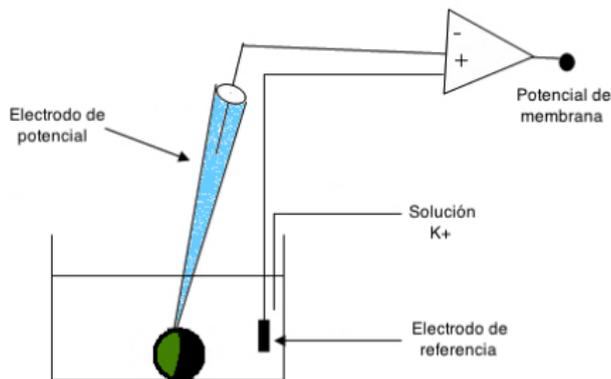
## Mediciones de la actividad de un Canal



- (a) **Corrientes iónicas:** Registros de la actividad de varios canales, muestran un aumento en la conductancia en respuesta a una depolarización. Potenciales de membrana más positivos no solo aumentan la conductancia del estado estacionario, sino que también aumentan la rapidez a la que se alcanza su valor final.
- (b) **Corriente de un canal unitario:** Registros de la actividad de un sólo canal. En estos registros se puede observar como un canal va del estado cerrado al abierto instantáneamente. Se puede obtener información acerca de la probabilidad de apertura como función del potencial de membrana.
- (c) **Corriente de compuerta:** Se debe a un cambio en el potencial de membrana, pero se registran en ausencia de corrientes iónicas. De estas se puede obtener información acerca de los cambios conformacionales que ocurren mientras el canal va del estado cerrado al abierto.

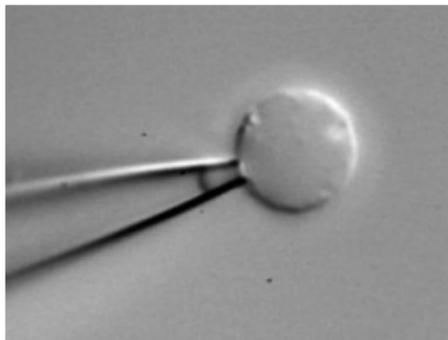
## Patch Clamp

La técnica de patch clamp permite detectar la corriente iónica que fluye a través de un canal en una membrana biológica. Su objetivo es aislar eléctricamente un parche de membrana para registrar la corriente que fluye a través del parche.

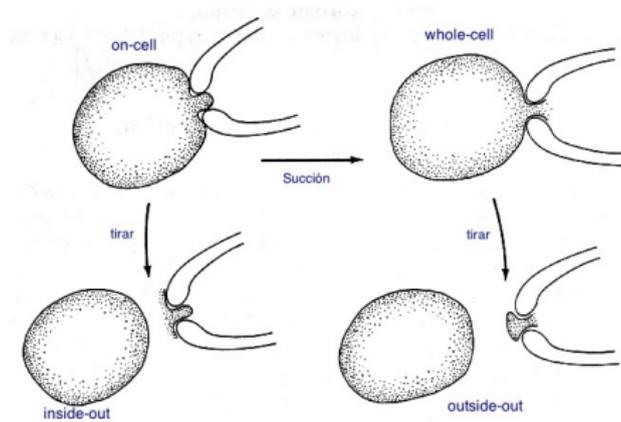


**Figura:** Diagrama de un experimento de Patch-Clamp: Se presiona una micropipeta, llena de solución conductora, contra la membrana celular y se aplica succión hasta formar un sello con una resistencia aproximada de 10G. La solución con la que se llena la pipeta, esta en contacto con un electrodo de plata clorurado, que conduce la corriente hasta un amplificador, de esta manera se logran registrar las corrientes que fluyen a través del parche. La resistencia de los sellos debe ser alta para aislar efectivamente el parche de membrana celular y para disminuir el ruido del registro, esto a su vez permite obtener una buena resolución temporal de corrientes de canales unitarios, cuya amplitud es del orden de 1 pA.

# Configuraciones de Patch-Clamp



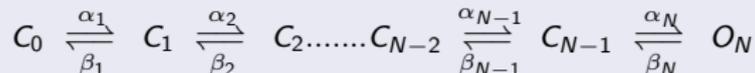
(a) Micropipeta en contacto con una célula, correspondiente a una configuración on-cell



(b) Posibles configuraciones de Patch-Clamp

## Modelo de Markov

El enfoque convencional que se ha dado al modelaje de la activación de los canales iónicos esta basado en el uso de diagramas de estado, donde cada estado representa una conformación distinta de la proteína (Modelos de Markov).



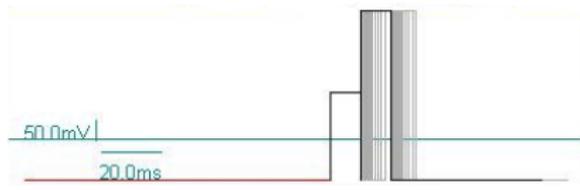
Las constantes de apertura y cierre del canal,  $\alpha_i$  y  $\beta_i$ , son tomadas como funciones exponenciales del potencial de membrana  $V$ , escalado por las cargas parciales  $q_{\alpha i}$  y  $q_{\beta i}$ .

$$\alpha_i(V) = e^{z_i V / kT}$$

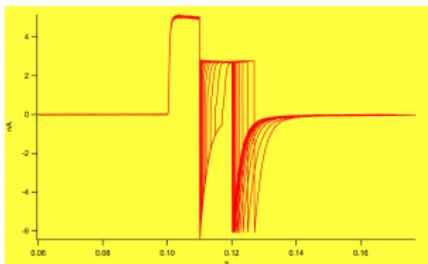
Un problema con este modelo es que se requiere un gran número de estados cerrados para explicar el tiempo de retraso entre la depolarización y la apertura del canal, pero un número tan grande de conformaciones discretas no suena realista desde un punto de vista físico.

## Registros en Shaker wt

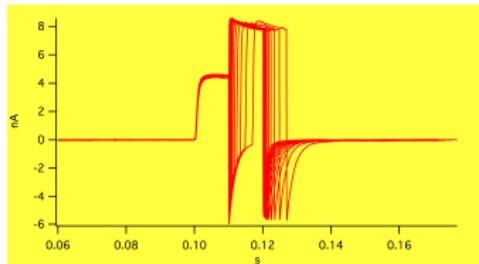
Se estudia el canal iónico *Shaker wt IR*, expresándolo en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. El cRNA se inyecta en los ovocitos y se registran las corrientes iónicas utilizando la técnica de patch-clamp, a distintos potenciales de membrana, hasta  $260\text{mV}$ .



**Figura:** Protocolo de doble pulso utilizado en las mediciones experimentales



(a) Registro con  $V=20\text{mV}$

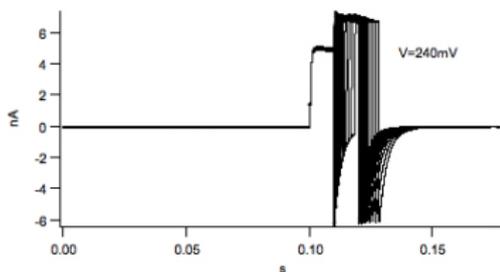


(b) Registro con  $V=220\text{mV}$

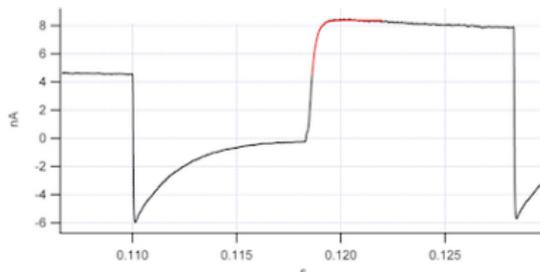
## Medición de la constante de Apertura a partir de los datos experimentales

Se ajusta una exponencial a cada pulso a diferentes intervalos de repolarización, de este ajuste se obtiene la constante de apertura del canal.

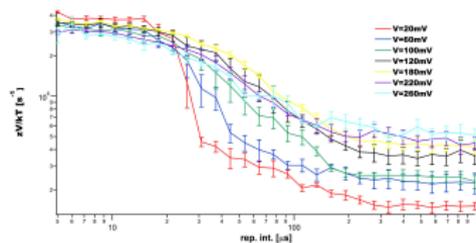
$$\alpha_N(V) = e^{z_N V/kT}$$



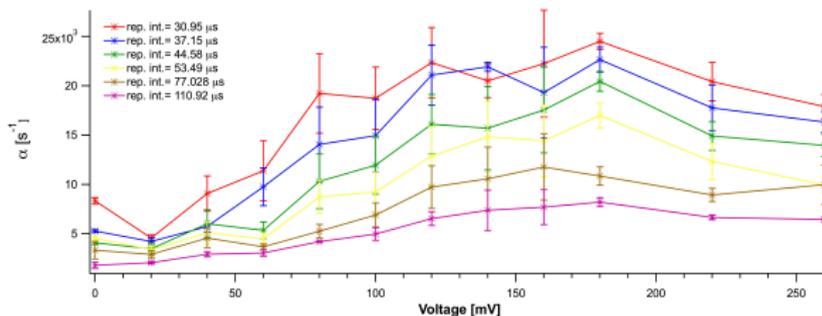
(c) Registro de corriente iónica a  $V = 240$  mV



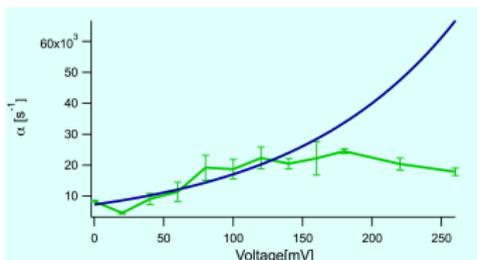
(d) Trazo a 240mV con un intervalo de repolarización de 64,19 μs



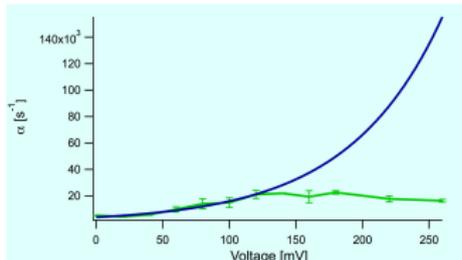
(e) Constante de apertura en función del intervalo de repolarización



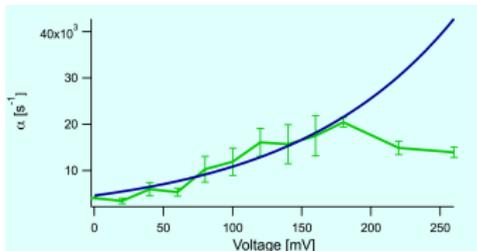
(f) Constante de apertura en función del Voltaje Aplicado



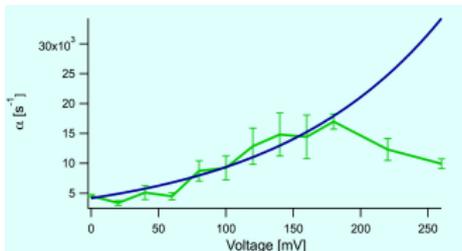
(g) Constante de apertura a un intervalo de repolarización de  $30,95 \mu\text{seg}$



(h) Constante de apertura a un intervalo de repolarización de  $37,15 \mu\text{seg}$



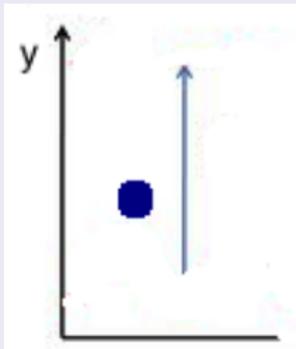
(i) Constante de apertura a un intervalo de repolarización de  $44,58 \mu\text{seg}$



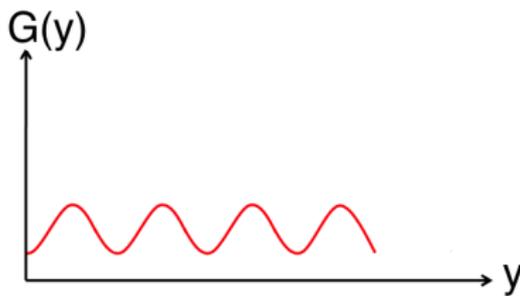
(j) Constante de apertura a un intervalo de repolarización de  $53,49 \mu\text{seg}$

## Teoría de Difusión

La base de este modelo es pensar que la cinética de activación de un canal es equivalente al movimiento Browniano de una partícula de cargada que se difunde a través de un plano de potencial unidimensional, llamaremos  $q$  a la posición de esta partícula . El valor de  $q$  es una medida del progreso en el proceso de activación del canal.



(k) Partícula que se difunde en una dimensión



(l) Figura esquemática de un plano de potencial

Utilizando el modelo anterior, la ecuación de movimiento para la partícula de compuerta es:

$$\frac{\mu[y(t_i) - y(t_{i-1})]}{t_i - t_{i-1}} = F + F_{est}$$

donde  $F$  es la fuerza externa aplicada a la partícula y  $F_{est}$  es una fuerza estocástica. Si reescribimos la ecuación anterior obtenemos:

$$\mu \Delta y = F \Delta t_i + F_{est} \Delta t_i \quad (1)$$

Recordando que podemos escribir  $F$  como el gradiente de un potencial:

$$F = - \frac{dV(y)}{dy}$$

El potencial sobre la partícula va a ser debido a los cambios conformacionales que debe sufrir la proteína para cambiar de estado y el debido al campo eléctrico externo:

$$V(y) = G(y) + Ey$$

Observemos que sin el término estocástico, la Ec. 1 tiene soluciones estáticas en los mínimos. Para poder tener una cinética es necesario incluir el término estocástico.

## Tiempo medio de salida

Lo que se pretende calcular en este modelo es el tiempo medio de salida del último pozo para una partícula en el potencial antes mencionado



$$u(0) = 0$$

$$u(L) = 0$$

Si llamamos  $u$  al tiempo medio de salida, la ecuación para este, esta dada por:

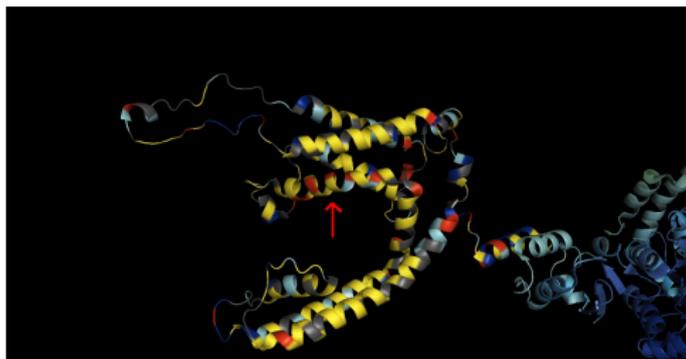
$$kTu'' + [G'(y) + E]u' = -1$$

Cuando  $T$  es pequeña, la solución a esta ecuación es:

$$e^{-\Delta u/kT} \quad (2)$$

Obteniendo así el resultado de Arrhenius

# Polarización en el canal



Tenemos una ecuación de Electroestática:

$$\frac{dD}{dy} = 0$$

Si se asume que la membrana es un dieléctrico lineal y se considera una constante dieléctrica que depende de la coordenada espacial  $y$  y del campo eléctrico, se obtiene:

$$\frac{d}{dy} [(1 - \beta y E^2) E] = 0$$

O en términos del potencial eléctrico:

$$\frac{d}{dy} \left[ \left( 1 - \beta y \left( \frac{d\phi}{dy} \right)^2 \right) \frac{d\phi}{dy} \right] = 0 \quad (3)$$

La Ec. 3 se puede resolver analíticamente aproximando la solución en el máximo, obteniendo así los siguientes perfiles de potencial para distintos voltajes externos:

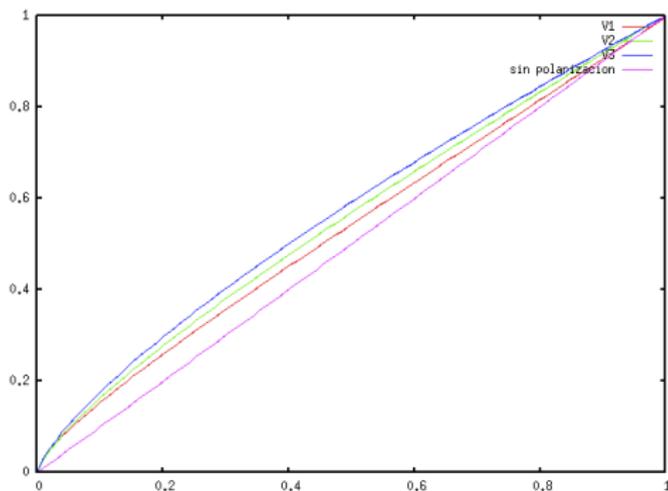


Figura: Perfiles de Potencial obtenidos al resolver la Ec.3

-  Bruce Alberts, *Molecular biology of the Cell*, 5th Edition, Garland Science.
-  O.P Hamill, A.Marty, E.Neher, B.Sakmann, F.J.Sigworth, *Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches*, *European Journal of Physiology* **391** (1981), 85–100.
-  Bertill Hille (1992), *Ionic Channels of Excitable Membranes*, second edition, Sinauer Associates Inc
-  D. Sigg, H.Qian, F.Bezanilla, *Kramer's Diffusion Theory Applied to Gating Kinetics of Voltage-Dependent Ion Channels*, *Biophysical Journal* **76**
-  F. J. Sigworth, *Voltage gating of ion channels*, *Quarterly Reviews of Biophysics* **27** (1993), 1–40.
-  Gary Yellen, *The voltage-gated potassium channels and their relatives*, *Nature*. **419** (2002), 35–42.