



Universidad Autónoma de San Luis Potosí



Instituto de Física  
San Luis Potosí S.L.P. 2020

# **Interacción Iónica en el Canal de Cloruro CIC-2**

*Trabajo de tesis*

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

*Presenta:*

**L. F. David Esparza Jasso**

**Asesor: Dr. Jorge Arreola Gómez**

**Co-asesor: Dr. Víctor de la Rosa Jiménez**



Interacción Iónica en el Canal de Cloruro CIC-2 by Esparza Jasso, David is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>7</b>
2.1 Canales iónicos.....	7
2.1.1 Selectividad iónica de los canales iónicos .....	8
2.1.2 Mecanismos de activación de los canales iónicos .....	10
2.1.3 Tipos de canales iónicos .....	11
2.2 Generalidades de canales iónicos CIC .....	12
2.3 Estructura de los canales CIC.....	13
2.4 Propiedades de los canales CIC.....	18
2.4.1 Dependencia con el voltaje de los canales CIC .....	18
2.4.2 Dependencia con el cloruro de los canales CIC .....	20
2.4.3 Dependencia con los protones de los canales CIC .....	24
2.5 Mecanismo de activación de los canales CIC .....	24
<b>3. Planteamiento del problema</b> .....	<b>26</b>
3.1 Hipótesis.....	30
3.2 Objetivos .....	30
<b>4. Métodos</b> .....	<b>31</b>
4.1 Cultivo celular y expresión del canal CIC-2 .....	31
4.2 Soluciones .....	31
4.3 Procedimiento experimental.....	33
4.3.1 Montaje del experimento .....	33
4.3.2 La técnica de patch clamp.....	33
4.3.3 Registros de corriente iónica .....	36
4.3.4 Protocolos de voltaje.....	36
4.4 Análisis de datos .....	38
4.4.1 Medición de la probabilidad de apertura de los canales .....	38
4.4.2 Medición del potencial de inversión de los canales .....	40
<b>5. Resultados</b> .....	<b>42</b>
5.1 Propiedades macroscópicas de la corriente de cloruro de los canales CIC-2.....	42

5.2 Diferencias en las propiedades de la corriente de los canales CIC-2 al sustituir la compuerta de glutamato por aspartato .....	44
5.3 Efecto de la variación de la fracción molar de tiocianato intracelular en los canales CIC-2 silvestre y con la mutación E213D.....	48
<b>6. Discusión.....</b>	<b>55</b>
6.1 Efectos en la cinética del canal por la mutación E213D .....	55
6.2 Efectos en la dependencia con el voltaje por la mutación E213D .....	55
6.3 Efectos en la dependencia con los iones permeantes por la mutación E213D.....	57
<b>7. Conclusión .....</b>	<b>60</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>61</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>68</b>
<b>Glosario.....</b>	<b>70</b>

# 1. Introducción

Los *canales iónicos* son proteínas embebidas en las membranas celulares que permiten el flujo pasivo de ciertos iones ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Cl^-$ ) a través de ellas, de forma selectiva o no selectiva, con el objetivo de ayudar al desempeño de diversas funciones importantes para las células en cuestión y, por ende, para el ser vivo constituido por éstas.

Una de las familias de canales iónicos e *intercambiadores* (otro tipo de proteínas membranales) cuyo estudio reciente ha sido más abundante es la *familia CIC* (“Cl” del símbolo del ion cloruro, y “C” de “Channel”, o Canal), presente a lo largo de todos los filos del reino animal y con una amplia distribución en humanos (Jentsch et al., 1993, 1999, 2005; Mindell y Maduke, 2001; Jentsch, 2008). Esta familia se compone de los canales iónicos CIC-0, CIC-1, CIC-2, CIC-K<sub>a</sub> y CIC-K<sub>b</sub>, y los intercambiadores CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6 y CIC-7. Los canales iónicos CIC se diferencian de los intercambiadores de su familia en que los primeros sólo permiten pasivamente el flujo de iones  $Cl^-$  a través de ellos, mientras que los *intercambiadores*, o *transportadores*, permiten el paso en sentidos opuestos de  $Cl^-$  y  $H^+$ , con una estequiometría 1:2 ( $H^+:Cl^-$ ) (Accardi y Miller, 2004). La gran importancia de esta familia de proteínas transmembranales se ha visto reflejada en trastornos en humanos y en ratones mutantes que no expresan alguno/s de estos canales y transportadores, lo que les provoca patologías como son neurodegeneración, sordera, ceguera, retraso mental, miotonía (relajación lenta de los músculos tras su contracción), hiperaldosteronismo (trastorno de sobreproducción y secreción de la hormona aldosterona que puede causar hipertensión), etc. (Jentsch y Pusch, 2018).

Las proteínas de la familia CIC se caracterizan por ser selectivas al ion cloruro principalmente y por ser *homodímeros*, es decir, constar de dos subunidades iguales e independientes, donde cada una de ellas cuenta con una vía de permeación iónica, o *protoporo*, a través del cual el ion  $Cl^-$  atraviesa la membrana (Miller y White, 1984; Richard y Miller, 1990; Dutzler, 2002).

Los canales iónicos pueden abrirse y cerrarse a causa de distintos estímulos, tales como cambios en la diferencia de voltaje a través de la membrana, o *voltaje de membrana* ( $V_m$ ); por acción mecánica (presión, cambios en volumen celular); por cambios de temperatura; por estímulos químicos o ligandos, etc. En el caso de los canales CIC, la activación es producida por cambios en el voltaje de membrana  $V_m$  y regulada por modificaciones en las concentraciones de protones y cloruro, así como de otros aniones permeantes, con una sensibilidad a estos factores variable entre los canales de la familia (Hanke y Miller, 1983; Pusch et al., 1995; Chen y Miller, 1996; Rychkov et al., 1996, 1998; Pusch et al., 1999; Chen y Chen, 2001; Arreola et al., 2002; Niemeyer et al., 2003; Sánchez-Rodríguez et al., 2010; De Jesús-Pérez et al., 2015).

Los canales CIC, dada su estructura de homodímero o de *doble barril*, siguen un comportamiento en el que su mecanismo de *apertura* y *cerrado* se explica de la siguiente forma: dentro de cada subunidad existe una *compuerta de protoporo* o *compuerta rápida*, llamada así dado que los eventos de apertura y cerrado suceden en una escala temporal de los milisegundos, mientras que para controlar ambos protoporos simultáneamente hay una *compuerta común* o *compuerta lenta* que actúa en la escala de los segundos (Miller y White, 1984; Richard y Miller, 1990; Chen, 2005).

Estudiar la sensibilidad al voltaje de los canales CIC es una de las tareas importantes para entender su funcionamiento. A diferencia de otros canales, como los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , los canales CIC no tienen un *sensor de voltaje* “clásico”, es decir, carecen de un mecanismo intrínseco que les provea de una dependencia directa con el potencial de membrana (Bezanilla, 2008). Se ha confirmado que la estructura de la compuerta de protoporo de estos canales está principalmente formada por una cadena lateral de un residuo de glutamato (E) que se encuentra dentro del poro, tanto de los canales como de los intercambiadores de la familia. Esta cadena lateral de glutamato se responsabiliza del “compuerteo” (por su denominación en inglés, *gating*) rápido del canal (Dutzler et al., 2002). A pH fisiológico (~7.3) este grupo mantiene una carga eléctrica negativa. Por ello, se piensa que los aniones que pueden entrar al protoporo interaccionan electrostáticamente con la compuerta, afectando de esta forma la apertura y cerrado del canal (Sánchez-Rodríguez, 2010; De Jesús-Pérez et al., 2015).

La investigación centrada en los canales CIC-0 y CIC-1 ha sido muy abundante. En estos estudios se ha mostrado que la protonación de la compuerta glutámica es la que provoca la apertura del protoporo, de modo que los protones confieren al canal de dependencia con el voltaje; y que este proceso es modulado alostéricamente por los propios iones permeantes cloruro al interactuar con el glutamato (Dutzler, 2002; Traverso et al., 2006; Miller, 2006). Sin embargo, el mecanismo de activación del canal CIC-2 difiere al de los canales anteriores, y aún se desconoce el proceso molecular exacto por el cual el poro del canal se abre.

Por esta razón, en nuestro laboratorio se ha estudiado a fondo al canal CIC-2. Se ha investigado cómo afecta el voltaje  $V_m$  la cinética de activación del canal CIC-2 (De Santiago et al., 2005). Se ha hipotetizado también, tras la experimentación electrofisiológica, que cuando el  $\text{Cl}^-$  intracelular accede al interior del protoporo facilita la apertura de su compuerta, así como lo hace el  $\text{H}^+$  al protonar la misma desde el lado extracelular. Además, se ha notado que la presencia de otros iones permeantes como el tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ), modifica las propiedades relacionadas con el protoporo (Sánchez-Rodríguez et al., 2010). Luego, se obtuvieron datos (De Jesús-Pérez et al., 2015) que indican que el potencial de membrana activa los canales, no por afectar un sensor de voltaje sino por empujar los iones  $\text{Cl}^-$  localizados en el lado intracelular al interior del protoporo. Se especula que una vez que permearon los iones  $\text{Cl}^-$  como se ha descrito, éstos interactúan

---

con la compuerta glutámica de manera repulsiva favoreciendo la conformación *abierta* del canal. En este contexto, el papel de los protones extracelulares es menos crucial en la apertura, pero se encargan de estabilizar dicha conformación abierta (De Jesús-Pérez et al., 2015).

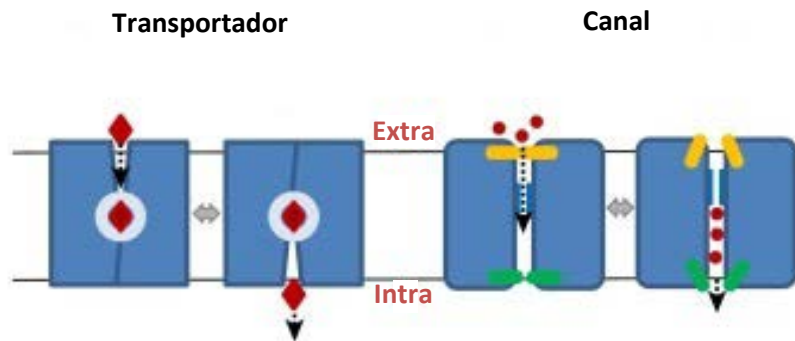
En este trabajo se buscó ampliar el entendimiento del funcionamiento de los canales CIC-2 enfocándonos en su compuerta, formada por una cadena lateral de glutamato ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ ). Para esto, se intentó *acortar* la compuerta al mutar el glutamato a un aspartato, obteniendo como compuerta la cadena lateral  $-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ . Esto resultó en una compuerta más corta pero con la misma carga. Se realizó un análisis cuantitativo y cualitativo de la dependencia con el voltaje de los canales CIC-2 silvestres y mutados, además de estudiar el efecto de la variación de la fracción molar intracelular de  $\text{SCN}^-/\text{Cl}^-$  con la intención de entender mejor qué y cómo ocurre cuando los aniones permeantes interactúan con el mecanismo de compuerta del canal CIC-2.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Canales iónicos

En la unidad vital básica, la *célula*, las *membranas lipídicas* son interfaces que separan diversas zonas dentro de ella, o bien, a la propia célula de su entorno. Por ejemplo, la *membrana plasmática* delimita toda la célula, separando el medio intracelular (citoplasma o citosol) del medio extracelular. Es decir, la célula y varios de sus organelos son acotados por estas membranas. La célula como un todo y sus organelos llevan a cabo diferentes funciones biológicas especializadas, cuya realización no sería posible si los medios en sus lúmenes no estuvieran en condiciones también diferentes. Los *canales iónicos* son macrocomplejos proteicos embebidos en las membranas celulares y que, junto a los transportadores, son los principales encargados de crear y regular las diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las diferentes regiones que son separadas por estas membranas. De esta característica es que proviene la gran importancia de los canales iónicos.

Los canales iónicos forman un poro a través del cual permiten a los iones pasar mediante difusión pasiva (Hille, 2001), mientras que los *transportadores* mueven los iones a través de la membrana contra un gradiente de concentración gracias a un mecanismo de transporte activo (Scheer, 2014) (ver Fig. 2.1).

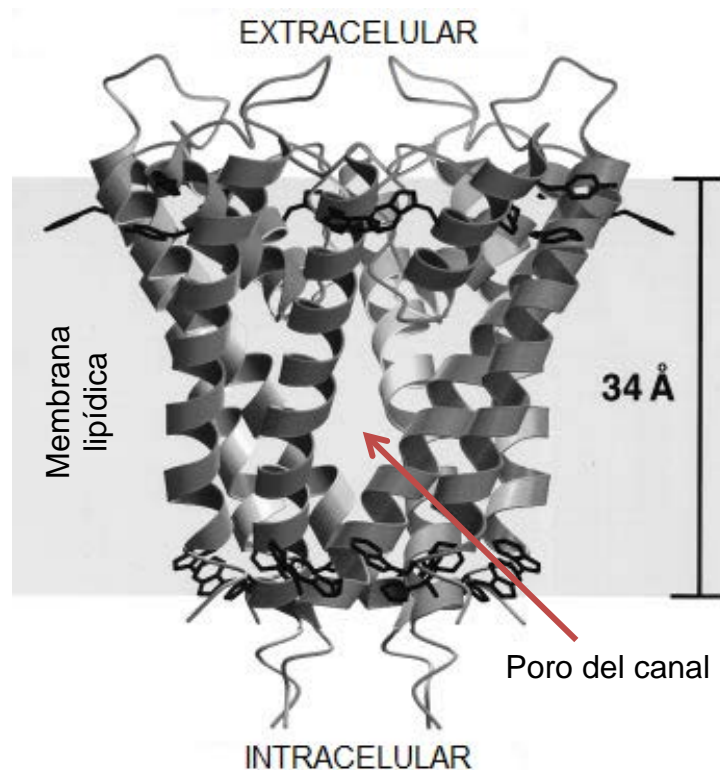


**Fig. 2.1** Diagrama de un transportador y un canal iónico. El transportador posee un sitio de pegado de iones mayor que interacciona con el sustrato (representado con un rombo) en un lado de la membrana, y cuya unión provoca un cambio conformacional que expone el sitio de pegado ocupado al otro lado de la membrana, donde el sustrato es liberado eventualmente. Los transportadores son estructural y funcionalmente diferentes a los canales iónicos, los cuales son proteínas transmembranales que forman un poro, controladas por la apertura y cerrado de 'compuertas' (barras amarillas y verdes) y no por cambios brutos en su conformación. La selectividad del canal es controlada por 'filtros moleculares' que restringen el tamaño del poro y que están cerca del extremo exterior del canal. Cuando están abiertos, los canales traslocan iones (esferas rojas) rápidamente debido al gradiente electroquímico, sin necesidad de energía metabólica. Se señalan los lados extracelular (*extra*) e intracelular (*intra*). Tomada de Diallinas, 2016.



La difusión pasiva que realizan los iones a través de los canales ocurre debido al *gradiente electroquímico* presente a través de la membrana, que surge por la diferencia en la concentración de iones y en potencial eléctrico dentro y fuera de la membrana celular. Gracias a este gradiente, se alcanza un enorme flujo de iones permeando los canales, del orden de  $10^6$  iones por segundo o incluso mayor (Hille, 2001).

Típicamente, los canales iónicos son macroproteínas formadas por ensamblados de varias proteínas individuales. Tal ensamblado usualmente consta de un arreglo circular de proteínas idénticas u homólogas empaquetadas estrechamente alrededor de un poro lleno de agua a través del plano de la membrana o bicapa lipídica (Fig. 2.2).

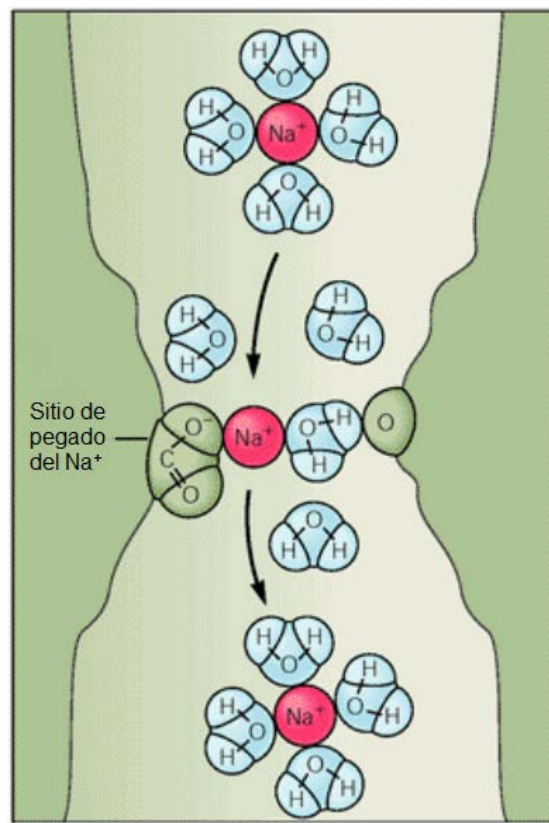


**Fig. 2.2** Vista lateral del canal de potasio KcsA. Se muestra la estructura del canal, formado por proteínas representadas en forma de listones. Estas proteínas se envuelven alrededor del poro acuoso al que acceden los iones. De negro se muestran aminoácidos aromáticos que también forman parte del canal. La banda gris claro representa la membrana lipídica en la que estaría embebido el KcsA, con sus lados intracelular y extracelular. Tomada de Doyle et al., 1998. PDB: 5J9P.

### 2.1.1 Selectividad iónica de los canales iónicos

Una de las características esenciales de los canales iónicos es la *selectividad*, es decir, la capacidad para permitir sólo el paso de uno o varios tipos de iones. El ancho del poro que forma el canal obviamente interviene en su selectividad, pero no es el único factor. Al respecto, se propuso que en el poro hay una región estrecha que actúa como ‘filtro

molecular' (Hille, 2001). En este *filtro de selectividad* (ver Fig. 2.3), un ion pierde la mayoría de sus moléculas de agua de hidratación y, en su lugar, forma enlaces químicos débiles (interacciones electrostáticas) con residuos de aminoácidos polares que recubren las paredes del canal. Dado que es energéticamente desfavorable que un ion elimine sus moléculas de agua de hidratación, el ion atravesará el canal sólo si la energía de interacción con el filtro de selectividad compensa la pérdida energética por su deshidratación. Los iones se unen a este filtro de selectividad por un corto tiempo (menos de 1  $\mu$ s), tras lo que las fuerzas electrostáticas y de difusión lo impulsan a salir del poro (Kandel et al., 2000). Los iones permeando de esta manera en los canales iónicos se mueven rápidamente y en una sola fila. Típicamente, cuando un canal puede transportar varios tipos de iones, éstos comparten el signo de su carga eléctrica, i.e. son aniones o cationes. Las características del filtro de selectividad son específicas al tipo de canal y a los iones que pueda transportar.



**Fig. 2.3** Esquema del filtro de selectividad del poro de un canal de  $\text{Na}^+$ . Los canales de sodio tienen un filtro de selectividad donde los iones  $\text{Na}^+$  se acoplan débilmente. Un ion  $\text{Na}^+$  se aproxima al sitio de pegado con su capa de moléculas de agua todavía presente. Tras perderla, se enlaza transitoriamente en un sitio activo mientras se mueve a través del filtro. En el sitio de pegado, la carga positiva del ion es estabilizada por un residuo de un aminoácido cargado negativamente en la pared del canal, así como por una molécula de agua que es atraída por un segundo residuo de un aminoácido polar en el otro lado del poro. Se cree que un ion  $\text{K}^+$ , debido a su diámetro más grande, no puede estabilizarse efectivamente por la carga negativa y por ello es excluido del filtro. Tomada de Kandel et al., 2000.

### 2.1.2 Mecanismos de activación de los canales iónicos

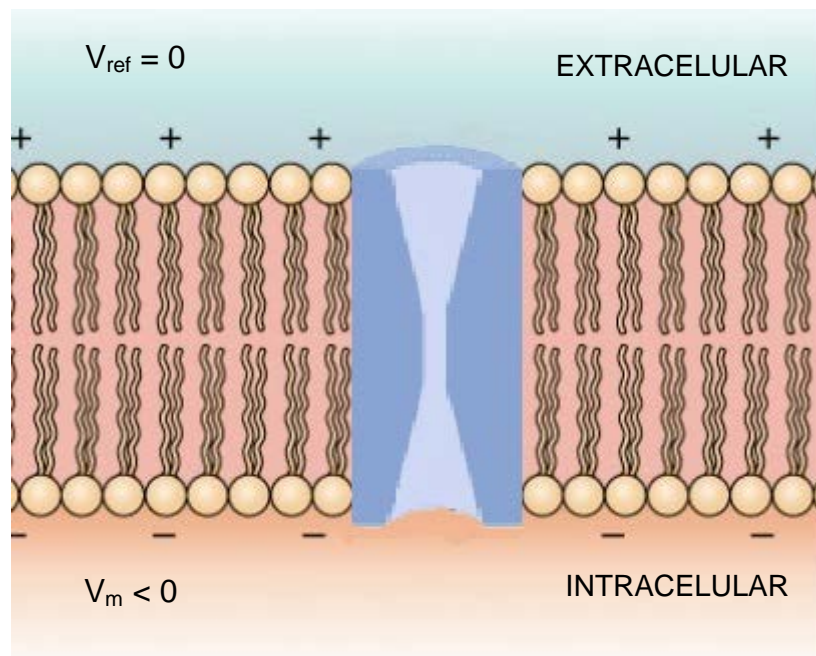
Una de las cualidades inherentes en muchos canales iónicos es el “*compuerteo*” o *gating*, en inglés. El concepto de *compuerteo* se emplea para describir el proceso que controla su *probabilidad de apertura*, es decir, la fracción del tiempo en que se encuentra *abierto*, permitiendo el ingreso de iones a su poro. En este sentido, muchos canales cuentan con una *compuerta* que gobierna su *apertura y cerrado* mediante algún tipo de mecanismo de activación. Esta compuerta se forma por alguna o algunas partes del canal que, ante distintos estímulos, ensanchan o descubren el poro permitiendo que los iones pasen. Entre los mecanismos de activación están:

- *Activación por temperatura.*- Los canales se activan por reducción o aumento de la temperatura.
- *Activación mecánica.*- Estos canales se abren cuando son sometidos a fuerzas mecánicas al aplicarles estiramientos, presión, fuerzas de cizallamiento y desplazamientos.
- *Activación por luz.*- Fotones activan los canales.
- *Activación por ligandos.*- Estos canales se abren en respuesta a moléculas ligando específicas que se unen a la parte extracelular del canal.
- *Activación por voltaje.* Los canales son activados en respuesta a determinadas diferencias de potencial eléctrico a través de la membrana lipídica. A dicha diferencia de potencial se le conoce como voltaje o potencial de membrana  $V_m$ , que por convención se mide en el lado intracelular tomando como referencia el lado extracelular (Fig. 2.4).

Los canales que se estudiaron en este trabajo, los CIC-2, son activados por voltaje (De Santiago et al., 2005), así que se detallará un poco más sobre este mecanismo.

La diferencia de la concentración de iones a través de las membranas celulares induce un gradiente electroquímico que, a su vez, genera una separación de carga a través de ellas (Fig. 2.4). La parte hidrofóbica de la membrana actúa como un capacitor, el cual separa las cargas y como consecuencia genera una diferencia de potencial a través de la membrana del orden de 100 mV. La membrana es extremadamente delgada,  $\sim 30 \text{ \AA}$ , por lo tanto se genera un intenso campo eléctrico ( $E_m$ ) del orden de  $10^7 \text{ V/m}$ . Los canales activados por voltaje o *dependientes del voltaje* utilizan este campo eléctrico para regular las funciones de la célula. Los canales dependientes del voltaje *clásicos* detectan el campo eléctrico debido a las variaciones en el voltaje gracias a que cuentan con un dominio denominado *sensor de voltaje*. Este sensor se forma por un conjunto de cargas o dipolos equivalentes (aminoácidos) que se mueven bajo la influencia del campo eléctrico de la membrana (Hille, 2001; Bezanilla, 2008). Esto significa que los canales que poseen un *sensor de voltaje* tienen una dependencia intrínseca con el voltaje (Bezanilla, 2000). Existen otros canales como el CIC-2 que, no obstante, no tiene un mecanismo de

dependencia con el voltaje directo como el aquí descrito y que aun así son abiertos y cerrados por cambios en el voltaje, como profundizaremos más adelante.



**Fig. 2.4** *Potencial de membrana.* Se ejemplifica en un esquema el potencial de membrana  $V_m$  negativo a través de una membrana celular con un canal iónico embebido. El potencial de membrana se mide en el lado intracelular, tomando como 0 el potencial de referencia  $V_{ref}$  en el lado externo. Esta diferencia de potencial implica que carga eléctrica negativa está acumulada en la cara inferior de la bicapa lipídica, mientras que la cara superior está positivamente cargada.

### 2.1.3 Tipos de canales iónicos

Los canales iónicos se pueden clasificar de acuerdo a los iones que son capaces de conducir según su filtro de selectividad.

Los canales de potasio son los más abundantes en toda forma de vida (Littleton y Ganetzky, 2000). Uno de los miembros de su familia, el KcsA, es de especial importancia ya que su estructura fue la primera obtenida mediante cristalografía de rayos X por MacKinnon y sus colegas (Fig. 2.2).

Los canales de sodio llevan ya bastantes décadas de estudio, y gracias a estas investigaciones y a las de canales de potasio fue como se teorizó por primera vez acerca del filtro de selectividad de los canales iónicos (Hille, 1971; Bezanilla y Armstrong, 1972).

Existen más canales que conducen variedad de iones, como calcio y protones, los cuales han sido estudiados en menor medida, sin embargo, el caso especialmente importante para el presente trabajo es el de los canales de cloruro.

Aún con mucho por descubrir acerca de ellos, los canales de cloruro son selectivos a aniones pequeños en general, pero especialmente al cloruro, que además es el anión más

abundante en los seres vivos (Jentsch et al., 2002). Sus mecanismos principales de activación son por voltaje y por ligandos, siendo los primeros de gran relevancia dado que canales con esta cualidad se encargan de funciones en la célula como la regulación del volumen celular, el mantenimiento del potencial de reposo de la membrana, etc. (Suzuki et al., 2006).

Estos canales forman una *superfamilia* comprendida por varias familias de canales. Una de ellas es la familia *CIC*, ampliamente distribuida en diferentes seres vivos, incluido el humano y con una estructura no observada en ningún otro tipo de canal iónico (Jentsch et al., 2002). El canal CIC-2, activado por voltaje, es parte de esta familia y fue el objeto de estudio de esta tesis.

## 2.2 Generalidades de canales iónicos CIC

La familia de proteínas transmembranales CIC está formada por los canales iónicos CIC-0, CIC-1, CIC-2, CIC-K<sub>a</sub> y CIC-K<sub>b</sub>; y los transportadores CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6 y CIC-7 (Jentsch, 2005).

El primer canal de la familia CIC en ser estudiado fue el canal CIC-0, descubierto por White en 1979 en el órgano eléctrico del pez *Torpedo Californica* y que desde entonces ha sido objeto de la investigación más amplia de todos los miembros de su familia. Se observó (ver Sección 2.2) que el canal tenía un comportamiento que sugería una estructura de doble poro, con una *compuerta rápida* por poro y una *compuerta común (compuerta lenta)* para ambos poros, aspecto que se confirmaría repetidas ocasiones y que resultaría ser un rasgo característico de las proteínas CIC.

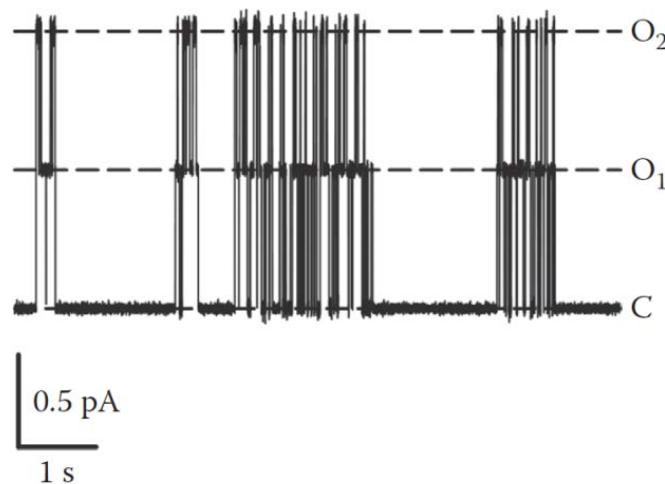
Al principio, los canales CIC-0 se creían una mera curiosidad, sin un interés de estudio más allá de ello. Sin embargo, cuando se lograron clonar molecularmente por Jentsch et al. (1990), se entendió que se había llegado al descubrimiento de toda una nueva e importante familia genética presente en todos los filos biológicos. Luego de tener a la mano la secuencia primaria del canal, se estudió de manera exhaustiva por métodos genéticos, biofísicos, bioquímicos y cristalográficos (Zifarelli y Pusch, 2015), permitiendo cada vez una mayor comprensión de sus características y de su papel en el funcionamiento del organismo, y por tanto de su importancia y la de su familia.

Nueve genes CIC distintos están presentes en humanos (Jentsch, 2008; Jentsch et al., 1993, 1999, 2005; Mindell y Maduke, 2001), de entre los que los canales CIC-1 de los músculos, los canales CIC-2 ampliamente distribuidos en variedad de tejidos, y los canales CIC-K<sub>a</sub> y CIC-K<sub>b</sub> de los riñones y el epitelio del oído interno son muy similares en su secuencia primaria al prototípico CIC-0. El resto de proteínas CIC encontradas en mamíferos son *transportadores* (CIC-3–CIC-7). Todos los llamados *canales CIC de tipo muscular* (i.e. CIC-1, CIC-2, CIC-K<sub>a</sub> y CIC-K<sub>b</sub>) se encuentran presentes en la membrana

plasmática, mientras que las proteínas CIC-3-CIC-7 se localizan mayormente en las membranas endosómica y lisosómica (Jentsch et al., 2005).

### 2.3 Estructura de los canales CIC

Al registrar la corriente eléctrica que fluye a través del canal CIC-0, se apreció que éste tenía un comportamiento de *doble barril* (Miller, 1982; Miller y White, 1980, 1984), es decir, que se componía de dos poros iguales. Esto se sugirió al distinguir tres niveles distintos de conducción del canal, que resultaron equidistantes (en magnitud de corriente eléctrica) entre sí (Fig. 2.5). Además, las probabilidades de ocupación de los tres niveles de conductancia obedecieron una distribución binomial simple, hecho que apoyó la suposición

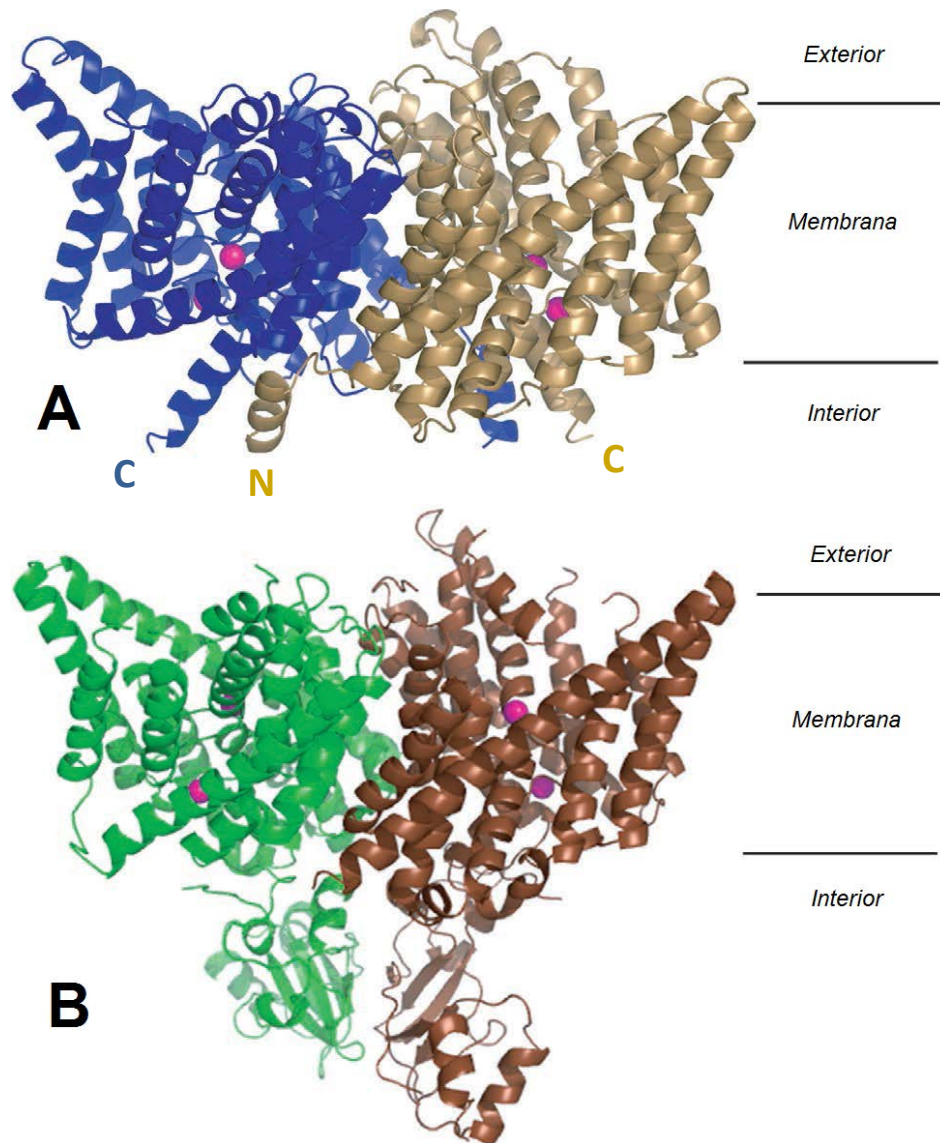


**Fig. 2.5** Actividad del canal CIC-0, mostrando un comportamiento de “doble barril”. Se representa en un esquema de corriente contra tiempo el comportamiento de apertura y cerrado de un solo canal. La apertura ocurre cuando aparecen pulsos de corriente que corresponden a periodos de activación de la compuerta lenta, separados por largos periodos de cierre de la misma compuerta (nivel de conductancia cerrado, denotado por C). El canal fluctúa entre tres niveles de conducción equidistantes con probabilidad binomial de ocupación de los estados, debido a la apertura y cerrado de la compuerta rápida de cada protoporo. O<sub>1</sub> representa el estado donde sólo una compuerta rápida de un poro está abierta, mientras que O<sub>2</sub> denota el estado donde ambas compuertas rápidas lo están. Tomada de Zifarelli y Pusch, 2015, a su vez basados en Miller, 1982.

de que los dos poros se abrían y cerraban de forma independiente (Miller, 1982). Sin embargo, la aparición de periodos largos sin actividad entre cada pulso de corriente sugirió que los poros no eran del todo independientes. Con base en éstos y otros resultados (Miller y White, 1984), Miller propuso el *modelo de doble barril* para el canal CIC-0. De acuerdo a esta hipótesis el canal está formado por dos poros iguales, cada uno con una *compuerta de protoporo (CP)* o *compuerta rápida*, subordinados a una *compuerta común (CC)* conocida como *compuerta lenta*, la cual desactiva ambos poros de forma simultánea. En el modelo,

dato que se asume que las compuertas común y de poro se abren independientemente, la probabilidad de apertura total  $P_a$  del canal, o probabilidad aparente de apertura, es el producto de la probabilidad de apertura de la compuerta del poro ( $P_p$ ) y la probabilidad de apertura de la compuerta común ( $P_c$ ):

$$P_a = P_p \cdot P_c \quad (\text{E2.1})$$

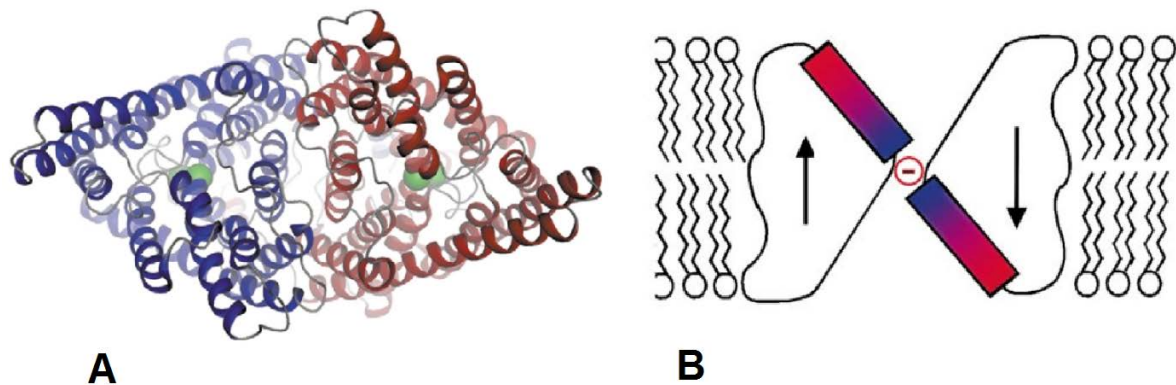


**Fig. 2.6** Estructuras cristalográficas de las proteínas *CIC-ec1* (A) y *CIC-cm* (B). Para cada proteína se indican las dos subunidades mediante colores diferentes. En cada subunidad se puede inferir la ruta de permeación iónica a partir de la posición de dos iones Cl<sup>-</sup> de color magenta unidos al filtro de selectividad. En A se muestran algunos extremos N-terminales y C-terminales de las hélices  $\alpha$  que forman las proteínas. Se coloca en el lado derecho un diagrama que indica dónde se encontraría la membrana celular, el lado intracelular y el lado extracelular. Tomadas de Zifarelli y Pusch, 2015, a su vez basados en Dutzler et al., 2002 y Feng et al., 2010. PDB de *CIC-ec1*: 2FEE; PDB de *CIC-cm*: 3ORG.

El canal CIC-0 se considera pues un *homodímero* (formado por dos subunidades iguales) con dos rutas de conducción de cloruro físicamente separadas.

La cristalografía de rayos X de intercambiadores CIC provenientes de bacterias como la *E. coli* (CIC-ec1 [Dutzler et al., 2002]), y algas como la *Cyanidioschyzon merolae* (CIC-cm [Feng et al., 2010]), pudo permitir la confirmación de la arquitectura de doble poro de las proteínas CIC (Fig. 2.6). Las similitudes entre las proteínas estudiadas por Dutzler y Feng arrojaron la morfología general de su dominio transmembranal, encontrando una arquitectura dimérica con dos subunidades idénticas, cada una de las cuales mantiene una ruta de permeación iónica, como había sugerido el comportamiento de un solo canal CIC-0 (Miller y White, 1980). Las dos subunidades tienen una forma triangular (Fig. 2.7A), y cada subunidad contiene 18 hélices  $\alpha$  dispuestas en una compleja topología en la cual los extremos N-terminales y C-terminales (Fig. 2.6) están organizados en una arquitectura antiparalela (Fig. 2.7B) (Dutzler et al., 2002).

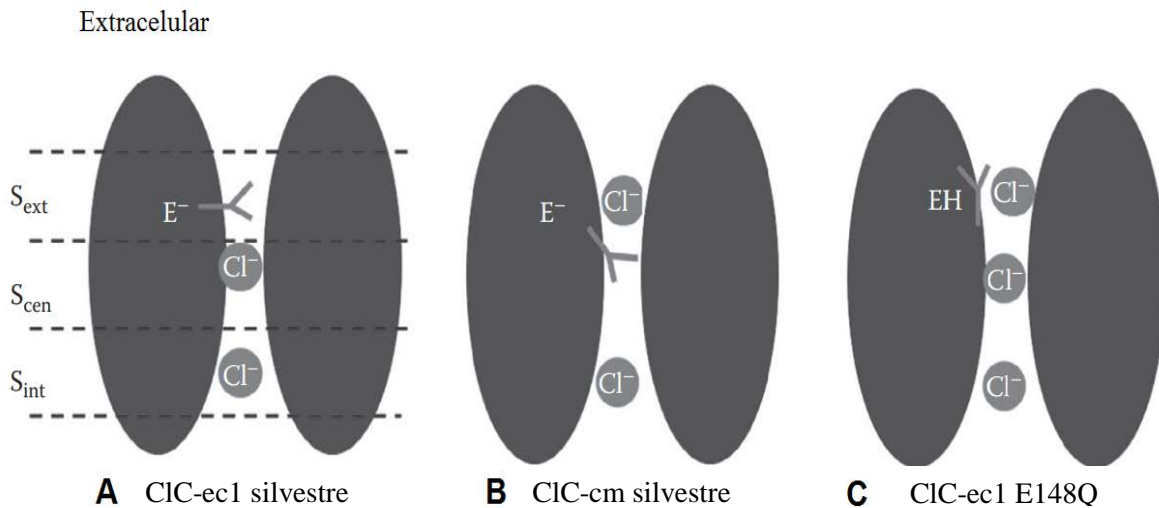
La ruta de permeación iónica tiene forma de reloj de arena (Fig. 2.8): con vestíbulos amplios y llenos de agua en cada extremo del poro y que se estrechan en el centro formando un “túnel” angosto de 12 Å de largo, que sirve como el *filtro de selectividad* que permite el paso específico de los iones  $\text{Cl}^-$ . En esta parte se han identificado tres distintos sitios de pegado de iones:  $S_{ext}$  (sitio de pegado externo),  $S_{cen}$  (sitio de pegado central) y  $S_{int}$  (sitio de pegado interno) (Dutzler et al., 2003). Diferentes estructuras cristalinas capturaron diferentes configuraciones en esta región de la proteína, como se ilustra en la Fig. 2.8. En la



**Fig. 2.7** *Detalles de la estructura de la proteína CIC-ec1.* **A:** Dímero de CIC-ec1 visto desde el lado extracelular. Cada subunidad se representa con distinto color (azul y rojo); los iones en el filtro de selectividad se muestran como esferas verdes. Tomada de Dutzler, 2004. PDB: 2FEE. **B:** La arquitectura antiparalela de las proteínas CIC contiene mitades estructuralmente similares con orientaciones opuestas en la membrana (representadas con flechas). Esta arquitectura permite que los extremos similares (con el mismo sentido dipolar) de las hélices  $\alpha$  en cada subunidad apunten al centro de la membrana. Se representan estas hélices como dipolos con extremos positivo (azul) y negativo (rojo). Se muestra el CIC-ec1 embebido en una membrana lipídica y con un anión permeante en el centro de su ruta de permeación, siendo estabilizado por los extremos positivos de los dipolos. Tomada de Dutzler et al., 2002.



estructura del CIC-ec1 silvestre, dos aniones están unidos a los  $S_{int}$  y  $S_{cen}$ , respectivamente. El anión en el  $S_{int}$  está parcialmente deshidratado, mientras que el anión en el  $S_{cen}$  está por completo deshidratado y se encuentra coordinado por átomos de nitrógeno de una cadena principal de amida y por átomos de oxígeno de cadenas laterales de Ser-107 (serina en la posición 107) y Tyr-445 (tirosina en la posición 445) (Dutzler et al., 2002), como se observa en la Fig. 2.9. En esta estructura se aprecia un residuo de glutamato conservado que proyecta su cadena lateral dentro de la ruta de permeación, sugiriendo que ésta es una conformación en la que el transporte no ocurre (Figs. 2.4A y 2.5). A este glutamato presente en cada protoporo y que se conserva entre las distintas proteínas CIC se le conoce como *compuerta de glutamato*, por su papel en la apertura y cerrado del poro (Dutzler et al., 2003; Dutzler, 2004), como se profundizará más adelante. En el caso del CIC-ec1, el glutamato (cuyo símbolo es E ó Glu) se encuentra en la posición 148 (Glu-148 ó E148). La estructura de un CIC-ec1 en el que se mutó el Glu-148 a glutamina (E148Q, con Q el símbolo de la glutamina), obtenida por Dutzler et al. (2003), es básicamente idéntica a la del intercambiador silvestre salvo que un anión  $Cl^-$  ocupa  $S_{ext}$ , y la *compuerta de glutamina* se encuentra desplazada, mientras que en el sitio  $S_{ext}$  del CIC-ec1 silvestre sólo se encontraba la compuerta de glutamato cerrando el paso en el poro (ver Figs. 2.4A y 2.4C). Cabe señalar que la cadena lateral de la glutamina se orienta hacia el lado extracelular en la

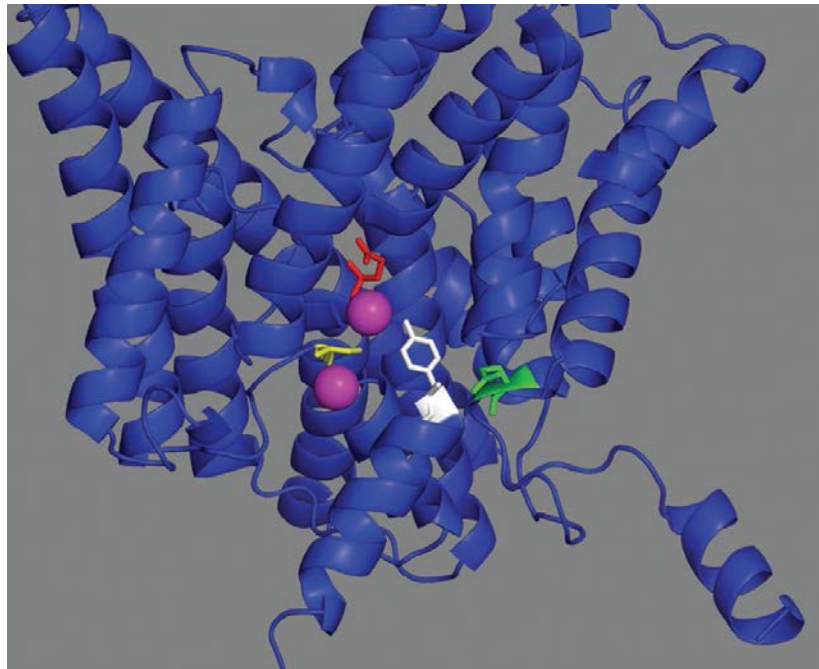


**Fig. 2.8** *Diferentes configuraciones del filtro de selectividad en intercambiadores CIC.* Se representan diferentes configuraciones de iones  $Cl^-$  dentro del filtro, observadas en estructuras cristalográficas. La posición de los tres sitios de pegado aniónico  $S_{ext}$ ,  $S_{cen}$  y  $S_{int}$  se indica por líneas punteadas. **A:** Estructura de CIC-ec1 silvestre (Dutzler et al., 2002). La compuerta de glutamato se muestra (E148). **B:** Estructura de CIC-cm silvestre (Feng et al., 2010). **C:** Mutante E148Q de CIC-ec1 (Dutzler et al., 2003). La cadena lateral del residuo de glutamina que sustituyó al glutamato, se representa como una cadena lateral de glutamato protonada (EH). Tomada de Zifarelli y Pusch, 2015.

proteína mutada, lo que sugiere que ésta es la configuración que adopta cuando el transporte es permitido. En la estructura cristalina de CIC-cm (Feng et al., 2010), la compuerta de la cadena lateral de glutamato (E210 en este caso) se orienta hacia el lado intracelular y ocupa el  $S_{cen}$  mientras que los aniones están en los sitios de pegado  $S_{ext}$  y  $S_{int}$  (Fig. 2.8B). Esta configuración de la compuerta de glutamato curiosamente fue sugerida por simulaciones de dinámica molecular (Bisset et al., 2005). Hay que destacar que en el canal objeto del estudio de esta tesis, el mCIC-2, la compuerta E está en posición 213 y la tirosina (símbolo Y) está en posición 561.

Se tiene la sólida idea de que cada subunidad de los intercambiadores CIC puede transportar iones de manera independiente. Una prueba directa de ello viene de la investigación de un monómero aislado proveniente de una proteína CIC-ec1 que se obtuvo al romper la interfaz no polar entre las dos subunidades originales, y que mostró una actividad de transporte normal (Robertson et al., 2010).

Los transportadores CIC son intercambiadores de  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  (mueven  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}^+$  en sentidos opuestos a través de la membrana) que realizan un transporte activo con una estequiometría  $2 \text{Cl}^-:1 \text{H}^+$ . (Accardi y Miller, 2004). Una característica destacable de este intercambio  $2 \text{Cl}^-/1 \text{H}^+$  es que resulta ser altamente electrogénico: un total de tres cargas elementales son traslocadas durante cada ciclo de transporte. Por esto, el intercambio realizado por las proteínas CIC está intrínseca y fuertemente influenciado por el potencial



**Fig. 2.9** Estructura del filtro de selectividad de la proteína CIC-ec1. La compuerta de glutamato E148 está indicada en rojo, el glutamato E203, que tiene un papel importante en el transporte de  $\text{H}^+$ , está coloreado de verde. Los dos iones  $\text{Cl}^-$  en los  $S_{cen}$  y  $S_{int}$  se representan como esferas magenta. Los residuos de serina y tirosina que coordinan al ion  $\text{Cl}^-$  en el  $S_{cen}$  se muestran en amarillo y blanco, respectivamente. Tomada de Zifarelli y Pusch, 2015. PDB: 2FEE.

de membrana y viceversa: la actividad CIC afecta directamente el potencial de membrana (Zifarelli y Pusch, 2015).

La estructura de las proteínas CIC se había resuelto sólo para los intercambiadores mediante cristalografía de rayos X. Dado que las estructuras primarias de intercambiadores y canales son muy similares, la mayoría de las suposiciones sobre la estructura de los canales CIC se habían basado en la estructura establecida para los primeros (Dutzler, 2007). No obstante, recientemente mediante criomicroscopía electrónica se han podido obtener las estructuras del canal bovino CIC-K (Park et al., 2017), y del canal CIC-1 humano, *hCIC-1* (Park y MacKinnon, 2018). Gracias a ello, se pudo comprobar que los canales mantienen una estructura muy parecida a los transportadores CIC salvo algunas diferencias en sus poros. Por ejemplo, en el canal CIC-K una parte de su estructura está en una posición lejana al interior del poro, al contrario que en transportadores donde éste bloquea parcialmente el poro. Mientras tanto, en el canal hCIC-1 se notó que: la compuerta de glutamato obstruye en menor medida al poro que en los transportadores, que el poro es más ancho cerca del lado intracelular y que en el sitio central  $S_{cen}$  hay una menor afinidad de pegado de  $Cl^-$ .

## 2.4 Propiedades de los canales CIC

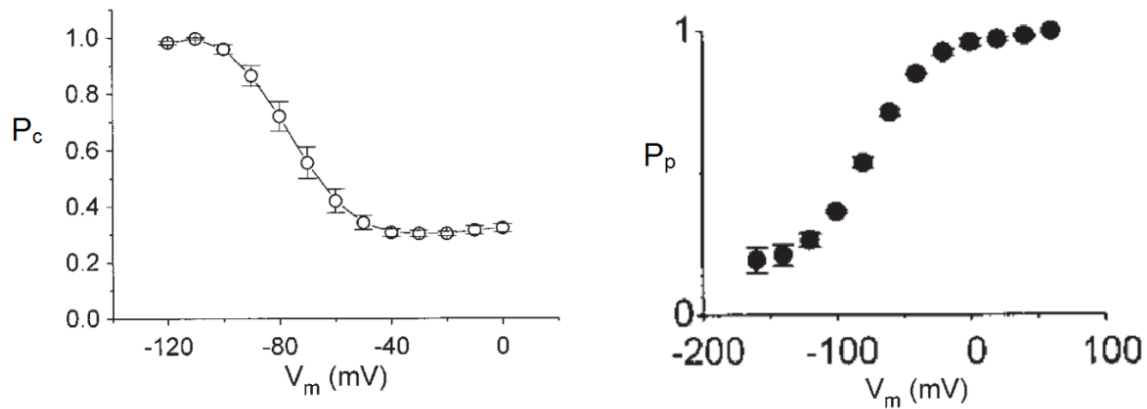
Los canales CIC tienen dos mecanismos de compuerta: la compuerta lenta o común y la compuerta rápida o de protoporo (Miller y White, 1984; Accardi y Pusch, 2000; de Santiago et al., 2005). Los calificativos “rápido” y “lento” se les otorgaron porque en el CIC-0 las duraciones de los procesos de apertura y cerrado de los distintos tipos de compuerta diferían en órdenes de magnitud. Los comportamientos lento y rápido dependen del pH, voltaje, concentración de aniones y temperatura.

### 2.4.1 Dependencia con el voltaje de los canales CIC

Pese a no tener un *sensor de voltaje* en el sentido estricto de la palabra (ver Subsección 2.1.2), la probabilidad de apertura de los canales CIC depende del voltaje de membrana  $V_m$ .

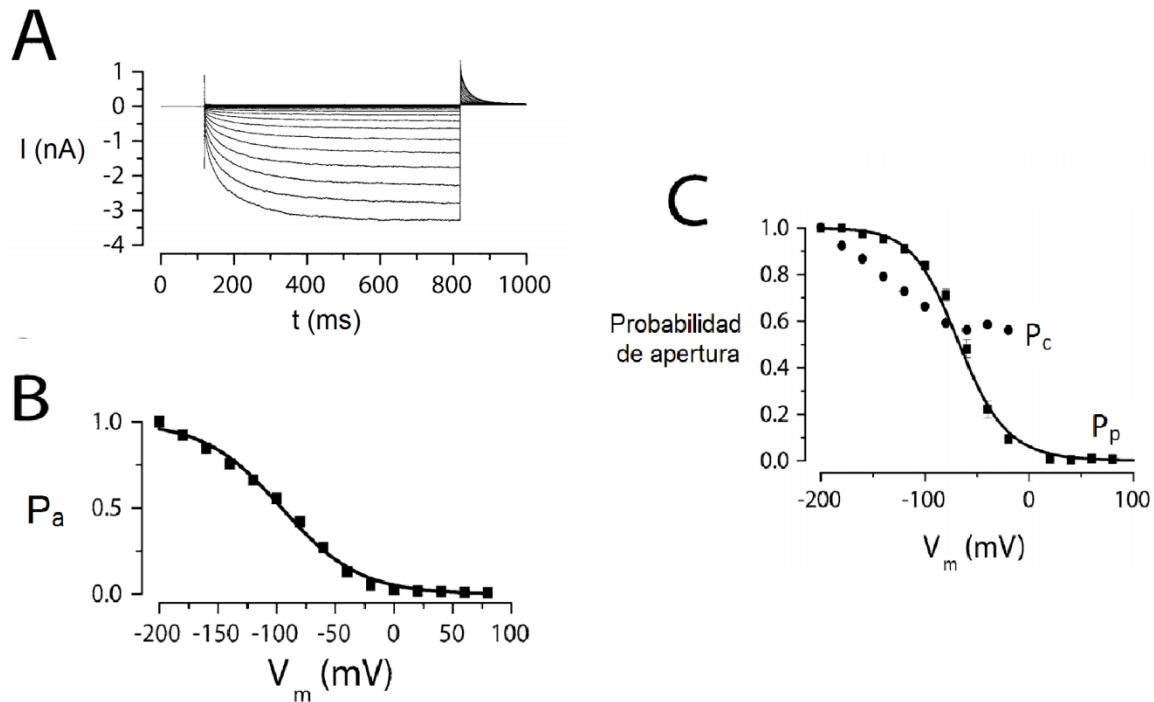
Cada tipo de compuerta (lenta o rápida) depende del voltaje de manera distinta en los canales CIC. Por ejemplo, en el canal CIC-0 la compuerta rápida se cierra a voltajes hiperpolarizantes y es abierta a potenciales despolarizantes (Pusch et al., 1995; Chen y Miller, 1996). En cambio, la compuerta lenta se abre a potenciales negativos (Richard y Miller, 1990) y no se cierra por completo a potenciales positivos (Pusch et al., 1997). La corriente iónica debida al flujo de  $Cl^-$  a través de los canales permite determinar en qué estado se encuentran éstos. Aplicando la técnica de *patch clamp* (ver Subsección 4.3.2) se ha podido medir la corriente a través de los canales CIC-0 al fijar distintos potenciales de membrana  $V_m$ , y con ello conocer la probabilidad de apertura de la compuerta común,  $P_c$ , y

la probabilidad de apertura de la compuerta de protoporo,  $P_p$ , mostrando el comportamiento de la Fig. 2.10.



**Fig. 2.10** Dependencia con el voltaje de las compuertas rápida y lenta del canal CIC-0. Curvas de probabilidad de apertura de la compuerta común ( $P_c$ ) y de la compuerta de protoporo ( $P_p$ ) contra el voltaje de membrana  $V_m$ . Tomada de Lin et al., 1999.

La dependencia con el voltaje del canal CIC-2 es muy diferente a la que tienen el CIC-0 y el CIC-1 (Accardi y Pusch, 2000). Los canales CIC-2 se activan a potenciales hiperpolarizantes (De Santiago et al., 2005). Para reconocer esto, se obtuvieron registros de corriente como los de la Fig. 2.11A, adquiridos mediante la aplicación de protocolos de voltaje a las células como los descritos en la Subsección 4.3.4. Estos protocolos constan de estímulos de voltajes negativos. Con tales datos se puede calcular la probabilidad de apertura total  $P_a$  de los canales (Fig. 2.11B) a partir de las corrientes estacionarias (ver Subsección 4.4.1), observando una apertura total del canal para voltajes de alrededor de -200 mV y un cierre completo a voltajes positivos. En la Fig. 2.11C se muestran  $P_p$  y  $P_c$  graficados contra  $V_m$ . Se observa que  $P_p$  tiene un comportamiento muy similar a  $P_a$ , siendo que la CP se abre completamente a potenciales negativos ( $\sim -160$  mV), y que está cerrada a potenciales positivos. De igual forma,  $P_c$  aumenta conforme el potencial se hiperpolariza.

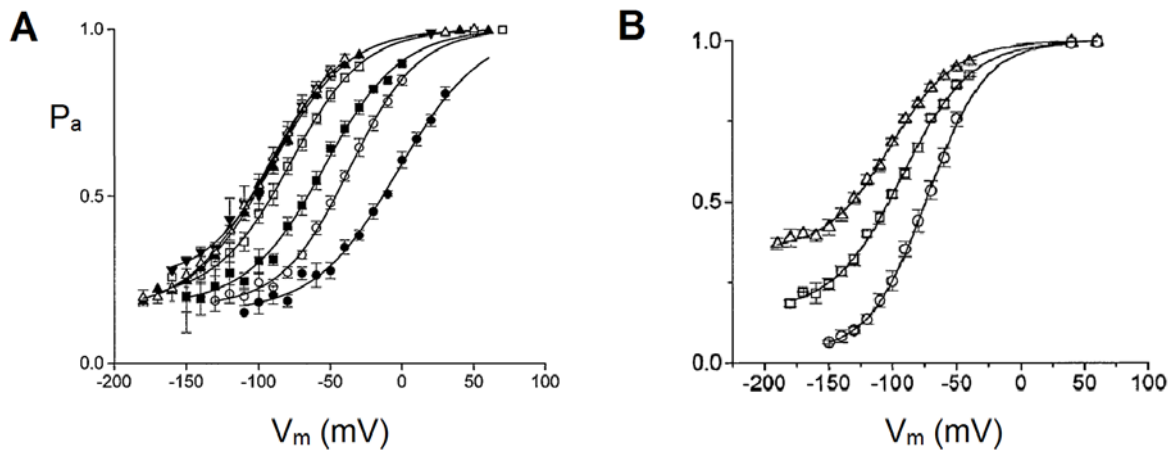


**Fig. 2.11** Dependencia con el voltaje del canal CIC-2. **A:** Registros de corriente  $I$  contra tiempo  $t$  para los canales CIC-2 al aplicarles voltajes negativos (Fig. 4.2). **B:** Probabilidad de apertura total  $P_a$  contra potencial de membrana  $V_m$  obtenida a partir de las corrientes de cola de los registros de la parte A. **C:** Probabilidades de apertura de la compuerta del protoporo ( $P_p$ ) y la compuerta común ( $P_c$ ) contra voltaje de membrana  $V_m$ . Las líneas continuas en **B** y **C** son ajustes de Boltzmann (ver Subsección 4.4.1) de los datos experimentales. Tomadas de De Santiago et al., 2005.

### 2.4.2 Dependencia con el cloruro de los canales CIC

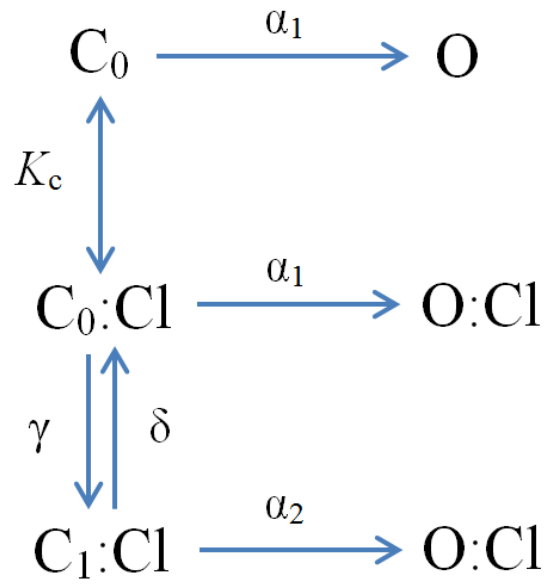
El compueteo y la permeación de los iones están estrictamente acoplados en los canales CIC (Chen y Miller, 1996). Para el canal CIC-0, se ha propuesto que este acoplamiento se relaciona con la dependencia con el voltaje de la compuerta rápida. Se ha sugerido que esta dependencia surge indirectamente de la unión y/o traslocación dependiente del voltaje de los iones  $\text{Cl}^-$  que ingresan al canal (Chen y Miller, 1996; Pusch et al., 1995). Sin embargo, el mecanismo concreto con el que el  $\text{Cl}^-$  interacciona con las proteínas CIC y les otorga la dependencia con el voltaje aún no es conocido a profundidad. La dependencia con el cloruro varía en cada canal CIC. Por ejemplo, en el canal CIC-0 se observa un mayor efecto de la variación de la concentración de  $\text{Cl}^-$  extracelular  $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$  en la apertura del canal que el que tiene el cambio en la concentración de  $\text{Cl}^-$  intracelular  $[\text{Cl}^-]$  (Fig. 2.12) (Pusch et al., 1995; Chen y Miller, 1996). A destacar es que conforme aumentó la  $[\text{Cl}^-]_{\text{ext}}$ , el canal se abrió más fácilmente, es decir, se necesitaron potenciales menos positivos para abrirlo más (Fig. 2.12A). En cambio, el incremento de  $[\text{Cl}^-]$  intracelular produce relativamente poco

efecto sobre la  $P_a$  (Figura 2. B), salvo que la  $P_a$  mínima aumenta significativamente con la concentración intracelular.



**Fig. 2.12** Curvas de activación por voltaje del CIC-0 silvestre en el estado estacionario a concentración variable de  $\text{Cl}^-$ . **A:** La probabilidad de apertura total del canal ( $P_a$ ) se representa contra el voltaje de membrana ( $V_m$ ) a diferentes concentraciones extracelulares de  $\text{Cl}^-$ . Las concentraciones externas de  $\text{Cl}^-$  en mM fueron: (●) 1, (○) 4, (■) 15, (□) 60, (▲) 150, (Δ) 300, (▼) 600; la concentración de  $\text{Cl}^-$  interno fue de 150 mM en todos los casos. **B:**  $P_a$  se representa contra  $V_m$  a diferentes concentraciones intracelulares de  $\text{Cl}^-$ . Las concentraciones internas de  $\text{Cl}^-$  en mM fueron: (○) 60, (□) 150, (Δ) 300; la concentración de  $\text{Cl}^-$  externo fue de 150 mM en todos los casos. Tomadas de Chen y Miller, 1996.

Chen y Miller (1996), con base en sus datos, sugirieron que el  $\text{Cl}^-$  extracelular ( $\text{Cl}^-_{\text{ext}}$ ) podía inducir un estado que favorece la configuración abierta del canal. Propusieron que además de las transiciones simples  $C \leftrightarrow O$  (cerrado [*closed*]  $\leftrightarrow$  abierto [*open*]), el canal podía visitar estados donde el  $\text{Cl}^-_{\text{ext}}$  se había unido al poro. En la Fig. 2.13 se muestra un esquema del modelo de Chen y Miller donde  $C_0$ ,  $C_0:\text{Cl}$  y  $C_1:\text{Cl}$  representan los estados cerrados del canal, mientras que  $O$  y  $O:\text{Cl}$  representan estados abiertos. El “:Cl” en los estados indica que un ion  $\text{Cl}^-$  se ha pegado al poro del canal. En la transición  $C_0 \leftrightarrow C_0:\text{Cl}$  se asume que el pegado del ion  $\text{Cl}^-$  ocurre en el equilibrio, debido a que la ocupación por el  $\text{Cl}^-$  es mucho más rápida que las transiciones de la CP. El canal puede llegar a la configuración cerrada  $C_1:\text{Cl}$  mediante un cambio conformacional después de haberse pegado el ion  $\text{Cl}^-$ . Este cambio conformacional trae como consecuencia que el  $\text{Cl}^-$  esté dentro del campo eléctrico en el poro, lo cual diferencia al estado  $C_1$  del estado  $C_0$ . En el estado  $C_1:\text{Cl}$  comienza la etapa del compuerteo en la cual radica la dependencia con el voltaje del canal (Chen y Miller, 1996).

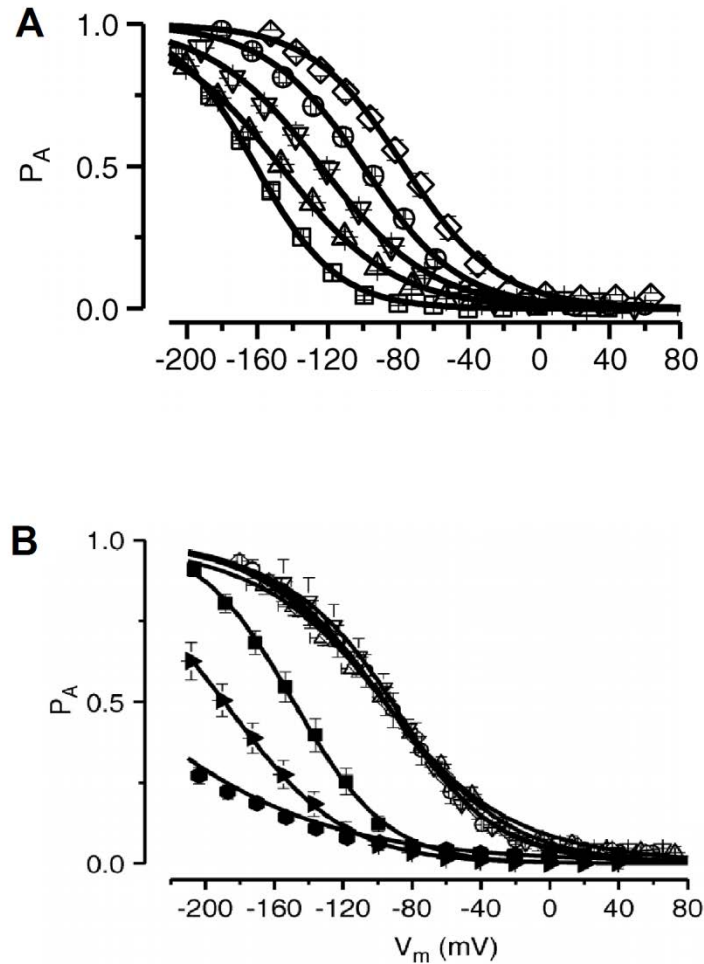


**Fig. 2.13** Modelo cinético de cinco estados del canal CIC-0. Los estados cerrados del canal son representados por la letra C y los estados abiertos por la letra O. El “:Cl” indica que un ion  $Cl^-$  se ha unido al poro en dicho estado. En las configuraciones cerradas, la compuerta del poro bloquea la ruta de permeación del  $Cl^-$ .  $K_c$  es la constante de ocupación del  $Cl^-$  dentro del canal mientras que  $\alpha_1, \alpha_2, \gamma$  y  $\delta$  son las constantes de velocidad dependientes de  $V_m$  de las correspondientes transiciones.

Mediante este modelo, Chen y Miller concluyeron que existen dos posibles tipos de ruta que conducen a la apertura del canal: una ruta de apertura con una constante de velocidad que incrementa a voltajes positivos con una dependencia relativamente grande con el voltaje, y una ruta que depende del voltaje en menor medida y cuya velocidad incrementa a voltajes negativos.

Después se mostraría, sin embargo, que la permeación y el compuerteo en los canales CIC-0 y CIC-1 no están siempre acoplados dado que aniones no permeantes pueden tener un fuerte efecto en el compuerteo (Chen et al., 2003; Rychkov et al., 1998).

Para el canal CIC-2 no se han realizado análisis cuantitativos exhaustivos de la dependencia con el cloruro de su activación, debido sobre todo a la dificultad para hacer estudios a nivel de canal unitario (Sánchez-Rodríguez, 2010). Sin embargo, sí se conoce la dependencia de su  $P_a$  con las concentraciones extracelular e intracelular de  $Cl^-$  (simbolizados como  $[Cl^-]_{ext}$  y  $[Cl^-]$ , respectivamente) (ver Fig. 2.14). Vemos que conforme aumenta la concentración de  $Cl^-$  intracelular, a una concentración extracelular fija de 140 mM, es más sencillo activar el canal dado que se necesitan voltajes menos negativos (Fig. 2.14A). En cambio, conforme incrementó  $[Cl^-]_{ext}$ , a una concentración intracelular fija de 140 mM, no se apreció un cambio muy grande entre las correspondientes curvas de  $P_a$  vs.  $V_m$  (Fig. 2.14B). No obstante, a concentraciones muy bajas de  $Cl^-$  intracelular (10 mM), y que de hecho están más cerca de las condiciones fisiológicas (Kakazu et al., 1999), el aumento de  $[Cl^-]_{ext}$  tuvo un efecto más fuerte, que consistió igualmente en facilitar la aper-



**Fig. 2.14** Dependencia con la concentración de  $Cl^-$  del canal CIC-2. **A:** Probabilidad de apertura  $P_a$  contra potencial de membrana  $V_m$  a diferentes concentraciones intracelulares de  $Cl^-$ . La concentración extracelular fue de 140 mM. Las concentraciones intracelulares [ $Cl^-$ ] (en mM) fueron: 10 ( $\square$ ); 40 ( $\Delta$ ); 80 ( $\nabla$ ); 140 ( $\bullet$ ); y 200 ( $\diamond$ ). **B:** Probabilidad de apertura  $P_a$  contra potencial de membrana  $V_m$  a diferentes concentraciones extracelulares de  $Cl^-$ . La concentración intracelular de  $Cl^-$  fue de 140 mM (símbolos vacíos) o de 10 mM (símbolos rellenos). Las concentraciones extracelulares [ $Cl^-$ ]<sub>ext</sub> (en mM) fueron: 10 ( $\oplus$ ), 40 ( $\blacktriangleright$ ,  $\Delta$ ), 80 ( $\nabla$ ), 140 ( $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) y 200 ( $\diamond$ ). Tomadas de Sánchez-Rodríguez et al., 2010.

tura conforme el canal se hiperpolariza. Esto se puede explicar pensando en la posible presencia en el CIC-2 de los sitios de pegado de  $Cl^-$   $S_{int}$ ,  $S_{cen}$  y  $S_{ext}$ , también presentes en el CIC-ec1. Estos sitios tienen afinidades para el  $Cl^-$  de 20-34, 0.7-4 y 1-6 mM, respectivamente (Lobet y Dutzler, 2006; Picollo et al. 2009). Por ello, cuando se tienen concentraciones intracelulares de  $Cl^-$  tan grandes, es probable que todos los sitios estén ocupados y que ello pueda impedir los efectos del  $Cl^-$  extracelular en el compuerteo (Sánchez-Rodríguez et al., 2010). Además, de la Fig. 2.14A se puede sugerir que el  $Cl^-$  intracelular interacciona con el poro y su compuerta en gran medida.



### **2.4.3 Dependencia con los protones de los canales CIC**

Además del obvio e importante papel que juegan los  $H^+$  en el mecanismo de transporte de los intercambiadores CIC, al tratarse de uno de los propios sustratos del intercambio, se ha notado que los protones también son relevantes para el mecanismo de compuerta de los canales de la familia (Traverso et al., 2006; Lísal y Maduke, 2008).

Se encontró que la acidificación extracelular incrementa la probabilidad de apertura de la compuerta rápida de los canales CIC-0 y CIC-1 (Chen y Chen, 2001; Dutzler et al., 2003). A destacar es que parece que únicamente la ruta de apertura que es relativamente independiente del voltaje es afectada por el pH externo, tal que a pH externo ácido la probabilidad de apertura se vuelve efectivamente independiente del voltaje (Chen y Chen, 2001). En contraste, la constante de velocidad de apertura para la ruta que es fuertemente dependiente del voltaje y la constante de velocidad de cerrado resultaron ser independientes del pH externo (Chen y Chen, 2001). La interpretación de estos resultados es que los protones extracelulares pueden protonar directamente la compuerta Glu-166, conduciendo a la apertura del canal (Dutzler et al., 2003).

El CIC-2 no sólo es activado por hiperpolarización y por  $Cl^-$  intracelular, sino que también es modulado por el pH externo de manera compleja: las corrientes incrementan a pH moderadamente ácido pero se reducen a pH aún más ácido (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Esta observación fue explicada al postular la presencia de dos sitios de pegado de protones independientes con efectos opuestos (Arreola et al., 2002). El sitio activador fue identificado como E207, la compuerta de glutamato del CIC-2 de cobaya (Niemeyer et al., 2003), correspondiente a la posición E213 en el CIC-2 de ratón (mCIC-2). La neutralización del E207 abolió la potenciación inducida por  $H^+$  sin afectar a la inhibición por pH más ácido. Posteriormente, el H532 (siendo H el símbolo de la histidina) fue identificado como el sensor de  $H^+$  responsable del bloqueo del canal a pH ácido (Niemeyer et al., 2009). Al mutar el H532 a fenilalanina se removió selectivamente esta inhibición del canal por pH bajo, dejándole sólo la activación inducida por  $H^+$ .

## **2.5 Mecanismo de activación de los canales CIC**

El grupo de MacKinnon sugirió que el mecanismo de transporte de los intercambiadores CIC se basa en que la compuerta de la cadena lateral de glutamato puede protonarse desde el lado intracelular de la membrana, cambiando su conformación y ocupando el  $S_{ext}$ , donde también puede ser desprotonada (Feng et al., 2010). Estos cambios conformacionales de la compuerta de glutamato son acompañados por el transporte de  $Cl^-$ .

Independientemente de cómo sea el mecanismo de transporte en detalle, se sugiere que el transporte en los intercambiadores CIC puede verse como una “competición” entre

los aniones y la cadena lateral carboxilato de la compuerta de glutamato en los sitios de pegado  $S_{ext}$  y  $S_{cen}$  (Zifarelli y Pusch, 2015). Feng et al. (2012) demostraron que en ausencia de  $Cl^-$ , la compuerta de glutamato no podía transportar  $H^+$  en los CIC-cm y CIC-ec1, lo cual se explicó en términos de la gran afinidad por la unión de aniones que tiene el grupo carboxílico del glutamato dentro del poro, de modo que a falta de iones  $Cl^-$  la cadena lateral de glutamato estaría obstruyendo permanentemente la ruta de transporte. A considerar es esta información para el caso de los canales CIC dado que los transportadores tienen semejanzas estructurales innegables con ellos.

El rol de la compuerta de glutamato en el compuerteo de los canales CIC ha sido ampliamente estudiado. Por ejemplo, en el CIC-0, al neutralizar el Glu-166 se eliminan completamente sus *relajaciones* dependientes del voltaje y el canal permanece en un estado abierto (Dutzler et al., 2003; Traverso et al., 2003). Así, este glutamato parece ser el mayor determinante en el compuerteo rápido del protoporo, aunque cambios conformacionales adicionales pueden acompañar la apertura del canal (Accardi y Pusch, 2003). La conservación de esta compuerta en casi todos los canales e intercambiadores CIC refuerza que ésta sea de sumo interés e importancia para el estudio de cualquier proteína de la familia que se quiera realizar.

Para los canales CIC, se ha propuesto que la propia permeación de los iones  $Cl^-$  tiene un papel primordial en su activación al interactuar con la compuerta de glutamato (Chen y Miller, 1996; Pusch et al., 1995), como ya se mencionó en la Subsección 2.4.2. Sin embargo, la naturaleza precisa de estos mecanismos aún no está del todo clara.

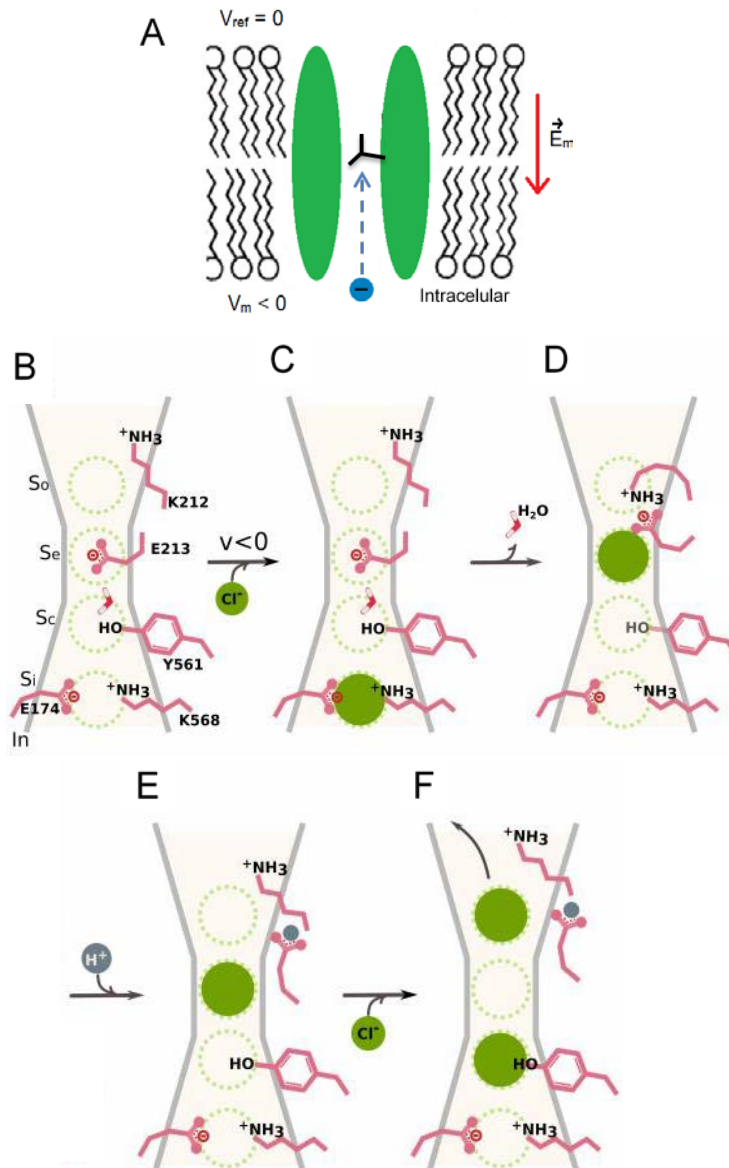
Caso ejemplificativo es el del CIC-2. A pesar de la clara participación de los protones su compuerteo, el origen de la activación dependiente del voltaje del canal es aún controversial. De acuerdo a Sepúlveda y sus colegas, la dependencia con el voltaje de la activación es conferida por la protonación dependiente del voltaje de la compuerta de glutamato (Niemeyer et al., 2009). Por otro lado, Arreola y sus colegas proponen que el pegado de  $Cl^-$  intracelular en el poro, en lugar del pegado de protones, es lo que confiere de sensibilidad al voltaje al mecanismo de compuerta del CIC-2 (Sánchez-Rodríguez et al., 2010, 2012), y que los  $H^+$  tienen el papel de estabilizar la conformación abierta de la compuerta (De Jesús-Pérez et al., 2015).

### 3. Planteamiento del problema

Para el entendimiento de los canales iónicos es primordial conocer qué los activa y cómo lo hace. Se ha observado que uno de los factores indispensables para la activación del canal CIC-2 es la interacción entre la compuerta de glutamato E213 y los iones  $\text{Cl}^-$  (Sánchez-Rodríguez et al., 2010; De Jesús-Pérez et al., 2015).

Se ha sugerido (De Jesús-Pérez et al., 2020) que la diferencia de potencial  $V_m$  a través de la membrana celular fuerza al ion permeante  $\text{Cl}^-$  a entrar al poro y lo desplaza hacia la compuerta del CIC-2, aumentando con ello su energía cinética. Esto ocurre porque el campo eléctrico está orientado del lado extracelular al intracelular (Fig. 3.1A), de tal suerte que el ion de carga negativa es obligado a intentar salir al medio extracelular (Fig. 3.1C). Sin embargo, la presencia de la compuerta glutámica impide este proceso. Para lograr que el anión salga, éste debe ejercer trabajo sobre la cadena lateral del glutamato. La fuerza que ejerce el ion permeante sobre la cadena lateral es electrostática repulsiva, ya que tanto el ion como la cadena lateral tienen carga negativa. No obstante, se ha sugerido que la masa del anión debe también jugar un papel en la apertura del poro. Esto es, una fuerza “estérica” actuando de manera simultánea que la electrostática sobre la cadena lateral la llevará a moverse y dejar la ruta de permeación libre para que el ion o los iones permeantes puedan pasar (Fig. 3.1D).

Recientemente se ha propuesto que la compuerta del poro no está formada únicamente por el glutamato (De Jesús-Pérez et al., 2020). En cambio, parece estar formada por la interacción de los aminoácidos tirosina 561 (Y561) y glutamato 213 (E213) (ver Fig. 3.1B). Estos dos residuos interactúan mediante una molécula de agua formando puentes de hidrógeno entre los dos residuos. Datos de dinámica molecular mostraron que el  $\text{Cl}^-$  llevado hasta la compuerta del canal a causa del voltaje negativo, se posiciona entre los dos residuos ‘partiendo’ esta compuerta en dos. El ion  $\text{Cl}^-$  queda unido a la tirosina mientras que el E213 gira hacia el lado extracelular (Fig. 3.1D). Posteriormente, el E213 gira aún más hasta alcanzar una conformación conocida como “outward facing conformation” o *conformación hacia afuera* por su traducción al español, donde no alcanza todavía el estado abierto (Fig. 3.1E). Sin embargo, éste parece ser el paso fundamental que conduce al estado abierto del canal. Esto es, el anión permeante transfiere la energía que ganó a la compuerta gracias a su desplazamiento en el campo eléctrico, y la cadena lateral finalmente responde abriéndose de manera proporcional a la energía transferida. Esta hipótesis explica que la dependencia con el voltaje del canal proviene del trabajo ejercido por el voltaje sobre el ion permeante hasta llevarlo dentro del poro, donde interactúa con la compuerta. La dinámica molecular y el análisis funcional hechos por De Jesús-Pérez et al. (2020) mostraron que la Y561 mantiene a la compuerta unida en el estado cerrado del canal, que no permite que la cadena lateral de glutamato se abra hacia el lado citosólico y que además impide su proto-

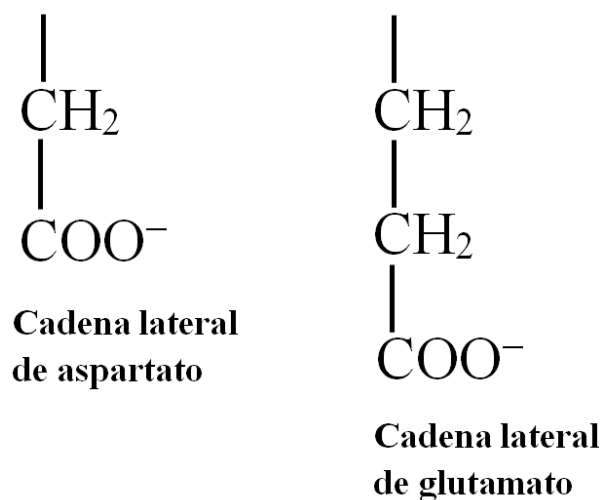


**Fig. 3.1** Representación esquemática del mecanismo de activación electro-estérico del CIC-2. **A:** El potencial de membrana  $V_m < 0$  produce el campo eléctrico  $E_m$  en la dirección mostrada, tendiendo a mover los aniones permeantes (en azul) hacia el exterior del poro del canal, de modo que se encuentra con la compuerta, mostrada en negro. **B:** Se representa un poro con cuatro sitios de unión de aniones, uno más que el caso del ec1-CIC ( $S_o$ ,  $S_c$ ,  $S_e$  y  $S_i$ ) y las cadenas laterales de residuos críticos (E174, K568 [lisina], Y561, E213 y K212) que recubren el poro. Independientemente del voltaje, el poro vacío permanece cerrado por la compuerta Y561–H<sub>2</sub>O–E213. **C:** Tras la hiperpolarización ( $V_m < 0$ ), un Cl<sup>-</sup> intracelular ocupa  $S_i$  marcando el comienzo del proceso de activación. **D:** La compuerta se divide a causa de la repulsión electro-estérica cuando el Cl<sup>-</sup> avanza hacia la vía de permeación y se asienta sobre  $S_c$  y  $S_e$ , acoplado así la permeación a la apertura del poro. **E:** El E213 adopta una conformación hacia afuera e interactúa con la K212. Esta conformación sugiere un estado *pre-abierto*. El puente de sales E213–K212 se rompe por protonación permitiendo que la cadena lateral de K212 se enderece hacia afuera del poro. **F:** Finalmente, el Cl<sup>-</sup> sale del poro cuando otro Cl<sup>-</sup> intracelular ocupa  $S_i$  y  $S_c$ . Un poro doblemente ocupado indica que éste está completamente abierto y es conductor. Todas las figuras (excepto A) fueron tomadas de De Jesús-Pérez et al., 2020.

nación intracelular, lo cual ya se había observado experimentalmente (Niemeyer et al., 2009; Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Aun cuando no está claro cómo sucede esto, con ello se explica por qué el canal CIC-2 se abre a voltajes negativos y no positivos. Más importante aún, esta hipótesis ilustra que el punto central para explicar la dependencia con el voltaje es la interacción de la compuerta con el ion permeante.

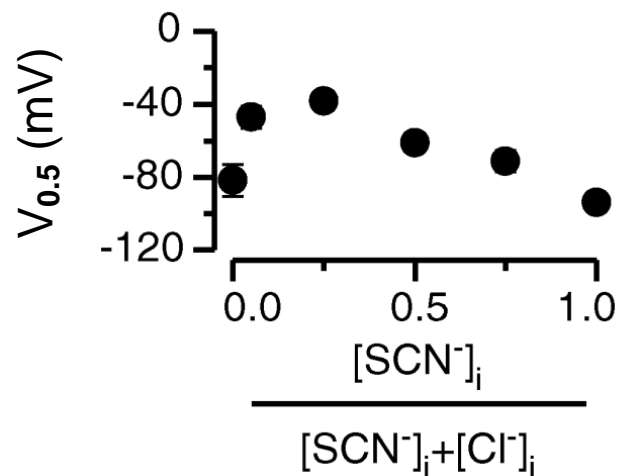
Si bien el trabajo antes descrito es una pieza fundamental para explicar la apertura del canal por el ion permeante, todavía quedan piezas sueltas en dicha hipótesis. Una de ellas es demostrar que la posición del glutamato en la conformación cerrada es el sitio de interacción del ion permeante con la compuerta. Para obtener más información sobre la participación de la compuerta de glutamato de canales CIC en cualquier interacción usualmente se procede a realizar mutaciones del sitio de interés (De Santiago et al., 2005; Traverso et al., 2006; Feng et al., 2012). La idea detrás de esta estrategia es que la perturbación debería alterar la función o prueba que se esté realizando.

En este caso se procedió a hacer una perturbación menor que consistió en modificar el glutamato 213 y evaluar si así cambiaba la interacción con el cloruro al estudiar la dependencia con el voltaje de la apertura. El canal silvestre CIC-2 tiene, como se ha mencionado, una cadena lateral de glutamato (E213). La perturbación consistió en intercambiarla por una cadena lateral de aspartato (D), es decir, hacer la mutación E213D. El aspartato tiene una cadena lateral más corta que el glutamato debido a que tiene un  $-\text{CH}_2-$  menos (Fig. 3.2). Sin embargo, y muy importante, aún conserva la carga negativa de -1. Debido al acortamiento de la cadena, esperamos que la interacción de la tirosina con el residuo de aspartato se vea alterada y por lo tanto también la interacción con el ion permeante.



**Fig. 3.1** Cadenas laterales de aspartato y glutamato,

Para evaluar a detalle la dependencia de la apertura con el efecto del ion permeante en los canales silvestres y E213D, se procedió a emplear mezclas de dos tipos de iones permeantes en el lado intracelular:  $\text{SCN}^-$  (tiocianato) y  $\text{Cl}^-$ , variando sus proporciones e investigando la dependencia con el voltaje de la apertura en cada caso.  $\text{SCN}^-$  y  $\text{Cl}^-$  pueden acceder al poro del CIC-2 silvestre con distintas permeabilidades (Sánchez-Rodríguez et al., 2010; De Jesús-Pérez et al., 2015), de modo que se esperó que apareciera un *comportamiento anómalo ante fracciones molares*. El comportamiento anómalo ante fracciones molares es una propiedad que indica que los distintos tipos de iones con diferentes permeabilidades interactuaron entre sí mientras pasaron por un poro que puede acomodar más de un ion a la vez (Hille, 2001), como es el caso para el canal CIC-2 silvestre, que se piensa tiene varios sitios de pegado donde pueden ser aceptados al menos dos iones al mismo tiempo (Sánchez-Rodríguez et al., 2010; De Jesús-Pérez et al., 2015, 2020). El comportamiento anómalo se manifiesta en alguna propiedad medible del poro, la cual incrementa (o se reduce) conforme aumenta la fracción molar de alguno de los iones presentes, pero que empieza a disminuir (o incrementar) si sigue aumentando la fracción molar del mismo ion. Por ejemplo, en experimentos anteriores (Sánchez-Rodríguez et al., 2010) para canales CIC-2 silvestres, a medida que la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  intracelular se incrementó, el voltaje  $V_{0.5}$  necesario para obtener una probabilidad de apertura aparente  $P_a$  de 0.5 (ver Subsección 4.4.1), se desplazó hacia valores más positivos y luego hacia valores más negativos (Fig. 3.3). Se destaca que también se observó el comportamiento anómalo en los canales CIC-0 y CIC-1 (Pusch et al. 1995; Fahlke et al. 1997; Rychkov et al. 1998).



**Fig. 3.2** Comportamiento anómalo de la fracción molar de aniones permeantes  $\text{SCN}^-$  y  $\text{Cl}^-$  para el potencial medio  $V_{0.5}$  de los canales CIC-2 silvestres. Potencial medio  $V_{0.5}$  contra fracción molar intracelular de tiocianato,  $[\text{SCN}^-]_i / ([\text{SCN}^-]_i + [\text{Cl}^-]_i)$ . Se observa una forma cóncava que implica un comportamiento anómalo. Tomada de Sánchez-Rodríguez et al., 2010.

El comportamiento anómalo del canal CIC-2 se ha determinado previamente utilizando mezclas de iones  $\text{Cl}^- + \text{SCN}^-$  (Sánchez-Rodríguez et al., 2010) y de  $\text{Cl}^- +$  acetato (De Jesús-Pérez et al., 2015). Sin embargo, el acetato tiene una permeabilidad a través del poro del CIC-2 muy pequeña, siendo ~25 veces menor que la del  $\text{Cl}^-$ , mientras que la del  $\text{SCN}^-$  es aproximadamente 1.8 veces mayor incluso (De Jesús-Pérez et al., 2015). Por tanto, se seleccionó la mezcla  $\text{Cl}^- + \text{SCN}^-$  para estos experimentos.

En síntesis, el efecto anómalo ante fracciones molares es una propiedad que reside dentro del poro, por lo tanto, se decidió investigarlo para el canal silvestre y un mutante, ya que la compuerta, que es el objeto de estudio, se encuentra también dentro del poro, en la vía de conducción iónica.

### 3.1 Hipótesis

La hipótesis de este trabajo es que la interacción relevante para la dependencia con el voltaje del canal CIC-2 sucede entre su compuerta y los aniones permeantes, durante el propio proceso de la permeación.

### 3.2 Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue determinar la importancia del glutamato 213 del canal CIC-2 en el proceso dependiente del voltaje de su apertura.

Los objetivos específicos fueron:

1. Estudiar la probabilidad aparente de apertura del canal CIC-2 silvestre y del canal mutado E213D.
2. Investigar cómo se modifica el comportamiento anómalo de la dependencia con el voltaje del proceso de apertura del canal E213D ante distintas fracciones molares intracelulares de  $\text{SCN}^-/\text{Cl}^-$ .

## 4. Métodos

### 4.1 Cultivo celular y expresión del canal CIC-2

Fue utilizado el canal CIC-2 de ratón (*mCIC-2*), expresándolo en células *HEK-293*, por sus siglas en inglés *Human Embryonic Kidney*, o células *embrionarias de riñón humano* (Invitrogen, Carlsbad, California). Las células, mantenidas a una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, y a una temperatura de 37 °C, se sembraron en platos de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino y gentamicina al 1%, se resembraron cuando la densidad celular era de aproximadamente 70%, y fueron resembradas en pozos de 0.5 mL para su transfección. Las células se transfectaron con cDNA pIRES2EGFP-mCIC2 (1 µg/µL) utilizando lipofectamina (Qiagen Inc., Valencia, California) como reactivo de transfección -siguiendo el protocolo del fabricante-, por un tiempo mínimo de 8 horas (De Santiago et al., 2005; Sánchez-Rodríguez et al., 2010). Posteriormente, se les agregó solución salina balanceada de Hanks (HBSS) por 5 minutos, se retiró y se agregó medio de cultivo para luego disgregarlas mecánicamente con una punta de pipeta. Finalmente, las células se colocaron en porta-objetos de 5 mm de diámetro y se les dejó reposar durante 3-8 horas antes de su uso.

El vector de expresión utilizado, pIRES2EGFP, contiene, además de la proteína de CIC-2, la *proteína verde fluorescente intensificada* (o *EGFP*, por sus siglas en inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*), que sirve de *reportero de expresión* de los canales CIC-2 en células exitosamente transfectadas. Esto permitió identificarlas bajo el microscopio por su fluorescencia color verde tras exponerlas a radiación ultravioleta.

### 4.2 Soluciones

Para los experimentos se emplearon diversas soluciones con la composición mostrada en la Tabla 4.1.

El TEACl y el CaCl<sub>2</sub> hicieron de fuentes de iones permeantes Cl<sup>-</sup>. El HEPES sirvió como amortiguador del pH y el EGTA como agente quelante de Ca<sup>2+</sup>. El D-mannitol se empleó para regular la osmolaridad de las soluciones, aspecto importante para los experimentos, dado que se ha observado que una presión osmótica positiva de alrededor de 70 mosm/kg en la membrana celular (causada por la diferente osmolaridad de las soluciones extracelular e intracelular) inhibe los canales de cloruro dependientes del volumen celular (Hernández-Carballo et al., 2010) presentes en las células HEK-293. Se empleó el NaSCN de la solución *b* como fuente de iones SCN<sup>-</sup> permeantes. El pH fue lle-



Solución <i>a</i>	Solución <i>b</i>	Solución extracelular
140 mM de TEACl (cloruro de tetraetilamonio)	140 mM de NaSCN (tiocianato de sodio)	139 mM de TEACl
		0.5 mM de CaCl <sub>2</sub> (cloruro de calcio)
20 mM de HEPES (ácido [2-hidroxietil]piperazina-1-etanosulfónico)	20 mM de HEPES	20 mM de HEPES
20 mM de EGTA (ácido tetracético de etilén glicol [bis-β-aminoetil éter])	20 mM de EGTA	
40 mM de D-mannitol	40 mM de D-mannitol	165 mM de D-mannitol
pH = 7.33	pH = 7.33	pH = 7.34
Osmolaridad: 403 mosm/kg	Osmolaridad: 386 mosm/kg	Osmolaridad: 486 mosm/kg

**Tabla 4.1** Composición de las soluciones intracelulares y extracelulares empleadas para los experimentos electrofisiológicos

vado al pH fisiológico de 7.33 agregando hidróxido de tetraetilamonio (TEAOH).

La solución extracelular indicada en la Tabla 4.1 (concentración de Cl<sup>-</sup> extracelular [Cl<sup>-</sup>]<sub>e</sub> = 140 mM) se usó en todos los experimentos. Para las soluciones intracelulares se utilizaron varias mezclas de las soluciones *a* y *b*, respectivamente, en las proporciones que se indican a continuación:

- Experimentos con canales ClC-2 silvestres:
  - 100% Cl<sup>-</sup>, 0% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 140 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 0 mM).
  - 75% Cl<sup>-</sup>, 25% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 105 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 35 mM).
  - 50% Cl<sup>-</sup>, 50% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 70 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 70 mM).
  - 10% Cl<sup>-</sup>, 90% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 14 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 126 mM).
- Experimentos con canales ClC-2 con mutación E213D:
  - 100% Cl<sup>-</sup>, 0% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 140 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 0 mM).
  - 75% Cl<sup>-</sup>, 25% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 105 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 35 mM).
  - 50% Cl<sup>-</sup>, 50% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 70 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 70 mM).
  - 25% Cl<sup>-</sup>, 75% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 35 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 105 mM).
  - 10% Cl<sup>-</sup>, 90% SCN<sup>-</sup> ([Cl<sup>-</sup>] = 14 mM, [SCN<sup>-</sup>] = 126 mM).

Las *condiciones control* fueron ciertos parámetros experimentales que se tomaron como referencia, que consistieron en el uso de soluciones extracelular e intracelular con

concentraciones de  $\text{Cl}^-$  iguales (140 mM), a un pH de  $\sim 7.33$  y sin ningún otro ion permeante en su composición.

## 4.3 Procedimiento experimental

### 4.3.1 Montaje del experimento

El trabajo experimental consistió en emplear la técnica electrofisiológica *patch clamp* o *fijación de membrana*, en su modalidad de célula completa o *whole cell*. Los cubreobjetos con células se colocaron en el fondo de una cámara de 300  $\mu\text{L}$  llenada previamente de solución extracelular. La cámara se ubicó sobre la platina de un microscopio invertido ECLIPSE TE200 (Nikon) que contó con una lámpara de luz ultravioleta modelo HB-10103AF (Nikon). Para el registro se utilizaron pipetas de vidrio hechas con tubos capilares modelo G86165T-4 (Warner Instruments Inc.) de 1.33 mm de diámetro interno, los cuales fueron calentados y estirados con un estirador de pipetas modelo P-97 (Sutter Instrument Co.). Las puntas de las pipetas fueron pulidas mediante calentamiento adicional con una microforja modelo MF-830 (Narishige), logrando que alcanzaran un diámetro externo aproximado de 2  $\mu\text{m}$ , para posteriormente ser llenadas de solución intracelular. Cada pipeta después fue montada en un cabezal modelo CV 20313U (Axon Instruments, Molecular Devices), equipado con un electrodo de cloruro de plata que entró por la parte posterior de la pipeta en cuestión hasta sumergirse en la solución salina intracelular, conectando eléctricamente la pipeta con el resto de la electrónica de registro (ver Subsección 4.3.3; ver Fig. 4.1A). El cabezal a su vez fue montado a un micromanipulador modelo PCS-5000 (Burleigh) que permitió un fino y preciso acercamiento de la punta de las pipetas a la membrana de las células. Todo el equipo estuvo fijo sobre una mesa antivibratoria modelo 63-500 (Technical Manufacturing Corporation) eléctricamente aislada.

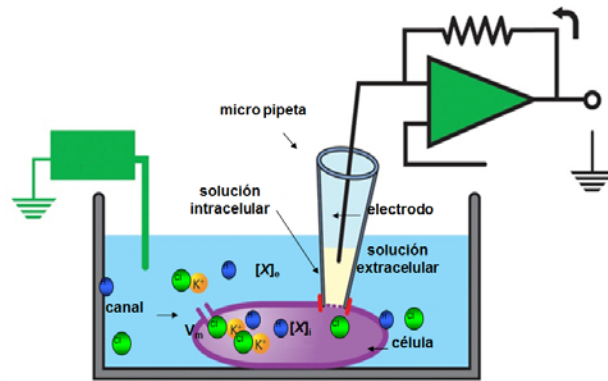
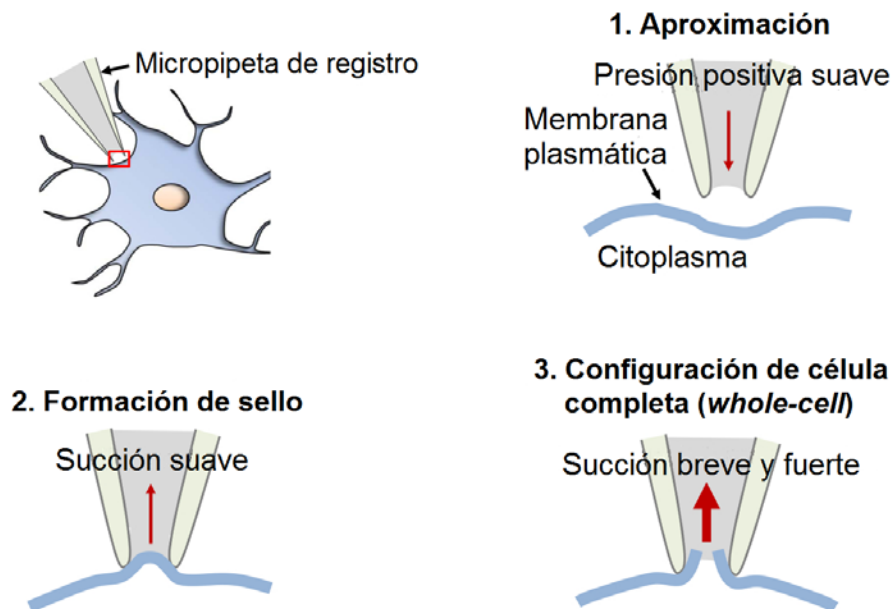
### 4.3.2 La técnica de *patch clamp*

El método para una fijación óptima de voltaje de membrana celular fue desarrollado durante la década de los 40's y principio de los 50's. Su creación se basó en aplicar una electrónica adecuada en el montaje experimental, la cual incluía amplificadores de alta ganancia para mantener un potencial de membrana constante, lo que permitía registrar las corrientes a través de la membrana en cuestión (Curtis y Cole, 1940, 1942; Hodgkin et al., 1952; Hodgkin y Huxley, 1952).

La técnica de *fijación de potencial en micro-áreas de membrana plasmática*, o *fijación de membrana*, o por su denominación más frecuente en inglés: *patch clamp*, es utilizada en el área de la biofísica para estudios electrofisiológicos en células. Sus creadores

fueron Edwin Neher y Bert Sakmann en la década de los 70's (Neher y Sakmann, 1976). El proceso general consiste en rodear un micro-área de membrana con una pipeta de vidrio, formando un sello entre la pared del vidrio y la membrana plasmática que alcanza una resistencia eléctrica del orden de los 10 G $\Omega$ , razón por la que se le conoce como *gigasello* (ver Fig. 4.1B), otorgándole una gran estabilidad y dejando al investigador controlar y fijar el voltaje de membrana  $V_m$  en ese área de manera precisa, ayudado por un circuito de retroalimentación que está conectado al electrodo y que mide el voltaje de membrana *real* y lo compara con el voltaje al cual el experimentador quiere fijar la membrana (Fig. 4.1A). Si hay alguna diferencia, se inyecta corriente eléctrica para compensarla hasta efectivamente fijar el voltaje de membrana al valor específico. La corriente que se añade es igual a la *corriente* que está fluyendo a través de la membrana por los canales iónicos, y este dato es el que registra el investigador (Sánchez-Rodríguez, 2010).

En la modalidad *whole-cell* -o “*célula completa*”- de la técnica *patch clamp* (ver Fig. 4.1), tras lograr el sello de alta resistencia, se rompe el segmento de membrana aislado por la pipeta mediante la aplicación de una breve succión para establecer acceso eléctrico y físico al citoplasma, lo que permite dializar la célula con la solución de la pipeta y registrar la corriente total  $I$  de todos los canales iónicos que se expresan en la membrana celular de forma simultánea.

**A****B**

**Fig. 4.1** Montaje y técnica de patch clamp en la modalidad *whole-cell*. **A:** Diagrama de la técnica de *patch clamp* en su modalidad *whole-cell*. Se muestra que la solución extracelular del interior de la cámara está aterrizada, y el circuito de retroalimentación unido al electrodo para el registro se representa en la parte superior derecha. La pipeta de registro (también llamada *micropipeta* por las dimensiones de su punta) está llena de solución intracelular con una concentración de iones permeantes  $[X]_i$ , mientras que la concentración extracelular de iones permeantes es  $[X]_e$ . **B:** Ilustración de la realización del sello para la técnica *patch clamp*, modalidad *whole-cell* para una neurona. En 1. la pipeta de registro mantiene una pequeña presión positiva para ayudar a la formación del sello mientras se acerca lentamente a la membrana plasmática. En 2., cuando se llega a un ligero contacto con la célula, se aplica una suave succión a través de la pipeta para lograr el gigasello entre la pared de ésta y la membrana. En 3. con una succión más fuerte y de corta duración, se rompe la membrana celular, lo que permite comenzar a hacer registros en la modalidad *whole-cell*. **B** fue modificada de Segev et al., 2016.

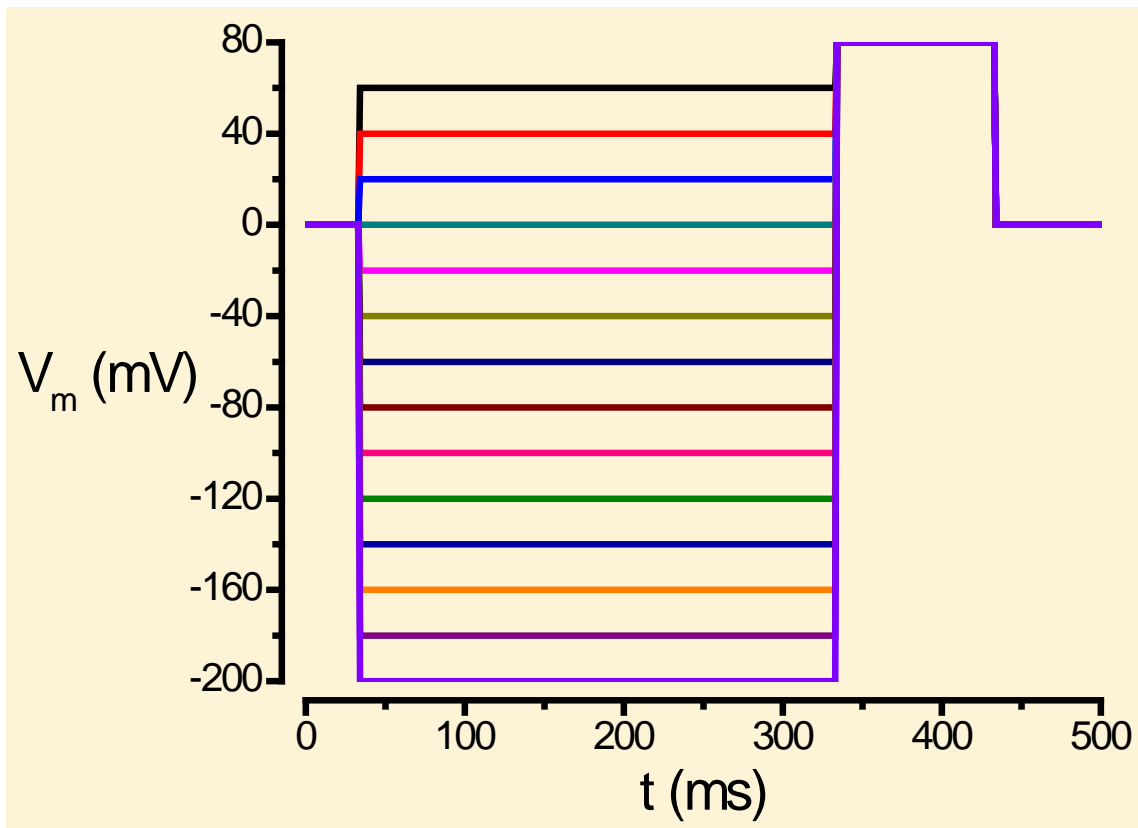
### 4.3.3 Registros de corriente iónica

Las células seleccionadas para las mediciones fueron aquellas aisladas y exitosamente transfectadas, es decir, aquellas células que mostraran fluorescencia al ser expuestas a luz ultravioleta (ver Sección 4.1). Para registrar la corriente macroscópica iónica de cloruro de los canales se emplearon el amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Molecular Devices), la tarjeta análogo-digital Axon Digidata 1550B (Axon Instruments, Molecular Devices) y el programa de adquisición pClamp 10 (Axon Instruments, Molecular Devices). La corriente  $I$  fue digitalizada y filtrada a 10 kHz y 5 kHz, respectivamente. Los experimentos se realizaron a una temperatura ambiente de  $\sim 22$  °C.

### 4.3.4 Protocolos de voltaje

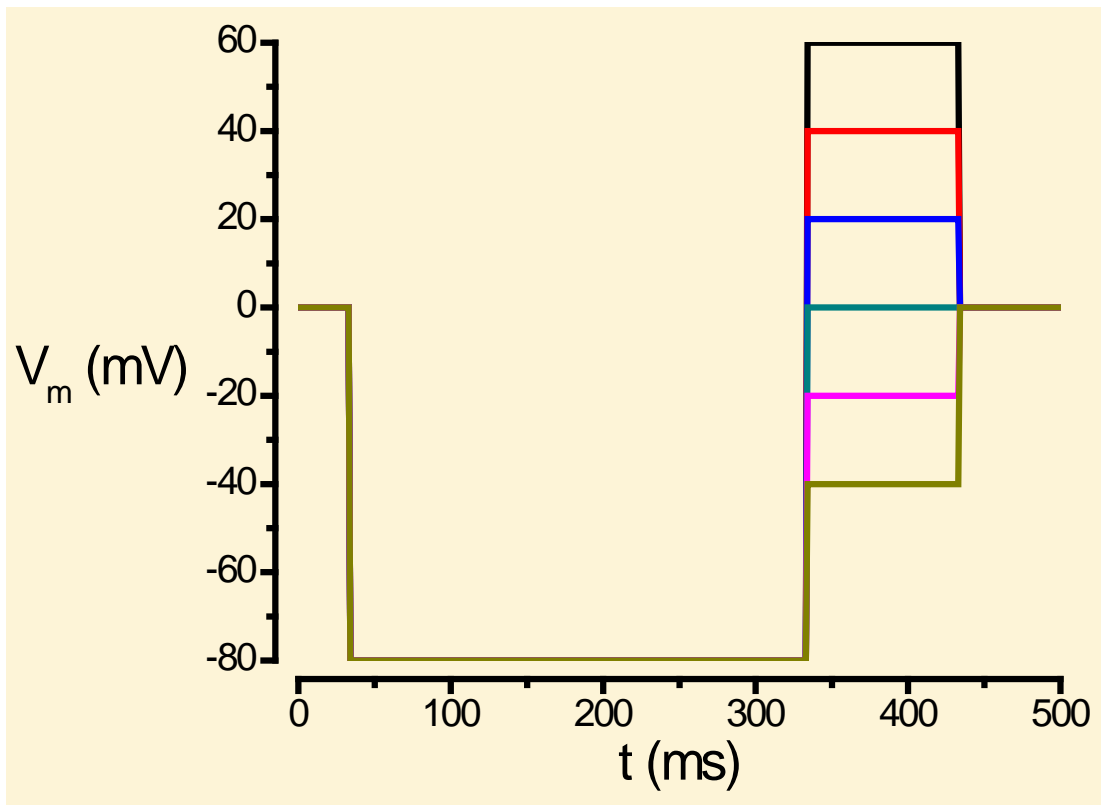
Un *protocolo de voltaje* está formado por un número determinado de estímulos que cambian el voltaje  $V_m$  en el interior de la célula, con el objetivo de provocar alguna reacción en los canales de interés.

En este trabajo, el protocolo de estímulos de voltaje aplicados a las células para activar los canales y posteriormente conocer la probabilidad de apertura aparente  $P_a$  y la cinética del canal CIC-2 se muestra en la Fig. 4.2. Éste es un *protocolo hiperpolarizante*, nombrado así ya que se utilizan voltajes negativos, o hiperpolarizantes, para activar los canales CIC-2, como se ha mostrado que ocurre (De Santiago et al., 2005). Como el interés de estudio fue la dependencia con el voltaje de la apertura del canal, el potencial *neutral* al que se mantuvieron las células fue de 0 mV, dado que a este voltaje los canales se encuentran en el estado cerrado (De Santiago et al., 2005). Cada estímulo está formado por “escalones” de voltaje. El primer estímulo que forma el protocolo y según se aprecia en la Fig. 4.2, consistió en la aplicación de un primer escalón de voltaje  $V_m$  de 0 mV durante 30 ms, seguido de un segundo escalón de +60 mV, y que tuvo duración variable, siendo la suficiente para llevar los canales al estado abierto estacionario (ver Subsección 4.4.1): 300-500 ms para el CIC-2 silvestre y 50-100 ms para el canal E213D. El tercer escalón del estímulo se mantuvo invariable y llevó las células a +80 mV durante 100 ms, lo que sirvió para registrar la *corriente de cola* (ver Sección 5.1). Los estímulos terminan llevando la célula de nuevo al voltaje neutro de 0 mV. Para lograr registrar la corriente de apertura del canal a gran variedad de voltajes tanto positivos como negativos, el estímulo antes descrito se repitió de forma sucesiva, variando el segundo escalón en incrementos de -20 mV, hasta alcanzar el valor de -200 mV. En algunos experimentos se finalizó el protocolo cuando se alcanzó un voltaje de -160 mV o de -180 mV, si es que se observaba que las células morían a voltajes muy negativos.



**Fig. 4.2** *Protocolo hiperpolarizante de voltaje.* Se aplicó este protocolo para activar los canales CIC-2 y a partir de la corriente iónica macroscópica determinar la cinética de apertura y cerrado de los canales. Cada color representa un estímulo distinto. Entre cada estímulo y el estímulo consecutivo transcurrió un tiempo de 7 segundos.

Se utilizó además otro protocolo, que llamaremos *protocolo de inversión* (Fig. 4.3). Éste sirvió para obtener el potencial de inversión  $V_r$  de la corriente, es decir, el potencial para el cual la corriente cambia de signo o, dicho de otro modo, se vuelve nula al existir un flujo de iones neto igual a cero. Nuevamente la duración del segundo escalón fue lo suficientemente larga para alcanzar una corriente en estado estacionario. Cada estímulo consistió en un primer escalón a 0 mV, un segundo escalón hiperpolarizante de valor constante de -80 mV cuya finalidad fue la de abrir los canales, y un tercer escalón a un potencial variable, de -40 a +60 mV, para registrar las corrientes de cola (Sección 5.1). El valor de esta corriente se graficó como función de  $V_m$  para determinar el potencial al cual la corriente invierte su signo como se explica en la siguiente Sección.



**Fig. 4.3** *Protocolo de inversión.* Protocolo de voltaje aplicado a los canales CIC-2 para conocer su potencial de inversión  $V_r$ . Cada color representa un estímulo distinto. Entre cada estímulo y el estímulo consecutivo transcurrió un tiempo de 7 segundos.

## 4.4 Análisis de datos

El análisis de los datos experimentales se realizó mediante los software pClamp 10 (Axon Instruments, Molecular Devices) y Origin 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA). En las gráficas donde no se especifique lo contrario, se realizó un promedio de las cantidades a representar para un conjunto de datos de  $n$  células, con sus correspondientes barras de error estándar de la media.

### 4.4.1 Medición de la probabilidad de apertura de los canales

El *estado estacionario* de los canales iónicos abiertos es aquel en el que la corriente que fluye a través de ellos alcanza un valor *estable* o que no cambia en el tiempo. Para relacionar la probabilidad aparente de apertura  $P_a$  con el voltaje de membrana  $V_m$  en el estado estacionario, se realizó un análisis basado en los siguientes principios.

Ante una diferencia de potencial  $V_m$  los canales transitan del estado cerrado al abierto para después poder conducir al anión  $\text{Cl}^-$ . La primera transición cerrado-abierto se denomina *compuerteo* (ver Subsección 2.1.2), ya que es en este proceso que la compuerta que gobierna la apertura se abre. Debido a la naturaleza aleatoria del proceso de apertura y asumiendo, por simplicidad, que el canal sólo puede estar en dos estados, *cerrado* y *abierto*, el compuerteo del canal lo podemos cuantificar determinando la probabilidad de encontrar al canal en el estado abierto:  $P_a$ , o probabilidad de apertura aparente. Como se comentó (Subsección 2.1.2),  $P_a$  puede o no ser dependiente del voltaje, en este caso sí lo es. Una vez está abierto, el canal puede pasar al estado conductivo. El estado conductivo del canal se puede cuantificar midiendo la corriente unitaria  $i$ .

De acuerdo a la ley de Ohm, la corriente unitaria  $i$  que fluye a través de un solo poro abierto de un canal, como función de  $V_m$ , está dada por

$$i(V_m) = g(V_m - V_r), \quad (\text{E4.1})$$

donde  $g$  es la conductancia de este poro,  $V_r$  es su potencial de inversión y la diferencia  $V_m - V_r$  es la llamada “fuerza impulsora” (o “*driving force*”, por su nombre en inglés). La corriente estacionaria  $I_{est}$  medida en los experimentos, no obstante, es la corriente total debida a todos los canales activados en la membrana por una diferencia de potencial determinada. Como cada canal tiene dos protoporos, la corriente *macroscópica estacionaria*  $I_{est}$  está dada por

$$I_{est}(V_m) = 2Ni(V_m)P_a(V_m), \quad (\text{E4.2})$$

donde  $N$  es el número total de canales en la membrana y  $P_a$  es la probabilidad aparente de apertura de cada canal en el estado estacionario, la cual es una función de  $V_m$ . Utilizando E4.1 y E4.2 se tiene

$$I_{est}(V_m) = 2Ng(V_m - V_r)P_a(V_m). \quad (\text{E4.3})$$

Además, para la corriente total se cumple

$$I_{est}(V_m) = G(V_m)(V_m - V_r), \quad (\text{E4.4})$$

donde  $G$  es la conductancia total de los canales activados en la célula, la cual es una función de  $V_m$ . Mediante las ecuaciones E4.3 y E4.4 obtenemos que

$$P_a(V_m) = \frac{G(V_m)}{2Ng} = \frac{G(V_m)}{G_{m\acute{a}x}}, \quad (\text{E4.5})$$

donde  $G_{m\acute{a}x}$  es una constante: la conductancia máxima de la célula, es decir,  $2Ng$ , que corresponde a la conductancia de la membrana celular si todos los canales en la membrana estuvieran activados.

Para conocer la probabilidad de apertura  $P_a$  se aplicaron las ecuaciones E4.4 y E4.5, obteniendo la conductancia  $G$  a partir de la corriente macroscópica en el estado estacionario  $I_{est}$  (ver Sección 5.1), y estimando la conductancia máxima  $G_{m\acute{a}x}$  a partir de un ajuste de Boltzmann (ver Apéndice) de los datos de  $G$  graficados contra  $V_m$ , al hacer que en la función ajustada  $V_m \rightarrow -\infty$ . La función de Boltzmann de la conductancia es



$$G(V_m) = G_{mín} + \frac{G_{máx} - G_{mín}}{1 + e^{(V_m - V_{0.5})/V_s}}, \quad (E4.6)$$

donde  $G_{mín}$  y  $G_{máx}$  son las conductancias mínima y máxima, respectivamente, y  $V_{0.5}$  y  $V_s$  son parámetros de ajuste. Esta función normalizada respecto a la conductancia máxima no es más que la probabilidad aparente de apertura:

$$P_a(V_m) = P_{mín} + \frac{P_{máx} - P_{mín}}{1 + e^{\frac{zF}{RT}(V_m - V_{0.5})}}, \quad (E4.7)$$

donde  $P_{mín}$  y  $P_{máx}$  son las probabilidades de apertura mínima y máxima, respectivamente,  $V_{0.5}$  es el *potencial medio*, que se define como el potencial necesario para tener una probabilidad de apertura de  $(P_{mín} + P_{máx})/2$ , y  $V_s$  se substituyó por  $RT/zF$  (ver Apéndice) con  $R$  la constante ideal de los gases,  $T$  la temperatura ambiente,  $F$  la constante de Faraday y  $z$  la carga aparente de la transición global, en unidades de carga elemental. Por definición,  $P_{máx} = 1$ , además en las mediciones resultó que  $P_{mín} \approx 0$ , de modo que la ecuación E4.7 se puede aproximar en la mayoría de casos a

$$P_a(V_m) = \frac{1}{1 + e^{\frac{zF}{RT}(V_m - V_{0.5})}}, \quad (E4.8)$$

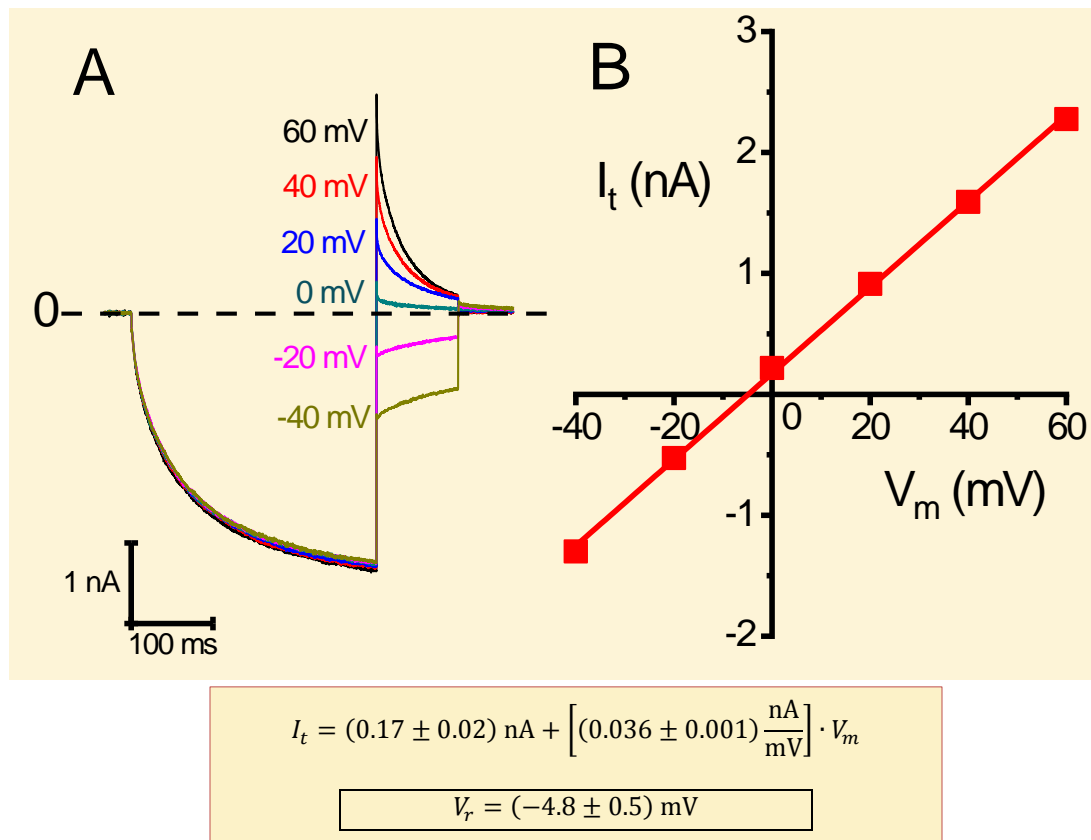
de modo que  $P_a(V_{0.5}) = 0.5$  y  $P_a(V_m) \rightarrow 0$  si  $V_m \rightarrow \infty$ .

#### 4.4.2 Medición del potencial de inversión de los canales

El procedimiento para medir el potencial de inversión  $V_r$  de los canales CIC-2 se basó en los trazos obtenidos mediante el protocolo de inversión descrito en la Subsección 4.3.4. En la Fig. 4.4A se muestra un ejemplo ilustrativo de un trazo de corriente macroscópica  $I$  contra tiempo  $t$  para los canales CIC-2 silvestres de una célula registrada en presencia de soluciones control. Primero la corriente  $I$  se mantiene en 0 indicando canales cerrados. Después, se observa la activación del canal producida por el escalón de voltaje de -80 mV, midiéndose una corriente negativa que implica la salida de iones  $\text{Cl}^-$ . La magnitud de la corriente incrementa con el tiempo hasta volverse estacionaria. Al final, el tercer escalón de voltaje variable (+60, +40 mV...) produce las corrientes de cola  $I_t$ , de signo positivo o negativo dependiendo del voltaje que las provocó y las cuales decrecen en magnitud con el tiempo. Al inicio de las corrientes de cola, los canales siguen en estado abierto estacionario y la cinética de decaimiento expresa el cierre de los canales. Los valores iniciales de las corrientes de cola  $I_t$  son de utilidad para calcular parámetros de interés, como lo es el potencial de inversión.

$I_t$  se midió alrededor de 1 ms después de que empezó el tercer escalón de los estímulos (De Santiago et al., 2005). Para obtener el potencial de inversión  $V_r$ ,  $I_t$  se graficó como función de  $V_m$  (Fig. 4.4B). Se realizó luego un ajuste lineal a los datos. El voltaje al cual la recta ajustada cruza el cero en la corriente es igual a  $V_r$ . En el ejemplo de la Fig. 4.4

se obtuvo un potencial de inversión de  $(-4.8 \pm 0.5)$  mV, el cual está cerca del potencial de inversión teórico de 0 mV (ver Sección 5.1).

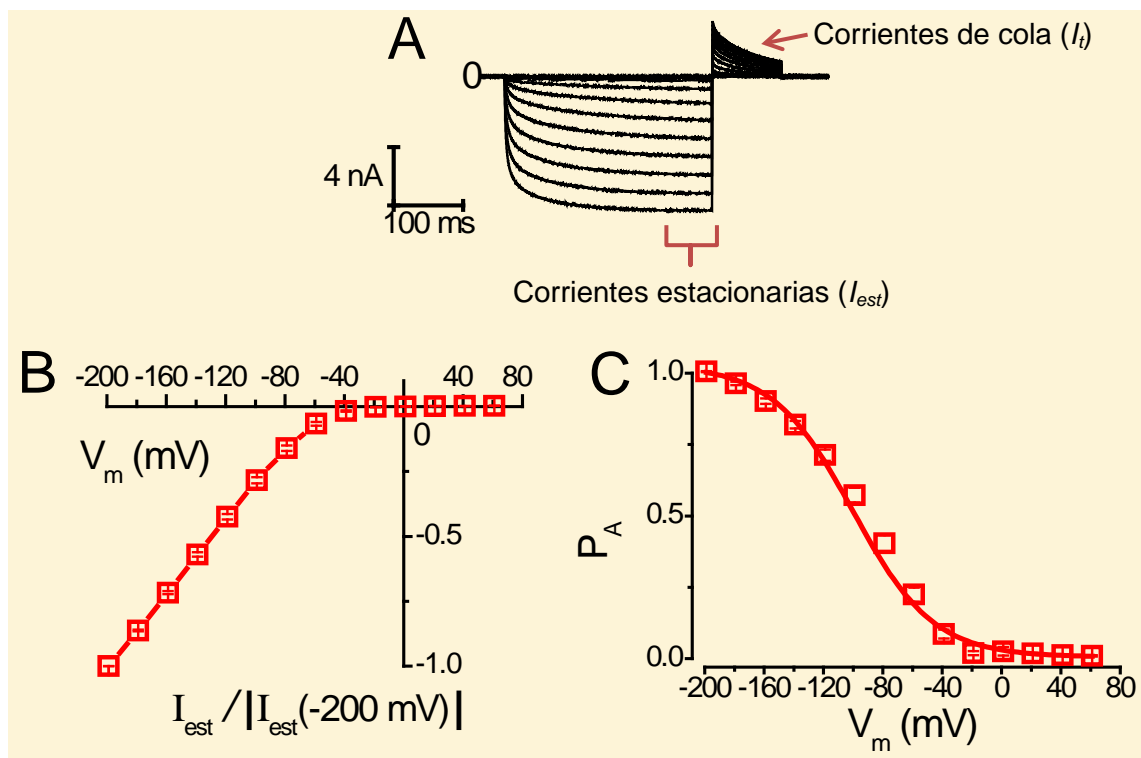


**Fig. 4.4** *Obtención del potencial de inversión de los canales CIC-2 silvestres.* **A:** Trazos de corriente macroscópica de cloruro registrada con el protocolo de inversión (Fig. 4.3) en presencia de soluciones con concentraciones de  $[\text{Cl}^-] = [\text{Cl}^-]_e = 140$  mM (soluciones control). Cada color representa un trazo provocado por un estímulo distinto. Al lado de los trazos se muestra qué potencial fue aplicado en el tercer escalón. **B:** Corriente de cola  $I_t$  contra voltaje de membrana  $V_m$  a partir de los trazos de **A**. La corriente de cola se midió justo 1 ms después de que empezó, esto es, al inicio del tercer escalón de voltaje del protocolo. Se realizó un ajuste lineal (línea roja), con los parámetros indicados en el recuadro del fondo. Mediante este ajuste se obtuvo un potencial de inversión  $V_r = (-4.8 \pm 0.5)$  mV para los canales CIC-2 de esta célula.

## 5. Resultados

### 5.1 Propiedades macroscópicas de la corriente de cloruro de los canales CIC-2

Se registraron las células transfectadas con el cDNA del canal CIC-2 silvestre utilizando soluciones control. Al aplicar el protocolo hiperpolarizante, se observa la corriente macroscópica característica de los canales CIC-2 (Fig. 5.1A). En el segundo escalón de



**Fig. 5.1** Comportamiento de la corriente del canal silvestre CIC-2 en condiciones control. **A:** Trazos de corriente macroscópica de cloruro descritos por los canales al aplicarles el protocolo hiperpolarizante. Las corrientes estacionarias  $I_{est}$  se miden a partir del instante en que los trazos muestran un valor aproximadamente constante en el tiempo. Las corrientes de cola  $I_t$  aparecen tras aplicar una abrupta despolarización del potencial de membrana luego de que se alcanzó el estado estacionario. **B:** Corriente estacionaria normalizada respecto a la magnitud de la corriente registrada a -200 mV,  $I_{est} / |I_{est}(-200 \text{ mV})|$ , contra el potencial de membrana  $V_m$ . La corriente estacionaria  $I_{est}$  se obtuvo como se ha descrito antes: a partir de registros como los de la parte A, midiendo la corriente cuando ya alcanzó un estado estacionario. **C:** Probabilidad de apertura aparente  $P_a$  del canal contra potencial de membrana  $V_m$ . La probabilidad fue calculada con la conductancia  $G$  normalizada respecto a la conductancia máxima, a su vez calculada con la  $I_{est}$ . Se realizó un ajuste de Boltzmann de los datos (línea continua), obteniendo los parámetros de ajuste de  $V_{0.5} = (-100.2 \pm 2.8) \text{ mV}$  y  $z = -0.93 \pm 0.07$ . Se tomaron promedios de una muestra de  $n = 5$ .

cada estímulo de voltaje, la magnitud de la corriente aumenta paulatinamente, lo que implica la apertura gradual de canales adicionales, hasta llegar a un valor constante –la llamada *corriente estacionaria*  $I_{est}$ –. En esta condición y de acuerdo a la ec. E4.2, podemos decir que cada canal presente en la célula alcanza una probabilidad de apertura  $P_a$  que depende del voltaje. Además, se observó que mientras más negativo es  $V_m$ , la corriente incrementa en magnitud. Esto se debe a que  $i$  y  $P_a$  aumentan y con ello más iones pasan a través de la membrana celular. En este caso, el cloruro fluye del interior al exterior de la célula. A  $V_m$ 's positivos la corriente es prácticamente nula (Fig. 4.2, segundo escalón). En el comienzo del tercer escalón aparecen las *corrientes de cola*  $I_t$ , provocadas tras cambiar el voltaje de un valor hiperpolarizante a uno depolarizante (Fig. 4.2, tercer escalón). Al observarlas se entiende que a voltajes positivos puede haber un flujo de iones en sentido opuesto al que se da si el estímulo es negativo (es decir, el  $Cl^-$  *entra* a la célula), y que esta corriente de cola se extingue rápidamente. Esto implica que los canales se cierran a voltajes positivos pero que, mientras están abiertos, los iones pueden seguir permeando a través de ellos bajo la influencia de fuerzas impulsoras (ver Subsección 4.4.1) positivas y negativas.

En la Fig. 5.1B se muestra la corriente estacionaria normalizada  $I_{est} / |I_{est}(-200 \text{ mV})|$  graficada contra el voltaje de membrana  $V_m$  para los canales silvestres. En esta figura se observa una magnitud de corriente nula para voltajes positivos y una corriente cuya magnitud es cada vez mayor conforme  $V_m$  se hace más negativo. Es por ello que los canales CIC-2 son *rectificadores de corriente entrante*, ya que si les aplica alguna diferencia de potencial, sólo permiten un flujo de iones  $Cl^-$  desde dentro hacia afuera de la célula.

La probabilidad aparente de apertura  $P_a$  de los canales silvestres (Fig. 5.1C) se calculó aplicando el procedimiento matemático descrito en la Subsección 4.4.1 a partir de las corrientes estacionarias de los trazos de corriente (Fig. 5.1A). La forma de la dependencia de  $P_a$  contra  $V_m$  indica que conforme el voltaje se hace más negativo, se alcanza una probabilidad de apertura que tiende a 1 (esto se observa claro a partir de  $V_m = -200 \text{ mV}$  aproximadamente), mientras que al hacer cada vez más positivo  $V_m$ ,  $P_a$  llega a cero y se mantiene en este valor. De esta manera se explican las curvas de  $I_{est}$  normalizada vs.  $V_m$ , ya que en 5.1B se nota que a  $V_m \geq 0$  la corriente estacionaria se vuelve nula. Los datos fueron analizados considerando que los canales sólo están en los estados *abierto* o *cerrado* (ver Apéndice) y que la probabilidad de encontrarlos en cualquiera de esos estados es una función exponencial de  $V_m$  descrita mediante la ecuación de Boltzmann (E4.7). La línea continua en la Fig 5.1C muestra que la función de Boltzmann ajustó de manera satisfactoria con los datos. El ajuste arroja que el potencial medio para obtener una  $P_a$  de 0.5 es de  $V_{0.5} = (-100.2 \pm 2.8) \text{ mV}$  y que la carga aparente desplazada durante la transición *cerrado*  $\rightarrow$  *abierto* es  $z = -0.93 \pm 0.07$ . Esta carga puede ser una carga intrínseca de la proteína o puede ser algo extrínseco. En este caso, el CIC-2 carece de un dominio cargado cuya posición cambie al modificar el potencial (Subsección 2.1.2) y cuya carga sea cercana a -1. Por otro lado, se ha propuesto que los iones  $Cl^-$  participan en la apertura de los canales CIC y en

particular en el CIC-2 (Zifarelli y Pusch, 2015). Ya que la carga del ion y la carga aparente son semejantes, entonces es razonable concluir que los datos están de acuerdo con la idea de que el ion participa en el proceso de apertura del canal y que podría ser responsable de la dependencia con  $V_m$  del proceso de apertura.

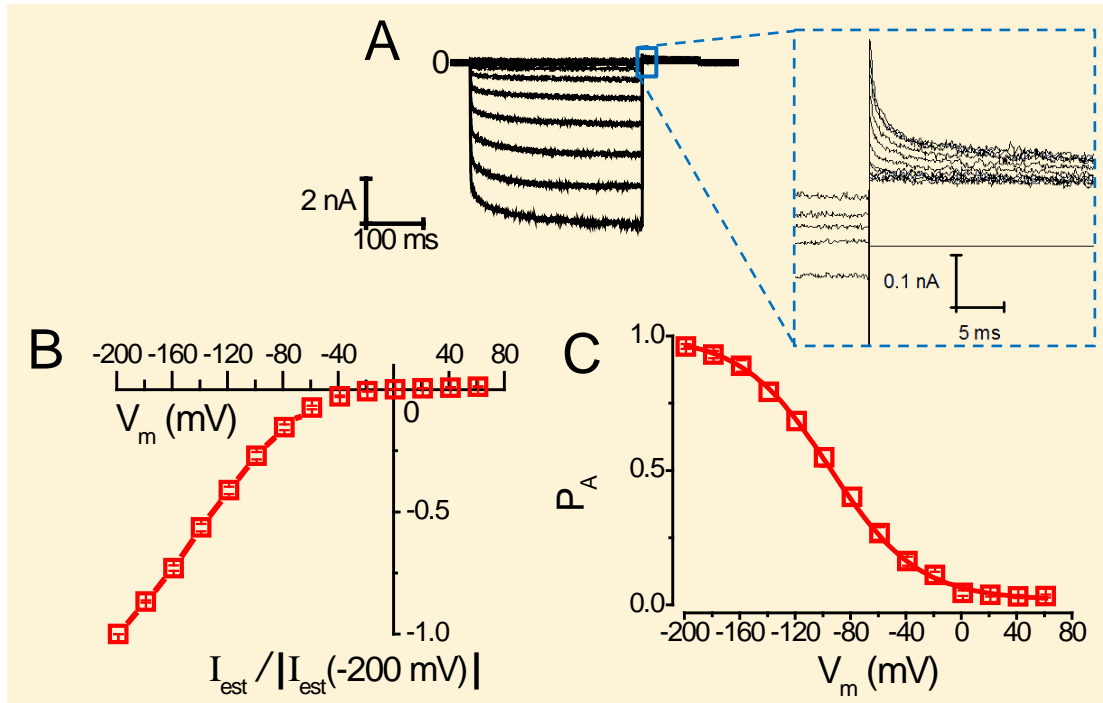
Los registros utilizados para la estadística de los canales CIC-2 silvestres en condiciones control provinieron de células en las que el potencial de inversión  $V_r$  (ver Subsección 4.4.2) fue cercano a cero. Para calcular el potencial  $V_r$  para una sola especie de iones permeantes se utiliza la ecuación de Nernst, la cual dice que

$$V_r = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{Cl}^-]_e}{[\text{Cl}^-]_i}. \quad (\text{E5.1})$$

De modo que si las concentraciones extracelular e intracelular de iones permeantes  $\text{Cl}^-$  son iguales, como en este caso,  $V_r$  debería de ser cero. Por lo tanto, para el análisis se seleccionaron registros cuyos  $V_r$  fueran cercanos al valor nulo. Al descartar células con potenciales de inversión que resultaron alejados del cero, se desechan mediciones en las que probablemente los iones habían fluido del interior al exterior de la célula de manera tan copiosa que se alteraron considerablemente las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  externa e interna (ocurrió una *depleción* de iones). Así, el potencial de inversión medio del canal CIC-2 silvestre en condiciones control para esta muestra ( $n = 5$ ) fue  $V_r = (0.33 \pm 0.55)$  mV.

## 5.2 Diferencias en las propiedades de la corriente de los canales CIC-2 al sustituir la compuerta de glutamato por aspartato

Para estudiar la interacción del residuo glutamato localizado en la posición 213 (E213) formando parte de la compuerta del canal con el ion  $\text{Cl}^-$ , se realizó la mutación E213D (el reemplazo del glutamato 213 por un aspartato) en la secuencia del canal CIC-2, la cual se comprobó por secuenciación. En este caso, se conservó la carga negativa pero se acortó la cadena lateral. El registro de células transfectadas con esta mutante con el protocolo hiperpolarizante en condiciones control muestra un comportamiento como el que se observa en la Fig. 5.2A. Las corrientes inducidas por el cambio de voltaje a través de la membrana durante el segundo escalón de voltaje indican que la hiperpolarización causa la apertura de los canales, y que a  $V_m > 0$  hay una corriente positiva prácticamente despreciable, como también apreciamos en la curva de corriente-voltaje (Fig. 5.2B). Las diferencias más notables entre los trazos de canales silvestres comparados con mutantes están en: 1) el tiempo de activación de los canales, ya que los canales mutantes aparentemente alcanzan el estado estacionario más rápido que los canales silvestres (ver Fig. 5.1A), es decir, su velocidad de apertura es mayor; y 2) la corriente de cola, que para los canales E213D alcanza una magnitud y una duración mucho menores que para los canales silvestres (ver recuadro de la Fig. 5.2A). Esto último sugiere que los canales



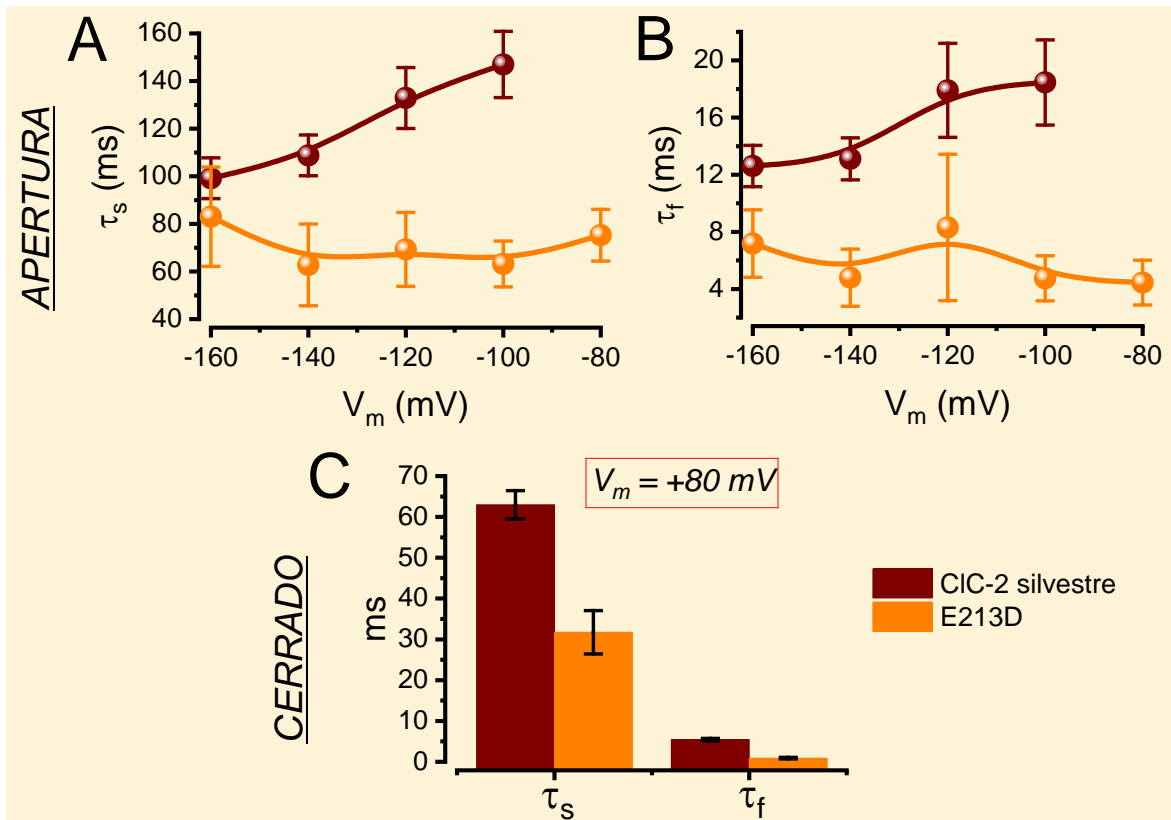
**Fig. 5.2** Comportamiento de la corriente del canal CIC-2 con la mutación E213D en condiciones control. **A:** Trazos de corriente macroscópica de cloruro descritos por los canales CIC-2 con la mutación E213D al aplicarles el protocolo hiperpolarizante. Se muestra en el recuadro verde una ampliación de las corrientes de cola. **B:** Corriente estacionaria normalizada respecto a su magnitud registrada a -200 mV,  $I_{est}/|I_{est}(-200 \text{ mV})|$ , contra potencial de membrana  $V_m$ . **C:** Probabilidad de apertura aparente  $P_A$  del canal contra potencial de membrana  $V_m$ . Se realizó un ajuste de Boltzmann (línea continua) con los parámetros de ajuste  $V_{0.5} = (-94.9 \pm 1.5) \text{ mV}$  y  $z = -0.80 \pm 0.02$ . La muestra fue de  $n = 6$ .

mutantes se cierran más rápido y que a potenciales positivos probablemente a los iones  $\text{Cl}^-$  les sea más difícil permear a través del poro del canal mutado.

Las suposiciones anteriores se comprobaron cuantitativamente realizando un ajuste biexponencial de primer orden de las corrientes macroscópicas de cloruro  $I$  contra tiempo  $t$  (Figs. 5.1A y 5.2A) registradas en las células con canales silvestres y mutantes, justo como hicieron De Santiago et al. (2005). Las funciones de ajuste tuvieron la forma

$$I(t) = A_s e^{-t/\tau_s} + A_f e^{-t/\tau_f} + C, \quad (\text{E5.2})$$

donde  $\tau_s$  y  $\tau_f$  son las constantes de tiempo lenta y rápida, respectivamente, y  $A_s$ ,  $A_f$  y  $C$  son constantes de ajuste. Para entender las velocidades de apertura y cerrado de los canales, los parámetros de mayor interés son las constantes de tiempo, las cuales indican qué tan rápido se abren o se cierran los canales –a mayor  $\tau$ , mayor lentitud de apertura o cerrado. De modo que los ajustes biexponenciales se realizaron para las corrientes observadas en trazos como los de la Fig. 5.1A ó 5.2A cuando los canales se activaban por acción del voltaje hasta llegar al estado estacionario (De Santiago et al., 2005), cuantificando así qué tan rápido se abrieron (Figs. 5.3A y 5.3B). De igual manera, aplicando el mismo ajuste a las corrientes

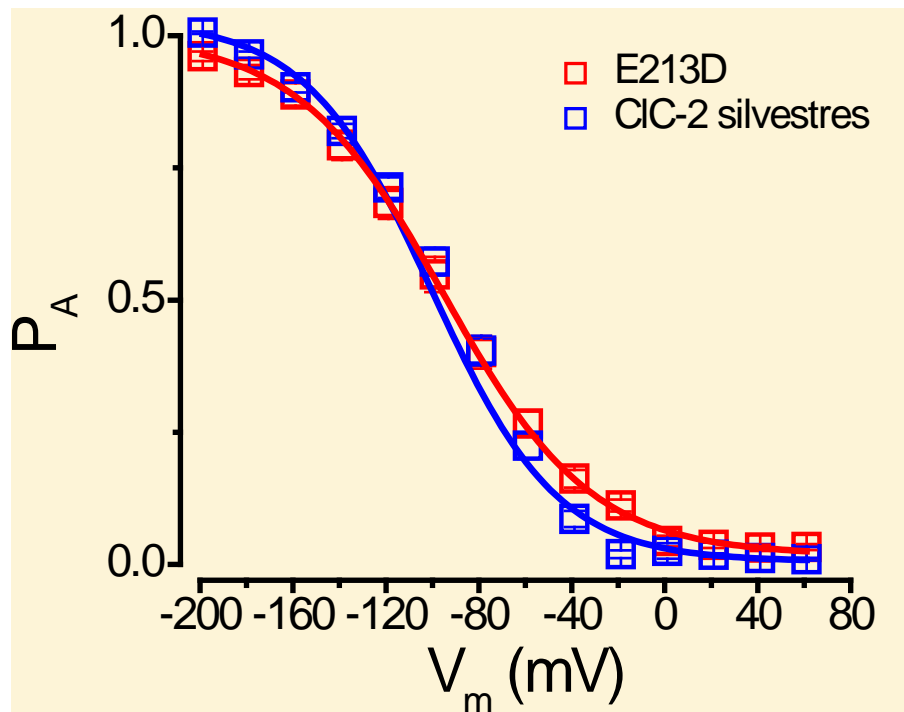


**Fig. 5.3** Comparación de las constantes de tiempo lenta y rápida,  $\tau_s$  y  $\tau_f$ , para los procesos de apertura y cerrado de los canales CIC-2 silvestres y con la mutación E213D. **A** y **B**: Se muestran las constantes de tiempo  $\tau_s$  y  $\tau_f$  de la activación, respectivamente, contra  $V_m$ . Se observándose que los canales con compuerta mutada a aspartato se abren más rápidamente. **C**: Se muestran las constantes de tiempo  $\tau_s$  y  $\tau_f$  del cerrado de los canales silvestres y mutantes, calculadas a un  $V_m = +80$  mV. Se demuestra que, al menos para este  $V_m$ , los canales E213D se cierran mucho más rápido que los canales CIC-2 silvestres. Las líneas que conectan los puntos son curvas *B-spline* colocadas como opción por el software Origin 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para unir los datos suavemente y ayudar a notar mejor el comportamiento.  $n = 5$  (CIC-2 silvestre), 6 (E213D).

de cola posteriores en los trazos, se pudo medir qué tan rápido fue el cerrado de los canales (Fig. 5.3C). Cabe destacar que las velocidades de apertura y cerrado son dependientes de  $V_m$ , por tanto, las  $\tau_s$  y  $\tau_f$  medidas para la desactivación o cerrado de los canales sólo fueron conocidas para un  $V_m = +80$  mV, que es el potencial del escalón que provoca las corrientes de cola (ver Subsección 4.3.4, Fig. 4.2). Mientras tanto, las constantes de tiempo  $\tau_s$  y  $\tau_f$  del proceso de apertura de los canales fueron conocidas para un rango más amplio de voltajes  $V_m$ , de los cuales se seleccionaron los datos correspondientes a algunos de los  $V_m$  más negativos, ya que para éstos se observa una mayor y más clara apertura. En la Fig. 5.3 se muestran estas mediciones, comprobándose con ellas las ideas expuestas en el párrafo anterior, ya que las constantes de tiempo de los canales E213D fueron, en general, significativamente más pequeñas. Esto se corroboró con una prueba *t* de Student no pareada, que indicó que las constantes de tiempo del canal E213D son estadísticamente menores a las constantes de tiempo del canal silvestre, excepto la  $\tau_s$  de apertura a -160 mV

y las  $\tau_f$  de apertura a -120 y -160 mV, que resultaron ser estadísticamente iguales ( $p < 0.05$ ). Gracias a ello, se puede decir que la transición entre los estados abierto-cerrado para el canal con la compuerta de aspartato es más rápida que en el canal con compuerta de glutamato. Además, de la Fig. 5.3 se puede también señalar que la constante de tiempo  $\tau_s$  es  $\sim 10$  veces más grande que  $\tau_f$ , tanto para el canal silvestre –como ya se había reportado por De Santiago et al. (2005)– como para el canal E213D.

La dependencia de la corriente estacionaria normalizada  $I_{est} / |I_{est}(-200 \text{ mV})|$  con el voltaje  $V_m$  de los canales E213D es muy similar a la que tienen los canales CIC-2 silvestres (Figs. 5.2B y 5.1B). La dependencia con el voltaje  $V_m$  de la probabilidad de apertura  $P_a$  de estos canales fue obtenida con las corrientes estacionarias  $I_{est}$  de los trazos como se ha descrito antes. El ajuste de Boltzmann para los canales E213D arrojó un potencial medio  $V_{0.5}$  de  $(-94.9 \pm 1.5)$  mV y una carga aparente  $z$  de  $-0.80 \pm 0.02$  (Fig. 5.2C). Por tanto, comparado con los canales silvestres que tienen una compuerta de glutamato, los canales con la compuerta de aspartato necesitan de voltajes un poco menos hiperpolarizantes para abrirse, mas no es una diferencia radical (ver Fig. 5.4). Esta observación se apoyó con una prueba  $t$  de Student no pareada que indicó que los  $V_{0.5}$  de CIC-2 silvestre y E213D no son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ), aunque los valores de  $z$  sí resultaron serlo. El potencial de inversión  $V_r$ , promedio de los canales E213D en condiciones control fue de



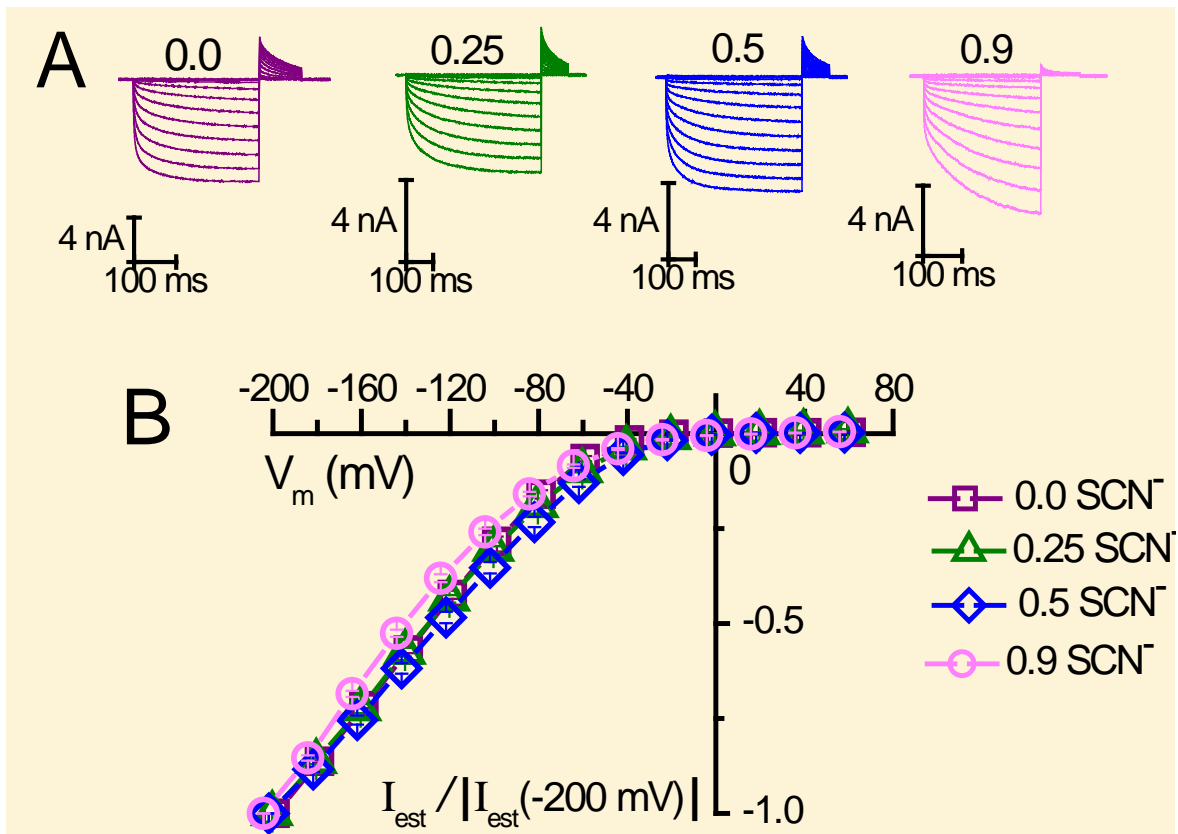
**Fig. 5.4** Comparación de las curvas de probabilidad de apertura aparente  $P_a$  contra voltaje de membrana  $V_m$  de los canales CIC-2 silvestres y E213D en condiciones control. Se realizaron ajustes de Boltzmann (líneas continuas) con los siguientes parámetros de ajuste de  $V_{0.5}$  (en mV) y  $z$ , respectivamente:  $-100.2 \pm 2.8$ ,  $-0.93 \pm 0.07$  (CIC-2 silvestre);  $-94.9 \pm 1.5$ ,  $-0.80 \pm 0.02$  (E213D).  $n = 5$  (CIC-2 silvestre),  $6$  (E213D).



( $-8.4 \pm 2.3$ ) mV, ocurriendo una mayor desviación del  $V_r$  esperado que la que se observó para el canal silvestre (Sección 5.1). Una prueba  $t$  de Student no pareada ( $p < 0.05$ ) respaldó que los  $V_r$  medios de canal silvestre y mutado son estadísticamente diferentes.

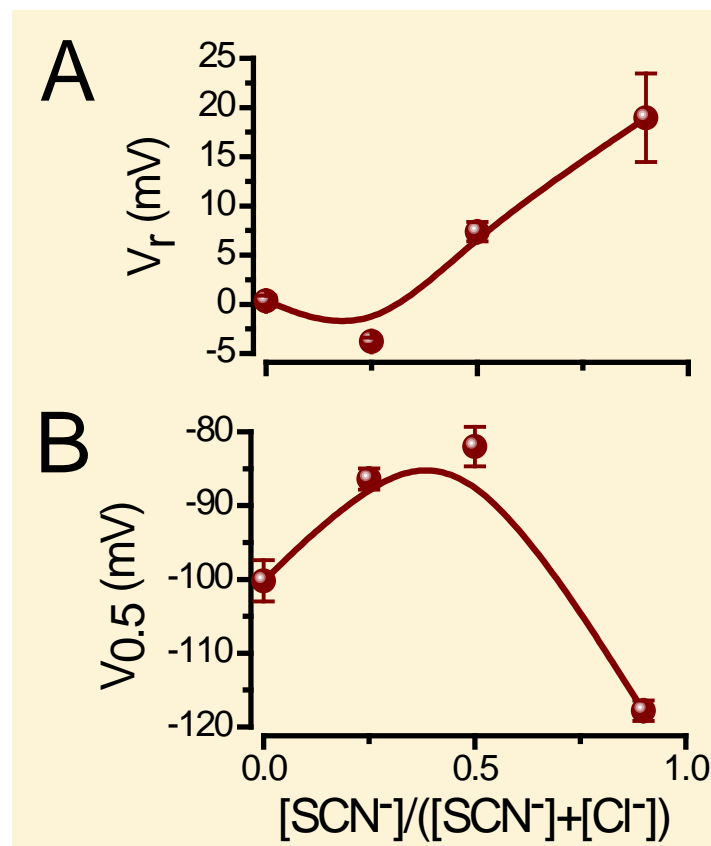
### 5.3 Efecto de la variación de la fracción molar de tiocianato intracelular en los canales CIC-2 silvestre y con la mutación E213D

Los canales CIC-2 pueden tener más de un ion a la vez en su poro. Los datos de dinámica molecular (De Jesús-Pérez et al., 2020) sugieren que al menos dos iones pueden ocupar el poro simultáneamente. Por lo tanto, el glutamato E213 no está experimentando el efecto de



**Fig. 5.5** Comportamiento de la corriente del canal CIC-2 silvestre ante diferentes fracciones molares de  $\text{SCN}^-$  intracelular. **A:** Trazos de corriente macroscópica de cloruro descritos por los canales CIC-2 silvestres al aplicarles el protocolo hiperpolarizante. Encima de cada trazo se muestra la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  intracelular  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$  a la que se obtuvo dicho registro. **B:** Corrientes estacionarias normalizadas respecto a sus magnitudes registradas a  $-200$  mV,  $I_{\text{est}}/|I_{\text{est}}(-200 \text{ mV})|$ , contra potencial de membrana  $V_m$ . A la derecha del panel **B** se muestra la simbología de las fracciones molares de  $\text{SCN}^-$  intracelular a las que corresponden las gráficas.  $n = 5-9$ .

sólo un ion durante el proceso apertura/conducción, sino que está experimentando el efecto de al menos dos iones en el poro. Se está suponiendo que la dependencia con  $V_m$  proviene de la interacción de E213 con los iones  $\text{Cl}^-$  que ocupen el poro. Una manera de evaluar cualitativamente esta interacción es usando mezclas de iones permeantes, donde alguno de los iones es más permeante que el otro. La concentración total de aniones permanece constante mientras que la fracción molar de los aniones varía entre 0 y 1. Si los iones permeantes son A y B, de esta manera se esperaría que la compuerta estuviera expuesta a duplas de una sola clase de ion, AA o BB, o a duplas AB o BA. Por lo tanto, el efecto de estas combinaciones sobre la compuerta será diferente. Para analizar este efecto se realizaron experimentos con distintas fracciones molares de  $\text{SCN}^-$  intracelular, como ya se explicó en el Capítulo 3. En la Fig. 5.5 se muestra el efecto que tuvo la variación de la fracción molar de tiocianato intracelular  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$  en la corriente del canal CIC-2 silvestre, para las fracciones molares que se habían especificado en la Sección 4.2: 0.0, 0.25, 0.5 y 0.9. Según se aprecia en la Fig. 5.5A, la cinética de la corriente de los cana-

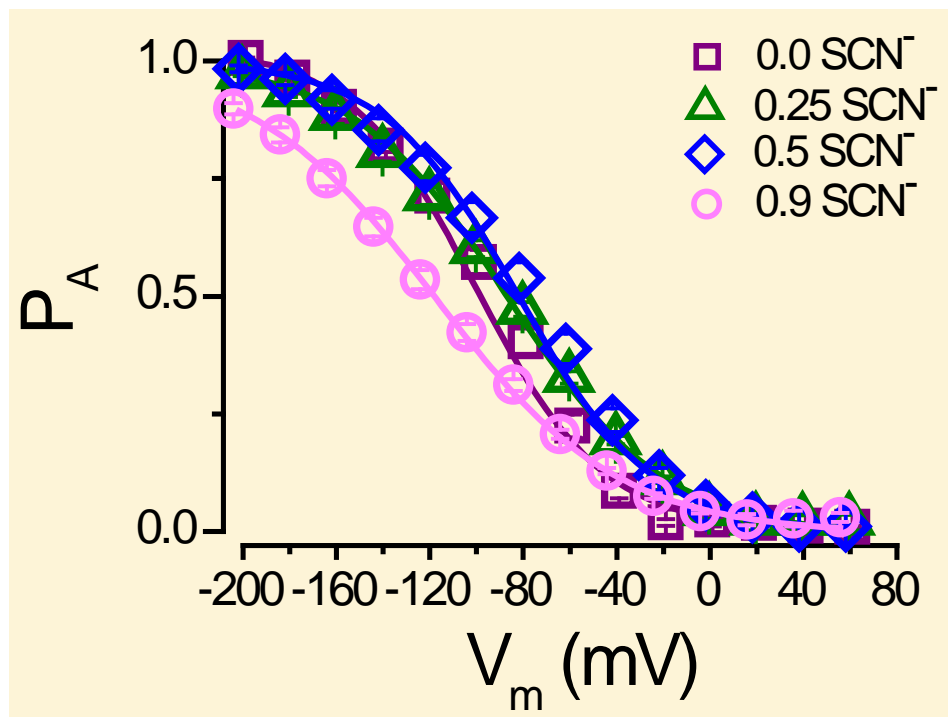


**Fig. 5.6** Dependencia del canal CIC-2 silvestre con la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  intracelular. **A:** Potencial de inversión  $V_r$  contra  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$ . **B:** Potencial medio  $V_{0.5}$  contra  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$ . Ambos potenciales muestran un comportamiento anómalo. Las líneas que conectan los puntos son curvas B-

spline colocadas como opción por el software Origin 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para unir los datos suavemente y ayudar a notar mejor el comportamiento.  $n = 5-9$ .

les CIC-2 silvestres es muy similar para las distintas fracciones molares. Una observación es que para la fracción de 0.9 el tamaño de las corrientes de cola disminuye. El comportamiento de la corriente estacionaria  $I_{est}$  (Fig. 5.5B) tampoco varía mucho con las diferentes fracciones molares de tiocianato y cloruro.

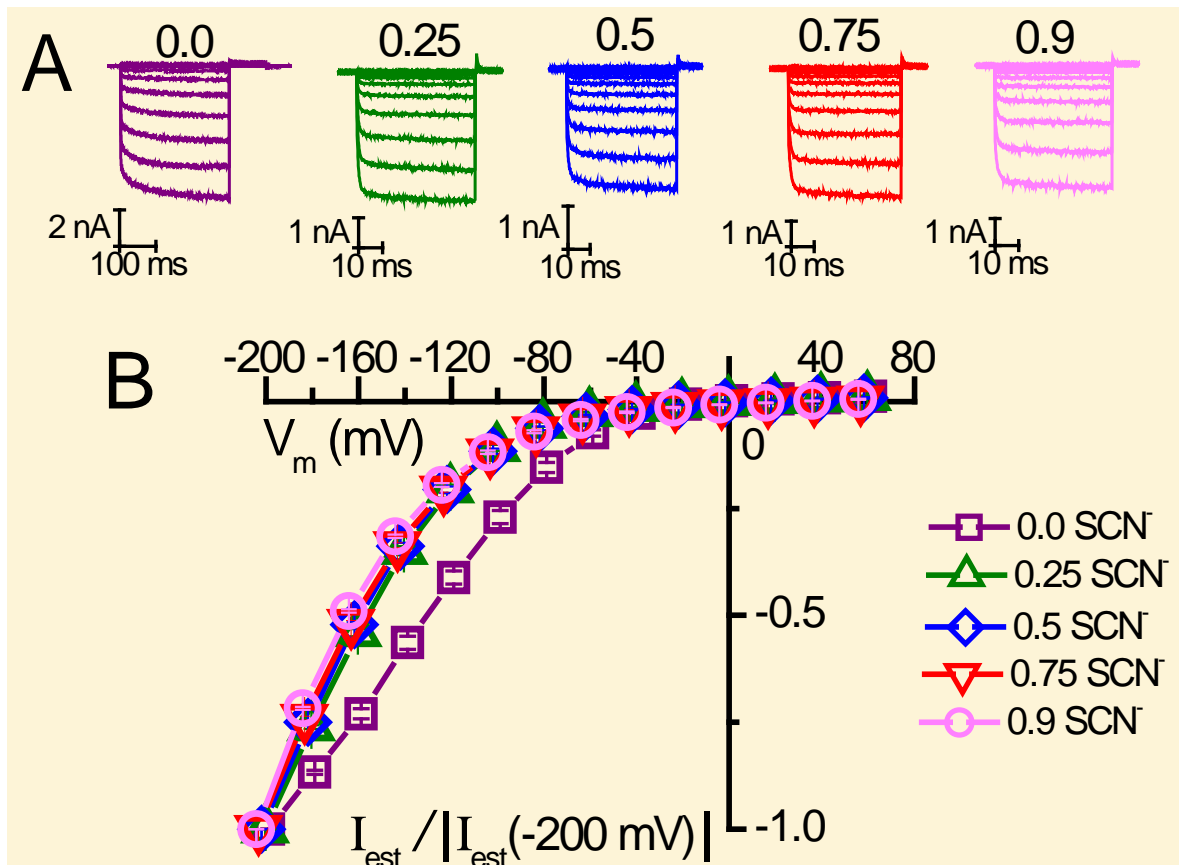
Es muy importante observar la dependencia con la fracción molar de  $SCN^-$  intracelular que tiene el potencial de inversión  $V_r$  del canal silvestre CIC-2 (Fig. 5.6A): al aumentar la fracción molar de  $SCN^-$  intracelular primero  $V_r$  se corre a potenciales negativos, pero si se incrementa aún más,  $V_r$  se corre a potenciales positivos. A este comportamiento se le denomina *comportamiento anómalo ante fracciones molares de iones permeantes* (ver Capítulo 3), y confirma que el poro es ocupado por más de un anión a la vez, como se había demostrado anteriormente (Sánchez-Rodríguez et al., 2010; De Jesús-Pérez et al., 2015).



**Fig. 5.7** Probabilidades de apertura aparentes  $P_a$  del canal CIC-2 silvestre contra potencial de membrana  $V_m$  a diferentes fracciones molares intracelulares de  $SCN^-$ . Se realizaron ajustes de Boltzmann (líneas continuas) con los siguientes parámetros de  $V_{0.5}$  (en mV) y  $z$ , respectivamente:  $-100.2 \pm 2.8$ ,  $-0.93 \pm 0.07$  ( $\square$ );  $-86.4 \pm 1.4$ ,  $-0.76 \pm 0.02$  ( $\Delta$ );  $-82.0 \pm 2.7$ ,  $-0.88 \pm 0.05$  ( $\diamond$ );  $-117.8 \pm 1.4$ ,  $-0.64 \pm 0.02$  ( $\circ$ ). A la derecha se muestra la simbología de las fracciones molares de  $SCN^-$  intracelular a las que corresponden las gráficas.  $n = 5-9$ .

Habiendo demostrado que el canal tiene un comportamiento multi-iónico y que la compuerta que debe abrirse para que el ion fluya se encuentra dentro del poro, la cuestión

siguiente es si el comportamiento anómalo del  $V_r$  ante fracciones molares también aparece en la dependencia con  $V_m$  de la  $P_a$ , lo cual en efecto ocurre. Las curvas de probabilidad de apertura aparente  $P_a$  se corren a potenciales menos negativos a bajas fracciones molares de  $\text{SCN}^-$ , indicando que los canales necesitan menos voltaje para poder abrirse, pero al aumentar la fracción molar sucede lo contrario, la  $P_a$  se corre a potenciales más negativos (Fig. 5.7). Esto se puede apreciar mejor en la Fig. 5.6B, donde se muestran los valores de  $V_{0.5}$  de la  $P_a$  contra fracción molar, que representan una medida directa de qué tan hiperpolarizante debe ser el potencial de membrana  $V_m$  para facilitar la apertura del canal.

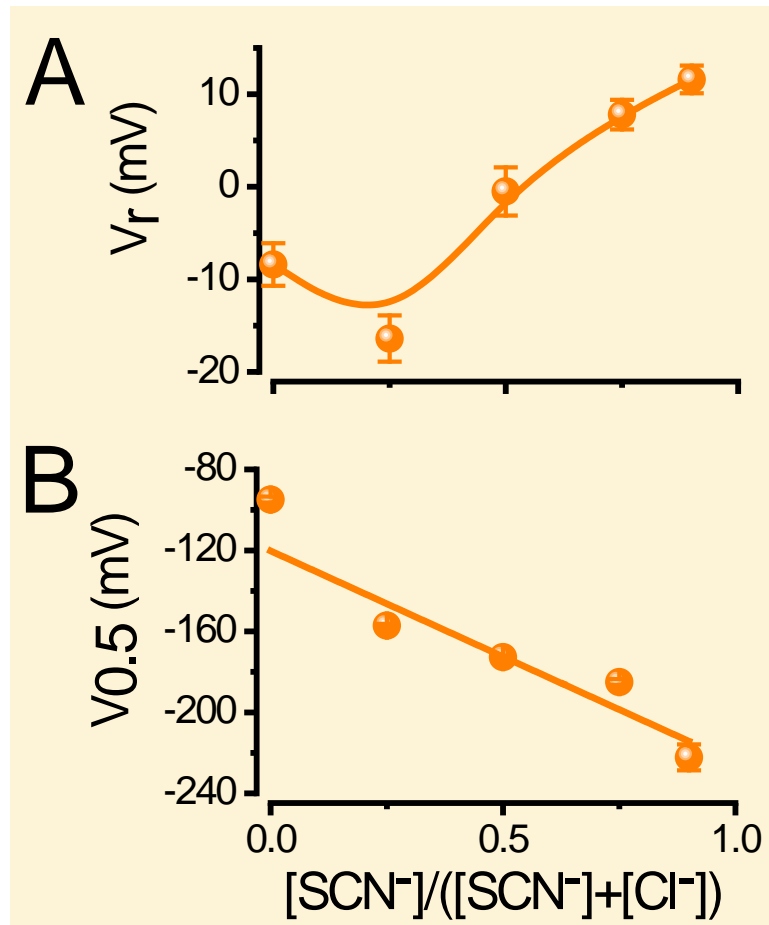


**Fig. 5.8** Comportamiento de la corriente del canal CIC-2 con la mutación E213D ante diferentes fracciones molares de  $\text{SCN}^-$  intracelular. **A:** Trazos de corriente macroscópica de cloruro descritos por los canales CIC-2 E213D al aplicarles el protocolo hiperpolarizante. Encima de cada trazo se muestra la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  intracelular  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$  a la que se obtuvo dicho registro. **B:** Corrientes estacionarias normalizadas respecto a sus magnitudes registradas (a -200 mV),  $I_{\text{est}} / |I_{\text{est}}(-200 \text{ mV})|$ , contra potencial de membrana  $V_m$ . **C:** Probabilidades de apertura aparentes  $P_a$  del canal contra potencial de membrana  $V_m$ . A la derecha del panel **B** se muestra la simbología de las fracciones molares de  $\text{SCN}^-$  intracelular a las que corresponden las gráficas.  $n = 6-10$ .

En la Fig. 5.8 se muestran datos análogos pero para los canales E213D. La cinética de la corriente macroscópica de cloruro (Fig. 5.8A) no varió mucho a lo largo de las

distintas fracciones molares de  $\text{SCN}^-$ , pues se siguen apreciando las pequeñas corrientes de cola y una activación rápida de los canales. Se destaca que la dependencia de la corriente estacionaria con  $V_m$  (Fig. 5.8B) se ve alterada en presencia de  $\text{SCN}^-$  intracelular, pues la curva de  $I_{est}/|I_{est}(-200\text{ mV})|$  para la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  de 0.0 difiere significativamente del resto de curvas, las cuales son muy parecidas entre sí.

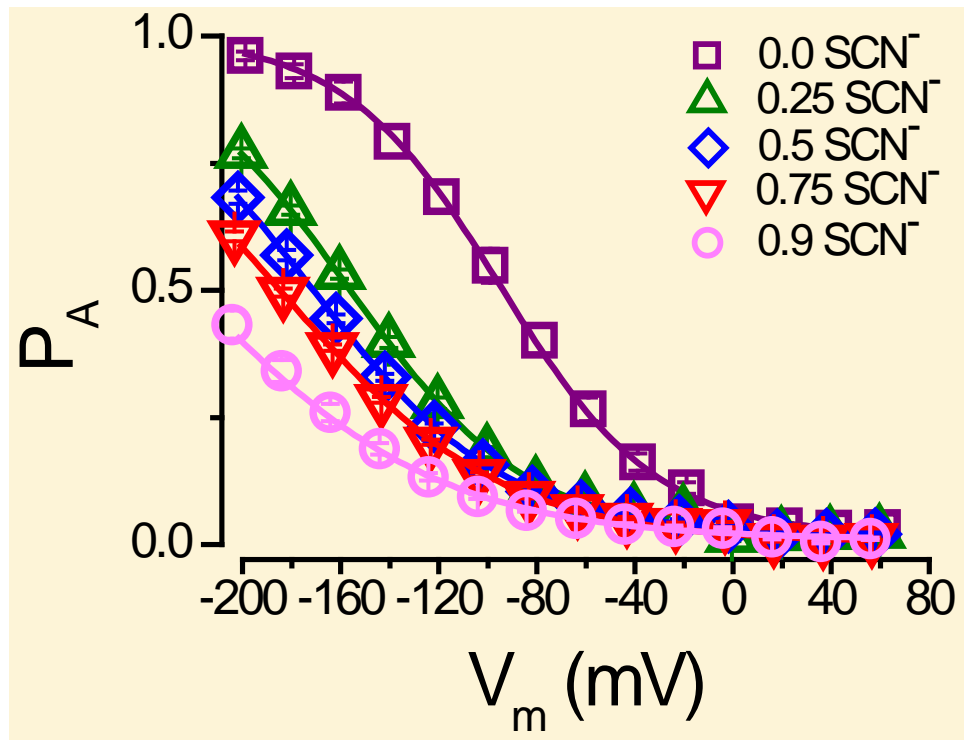
De manera muy similar al caso de los canales silvestres, el  $V_r$  de los canales E213D muestra un comportamiento anómalo ante fracciones molares de  $\text{SCN}^-$  (Fig. 5.9A). Estos



**Fig. 5.9** Dependencia del canal E213D con la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  intracelular. **A:** Potencial de inversión  $V_r$  contra  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$ . El potencial muestra un comportamiento anómalo. **B:** Potencial medio  $V_{0.5}$  contra  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$ . Los datos siguen un comportamiento no anómalo, con una aparente dependencia lineal. Las líneas que conectan los puntos son curvas *B-spline* colocadas como opción por el software Origin 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para unir los datos suavemente y ayudar a notar mejor el comportamiento.  $n = 6-10$ .

datos indican que los canales con una compuerta alterada aún responden de manera anómala a los aniones, y por tanto no se alteró la propiedad de multi-ocupación iónica del poro.

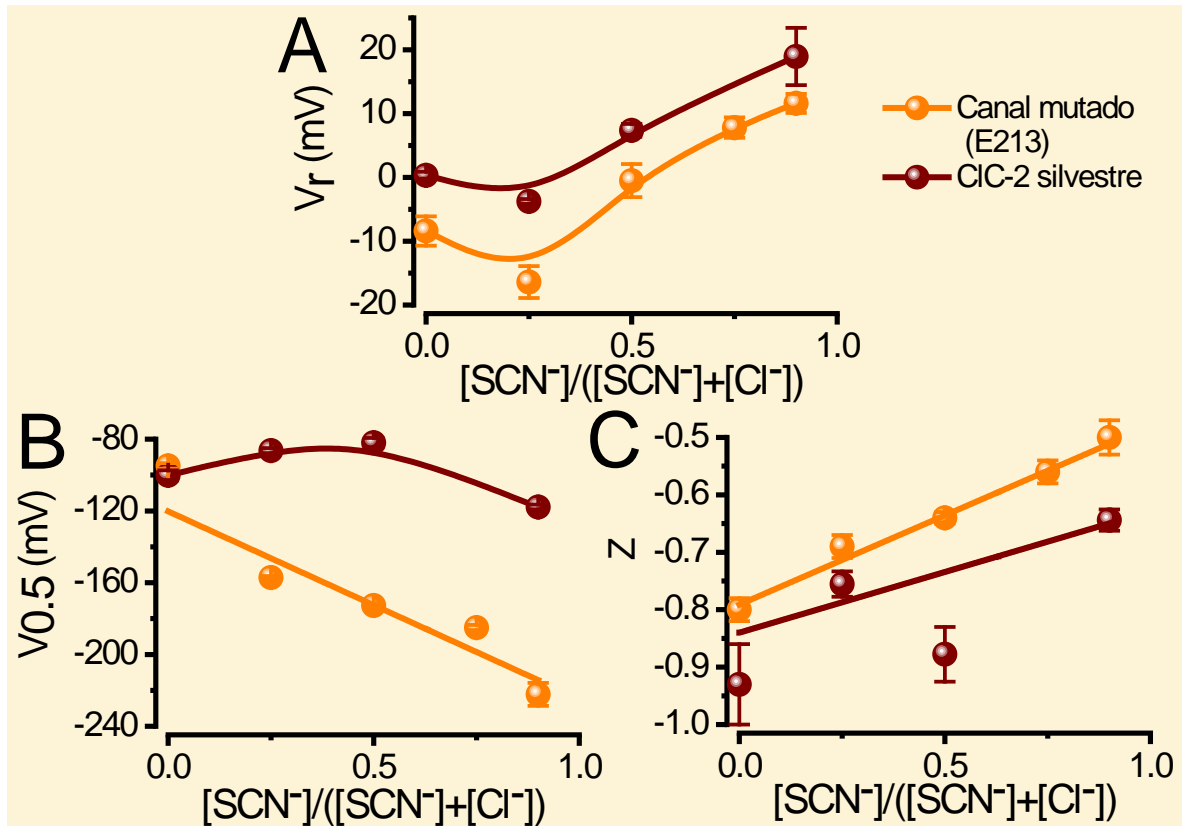
Para estudiar si el efecto anómalo se refleja en la dependencia con  $V_m$  de la apertura del canal, se determinó la dependencia con  $V_m$  de  $P_a$  (Fig. 5.10). En las curvas de  $P_a$  se observa un cambio muy notorio en la dependencia con el potencial  $V_m$  al modificar la proporción de  $\text{SCN}^-$  intracelular: conforme aumentó la fracción molar de iones  $\text{SCN}^-$  presentes dentro de la célula, las curvas  $P_a$  vs.  $V_m$  se fueron corriendo a la izquierda en el eje de  $V_m$ ; esto es, los canales necesitaron potenciales de membrana cada vez más hiperpolarizantes para abrirse. Esto se muestra más claramente en la Fig. 5.9B mediante los datos  $V_{0.5}$  vs. fracción molar de  $\text{SCN}^-$ .



**Fig. 5.10** Probabilidades de apertura aparentes  $P_a$  del canal E213D contra potencial de membrana  $V_m$  a diferentes fracciones molares intracelulares de  $\text{SCN}^-$ . Se realizaron ajustes de Boltzmann (líneas continuas) con los siguientes parámetros de  $V_{0.5}$  (en mV) y  $z$ , respectivamente:  $-94.9 \pm 1.5$ ,  $-0.80 \pm 0.02$  ( $\square$ );  $-157.1 \pm 0.8$ ,  $-0.69 \pm 0.02$  ( $\Delta$ );  $-172.7 \pm 0.8$ ,  $-0.64 \pm 0.01$  ( $\diamond$ );  $-185.0 \pm 1.5$ ,  $-0.56 \pm 0.02$  ( $\nabla$ );  $-222.2 \pm 6.4$ ,  $-0.50 \pm 0.03$  ( $\circ$ ). A la derecha se muestra la simbología de las fracciones molares de  $\text{SCN}^-$  intracelular a las que corresponden las gráficas.  $n = 6-10$ .

Se puede observar en la Fig. 5.11 un resumen comparativo de la dependencia con la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  intracelular de los canales CIC-2 silvestres y E213D. Los potenciales de inversión  $V_r$  son de magnitudes semejantes entre canales silvestres y mutantes, manifestándose un comportamiento anómalo para ambos (Fig. 5.11A). Es evidente que los canales E213D necesitan voltajes de membrana más negativos que los canales silvestres para abrirse, según muestra la Fig. 5.11B mediante los  $V_{0.5}$ 's. El comportamiento anómalo sólo se registra para los canales silvestres. Según la Fig. 5.11C, la

magnitud de la carga aparente  $z$  se reduce conforme aumenta la fracción molar de  $\text{SCN}^-$ , tanto para el canal CIC-2 silvestre como para el mutante.



**Fig. 5.11** Comparación de datos obtenidos para los canales CIC-2 silvestres y mutantes (E213D) ante la variación de la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  intracelular. **A:** Potencial de inversión  $V_r$  contra  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$ . Se observa un comportamiento anómalo para ambos canales. **B:** Potencial medio  $V_{0.5}$  de las curvas de probabilidad de apertura aparente contra fracción molar de  $\text{SCN}^-$  intracelular  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$ . El comportamiento anómalo para la dependencia con el voltaje de la apertura sólo ocurre en los canales silvestres. **C:** Carga aparente de transición global  $z$  de las curvas de probabilidad de apertura aparente contra  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$ . Las líneas que conectan los puntos son curvas *B-spline* colocadas como opción por el software Origin 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para unir los datos suavemente y ayudar a notar mejor el comportamiento.  $n = 5-10$ .

## 6. Discusión

En este trabajo se estudió la dependencia con los iones permeantes que tiene el mecanismo de apertura del canal de cloruro CIC-2. En resumen, las ideas de trabajos anteriores en las que se basó esta investigación y las cuales se buscó comprobar y/o apoyar fueron:

1. El poro del canal se mantiene cerrado por la interacción entre E213 e Y561 mediado por una molécula de agua (De Jesús-Pérez et al., 2020) (ver Fig. 3.1).
2. El mecanismo de apertura requiere que el ion permeante ingrese al poro y allí interaccione y rompa la compuerta E213-H<sub>2</sub>O-Y561 (De Jesús-Pérez et al., 2020).

Esta hipótesis sugiere que al alterar la compuerta, la dependencia con el voltaje conferida por el ion permeante también se alterará y la dependencia con el ion permeante también será alterada. Para probar esta idea, en este trabajo de tesis se llevó a cabo la mutación E213D como ya se mencionó en el Capítulo 3, intercambiando el glutamato 213 por un aspartato.

### 6.1 Efectos en la cinética del canal por la mutación E213D

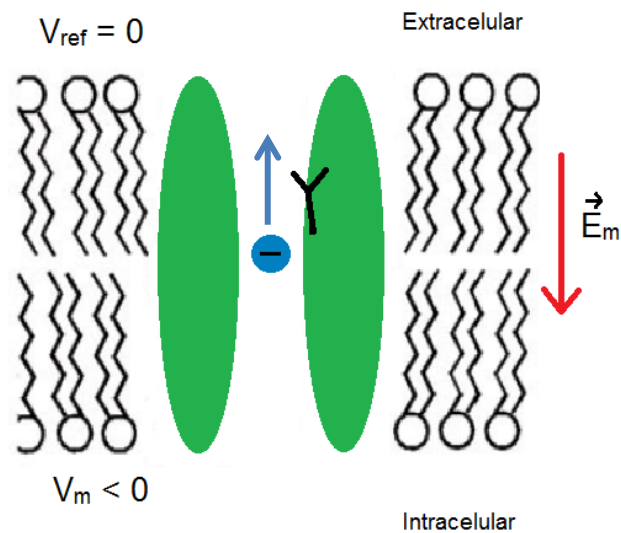
Los datos muestran que la alteración de la compuerta tuvo un gran efecto en algunas cualidades del comportamiento de los canales CIC-2. Una de las características que varían ampliamente entre canales E213D y silvestres es la velocidad a la que se abren y cierran (Fig. 5.3). El canal E213D llega al estado abierto estacionario más rápido que el canal CIC-2 silvestre, e igualmente transita al estado cerrado mucho más rápido, como indican las pequeñas y breves corrientes de cola. Esto se puede entender en términos de la compuerta, pues si ésta consiste de una cadena lateral de aspartato, al tener un grupo -CH<sub>2</sub>- menos que la cadena lateral de glutamato, tiene una masa menor y, por tanto, se podría esperar que presentara mayor aceleración al ser expuesta a las fuerzas que intervienen en la apertura.

### 6.2 Efectos en la dependencia con el voltaje por la mutación E213D

Los datos muestran que los canales E213D son abiertos por voltajes negativos, una característica de los canales silvestres que se conserva. Como se mencionó en la Subsección 2.1.2, esto significa que si se toma como referencia el lado extracelular, el voltaje  $V_m$  que activa los canales, medido en el lado intracelular, es negativo (ver Fig. 6.1). Por tanto, el campo eléctrico  $\vec{E}_m$  presente a lo largo de la bicapa lipídica de la membrana celular apunta desde el lado extracelular hacia el lado intracelular. Además, el signo de las corrientes



macroscópicas fluyendo a través de los canales (Figs. 5.1A y 5.2A) indica un flujo neto de carga negativa desde dentro hacia fuera de la célula (De Santiago et al., 2005). Entonces, tomando también en cuenta que los iones  $\text{SCN}^-$  y  $\text{Cl}^-$  que permearon a través del canal (De Jesús-Pérez et al., 2015) en los experimentos aquí presentados tienen carga negativa, y que el campo  $\vec{E}_m$  para  $V_m < 0$  tendería a mover estas cargas desde el lado intracelular hacia el lado extracelular, se apoya la idea de que la apertura está fuertemente ligada al propio acceso al poro de los iones permeantes  $\text{Cl}^-$ . Se hipotetizó que este comportamiento también ocurriría si se reemplazaba dicha compuerta por un aspartato, dado que la cadena lateral de éste tiene prácticamente las mismas características que la de glutamato salvo su longitud.



**Fig. 6.1** Esquema del poro del canal CIC-2 abierto ante un potencial de membrana  $V_m$  negativo. Se muestra el canal esquematizado en verde, con la compuerta de glutamato (o aspartato, para los canales E213D) en negro, en la conformación *abierta*. Definiendo como cero el potencial de referencia  $V_{ref}$  en la región extracelular, el potencial de membrana  $V_m$  medido en la zona intracelular es negativo. El campo eléctrico  $\vec{E}_m$  dentro de la membrana celular apunta desde fuera hacia adentro de la célula. Los iones permeantes con carga negativa (esferas azules) son impulsados por la fuerza eléctrica y fluyen a través del canal, desde la parte intracelular hacia la parte extracelular.

Los resultados muestran que las dependencias de la apertura de los canales silvestres y mutados con el potencial de membrana, en condiciones control, son aún más parecidas, como indican los parámetros de ajuste de las curvas de  $P_a$  vs.  $V_m$  de la Fig. 5.4. Esto pudo pasar ya sea porque: 1) la compuerta no se alteró de forma tan radical como para afectar en gran medida cómo interacciona el  $\text{Cl}^-$  interno con ella, o 2) porque la interacción estérica entre el  $\text{Cl}^-$  y la compuerta es menos relevante para la apertura que otros factores, como la interacción electrostática. De hecho, para muchas otras de las proteínas CIC se concluye que las fuerzas electrostáticas que aparecen entre los iones transportados y las estructuras de las proteínas son de enorme importancia para el proceso de activación y desactivación (Ziffarelli y Pusch, 2015).

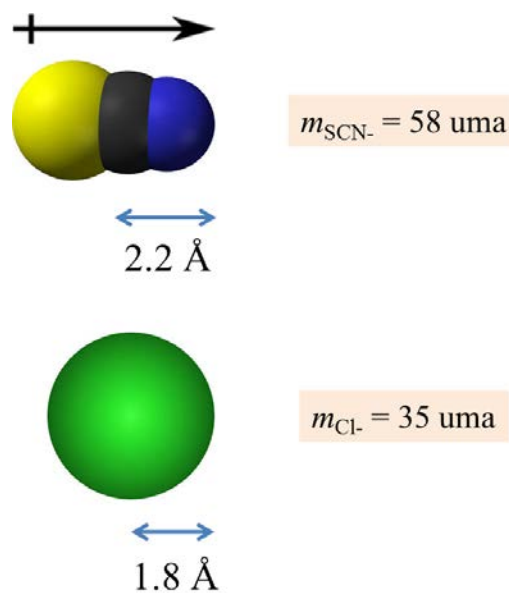
### 6.3 Efectos en la dependencia con los iones permeantes por la mutación E213D

Los datos anteriores demostraron que la cinética del canal CIC-2 está alterada cuando se muta la compuerta. Sin embargo, la dependencia con el voltaje es poco o no alterada cuando la compuerta mutada es expuesta al ion  $\text{Cl}^-$ . Esto se puede explicar con base en lo discutido en la Sección anterior. Sin embargo, la alteración de la interacción del ion permeante con la compuerta mutada fue expuesta de manera muy clara cuando se emplearon mezclas de  $\text{SCN}^-/\text{Cl}^-$  como iones permeantes. En estas condiciones, se exhibió el comportamiento anómalo ante fracción molar en el potencial de inversión  $V_r$  para los canales E213D y CIC-2 silvestres (Fig. 5.11A), y en el potencial medio  $V_{0.5}$  para los canales silvestres (Fig. 5.6A). Por esta característica, se puede suponer que los iones  $\text{SCN}^-$  y  $\text{Cl}^-$  pueden ingresar a los poros de los canales silvestres y a los mutantes, incluso a la vez, justo como ocurre en el CIC-0 y en el CIC-1 (Pusch et al., 1995; Fahlke et al., 1997; Rychkov et al., 1998). El comportamiento anómalo en los canales CIC-2 silvestres ya había sido mostrado por Sánchez-Rodríguez et al. (2010), por lo que el presente trabajo sugiere que un cambio en la compuerta de glutamato por un aspartato no altera tal hecho.

Según la Fig. 5.5A, el efecto del  $\text{SCN}^-$  intracelular en la corriente macroscópica de los canales silvestres se alcanza a notar más para fracciones molares grandes, como 0.9. En dicha figura se aprecia una considerable reducción del tamaño de las corrientes de cola en relación a las corrientes estacionarias obtenidas. Para los canales E213D, a grandes rasgos, la cinética de la corriente macroscópica mantuvo una forma similar para diferentes fracciones molares de  $\text{SCN}^-$  interno, mostrando una apertura y cerrado rápidos (Fig. 5.5A). De modo que, en general, el  $\text{SCN}^-$  presente en el lado citosólico no afecta de manera tan fuerte la evolución en el tiempo de la corriente debida al compuerteo de los canales silvestre y mutante. Esto se podría entender en términos de la carga eléctrica efectiva de los aniones partícipes en la permeación,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SCN}^-$ , ya que ambos tienen una carga de -1. Por ello, podríamos especular que la interacción electrostática entre la carga del anión permeante y la carga neta de la compuerta (-1 para Glu o Asp) es lo que en mayor medida determina la velocidad de la apertura y el cerrado de los canales.

Por otro lado, las Figs. 5.5B y 5.7 demuestran que el efecto del incremento de  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$  para el canal silvestre es menos radical que el que tiene para el canal E213D (Figs. 5.8B y 5.10). La dependencia con el voltaje del CIC-2 silvestre, medida por el voltaje  $V_{0.5}$  necesario para alcanzar el 0.5 de  $P_a$ , tiene una forma cóncava con la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  interno. El valor  $V_{0.5}$  cambia de  $(-100.2 \pm 2.8)$  a  $(-117.8 \pm 1.4)$  mV, alcanzando un valor máximo de  $(-82.0 \pm 2.7)$  mV a una fracción molar de 0.5. En cambio la dependencia con la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  de la dependencia con el  $V_m$  de la apertura del canal mutante es severamente alterada. Los valores de  $V_{0.5}$  se hacen más negativos a medida que la fracción molar de  $\text{SCN}^-$  incrementa. Esto indica que el canal necesita de

potenciales más negativos para activarse. Es decir, la apertura dependiente del voltaje del canal E213D es dificultada por la mayor fracción molar de  $\text{SCN}^-$  en el lado intracelular, como también se observa en las Fig. 5.11B, mientras que la apertura del canal silvestre presenta un comportamiento anómalo ante la fracción molar de  $\text{SCN}^-$ . La relación entre el  $V_{0.5}$  del canal E213D con  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$  es casi lineal y es semejante a aquella que se obtiene cuando el canal CIC-2 silvestre se expone a soluciones intracelulares que sólo contienen  $\text{Cl}^-$  a diferentes concentraciones (Sánchez-Rodríguez et al., 2010). Por tanto, se podría especular que el canal mutado *no interacciona con  $\text{SCN}^-$*  y sólo lo hace con  $\text{Cl}^-$ . Por eso es que esta relación es lineal (a medida que la fracción de  $\text{SCN}^-$  incrementa la concentración de  $\text{Cl}^-$  disminuye). Esto tiene sentido dado que las diferencias entre los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SCN}^-$  en masa, volumen, forma y densidad electrónica (ver Fig. 6.2) hacen que el  $\text{SCN}^-$  probablemente interaccione de diferente forma con una compuerta más corta (aspartato) o más larga (glutamato), tras haber accedido al interior del poro. Sin embargo, más experimentos y/o simulaciones de dinámica molecular ayudarían a clarificar cómo y qué es lo que sucede exactamente en esta situación.



**Fig. 6.2** Esquema de los iones  $\text{SCN}^-$  y  $\text{Cl}^-$ . Los iones  $\text{SCN}^-$  (esfera amarilla: S, esfera negra: C, esfera azul: N) y  $\text{Cl}^-$  (esfera verde), pese a tener la misma carga eléctrica neta, se diferencian por su forma, volumen, masa y distribución electrónica, ya que el  $\text{SCN}^-$  es un ion poliatómico lineal que tiene una densidad electrónica mayor cerca del extremo del átomo de N (Guégan et al., 2014), y el  $\text{Cl}^-$  se puede considerar a grandes rasgos como una *esfera* cuya densidad electrónica es homogénea. Se muestran las longitudes sus radios.

Con todo esto, se confirma que la interacción de los iones permeantes se da directamente con la cadena lateral del Glu-213 dentro del protoporo y que esta interacción es esencial para la apertura y cerrado dependientes de  $V_m$  del canal CIC-2, ya que al modificar tanto el tamaño de esta supuesta compuerta como los iones que pueden entrar al

---

poro, muchas de las propiedades del comportamiento del canal son ampliamente alteradas. El ejemplo más fuerte de ello fue el hecho de que al cambiar el glutamato por un aspartato, la dependencia de la apertura con el voltaje pasó de tener un comportamiento anómalo ante variación de fracciones molares  $[\text{SCN}^-]/([\text{SCN}^-] + [\text{Cl}^-])$  a una dependencia lineal.

---

## **7. Conclusión**

La conclusión de este trabajo es que los iones permeantes entran al poro, interaccionan electrostática y estéricamente con la cadena lateral del Glu-213 del canal CIC-2 y colaboran a su activación de manera primordial, sirviendo esta tesis como un apoyo más a la hipótesis de que son los iones que acceden al poro impulsados por la fuerza electrostática los que abren el canal.

## Bibliografía

Accardi A & Pusch M (2000). Fast and slow gating relaxations in the muscle chloride channel ClC-1. *J Gen Physiol* **116**, 443–444.

Accardi A & Pusch M (2003). Conformational changes in the pore of CLC-0. *J Gen Physiol* **122**, 277–293.

Accardi A & Miller C (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature* **427**, 803–807.

Accardi A, Lobet S, Williams C, Miller C & Dutzler R (2006). Synergism between halide binding and proton transport in a ClC-type exchanger. *J Mol Biol* **362**, 691–699.

Alexander S, Mathie A & Peters J (2011). Ion Channels. *Br J Pharmacol* **164**, S137–S174.

Arreola J, Begenisich T & Melvin JE (2002). Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons. *J Physiol* **541**, 103–112.

Bezanilla F & Armstrong CM (1972). Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons. *J Gen Physiol*. **60**, 588–608.

Bennetts B, Roberts ML, Bretag AH & Rychkov GY (2001). Temperature dependence of human muscle ClC-1 chloride channel. *J Physiol* **535**, 88–93.

Bezanilla F (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* **80**, 555–592.

Bezanilla F (2008). How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 323–332.

Bisset D, Corry B & Chung SH (2005). The fast gating mechanism in ClC-0 channels. *Biophys J* **89**, 179–186.

Bykova EA, Zhang XD, Chen TY & Zheng J (2006). Large movement in the C terminus of ClC-0 chloride channel during slow gating. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1115–1119.

Chen TY & Miller C (1996). Nonequilibrium gating and voltage dependence of the ClC-0 Cl<sup>-</sup> channel. *J Gen Physiol* **108**, 237–250.

Chen MF & Chen TY (2001). Different fast-gate regulation by external  $\text{Cl}^-$  and  $\text{H}^+$  of the muscle-type ClC chloride channels. *J Gen Physiol* **118**, 23–32.

Chen TY, Chen MF & Lin CW (2003). Electrostatic control and chloride regulation of the fast gating of ClC-0 chloride channels. *J Gen Physiol* **122**, 641–651.

Chen TY (2005). Structure and function of ClC channels. *Annu Rev Physiol* **67**, 809–839.

Colquhoun D & Hawkes AG (1995). The principles of the stochastic interpretation of ion channel mechanisms. En *Single channel recording*, 2<sup>a</sup> ed., eds. Sakmann B & Neher E, pp. 397-482. Plenum Press, NY, EE. UU.

Curtis HJ & Cole KS (1940). Membrane action potentials from the squid giant axon. *J Cell Comp Physiol* **15**, 147-157.

Curtis HJ & Cole KS (1942). Membrane resting and action potentials from the squid giant axon. *J Cell Comp Physiol* **19**, 135–144.

De Jesús-Pérez JJ, Castro-Chong A, Shieh RC, Hernández-Carballo CY, De Santiago-Castillo JA & Arreola J (2015). Gating the glutamate gate of CLC-2 chloride channel by pore occupancy. *J Gen Physiol* **147**, 25–37.

De Jesús-Pérez JJ, Méndez-Maldonado GA, González-Hernández IL, De la Rosa V, Gastélum-Garibaldi R, Sánchez-Rodríguez JE & Arreola J (2020). Electro-steric mechanism of ClC-2 chloride channel activation. *bioRxiv* 2020.06.12.148783.

De Santiago JA, Nehrke K & Arreola J (2005). Quantitative analysis of the voltage-dependent gating of mouse parotid ClC-2 chloride channel. *J Gen Physiol* **126**, 591–603.

Diallinas G (2016). Dissection of transporter function: from genetics to structure. *Trends Genet* **32**, 576–590.

Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT & MacKinnon R (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of  $\text{K}^+$  conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77.

Duffield M, Rychkov G, Bretag A & Roberts M (2003). Involvement of helices at the dimer interface in ClC-1 common gating. *J Gen Physiol* **121**, 149–161.

- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT & MacKinnon R (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287–294.
- Dutzler R, Campbell EB & MacKinnon R (2003). Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* **300**, 108–112.
- Dutzler R (2004). The structural basis of ClC chloride channel function. *Trends Neurosci* **27**, 315–320.
- Dutzler R (2007). A structural perspective on ClC channel and transporter function. *FEBS Lett* **581**, 2839–2844.
- Estévez R, Pusch M, Ferrer-Costa C, Orozco M & Jentsch TJ (2004). Functional and structural conservation of CBS domains from ClC chloride channels. *J Physiol* **557**, 363–378.
- Fahlke C, Durr C & George AL Jr (1997). Mechanism of ion permeation in skeletal muscle chloride channels. *J Gen Physiol* **110**, 551–564.
- Feng L, Campbell EB, Hsiung Y & MacKinnon R (2010). Structure of a eukaryotic ClC transporter defines an intermediate state in the transport cycle. *Science* **330**, 635–641.
- Feng L, Campbell EB & MacKinnon R (2012). Molecular mechanism of proton transport in ClC Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchange transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11699–11704.
- Fong P, Rehfeldt A & Jentsch TJ (1998). Determinants of slow gating in ClC-0, the voltage-gated chloride channel of *Torpedo marmorata*. *Am J Physiol* **274**, C966–C973.
- Guégan F, Mignon P, Tognetti V, Joubert L & Morell C (2014). Dual descriptor and molecular electrostatic potential: complementary tools for the study of the coordination chemistry of ambiphilic ligands. *Phys Chem Chem Phys* **16**, 15558–15569.
- Hanke W & Miller C (1983). Single chloride channels from *Torpedo* electroplax: activation by protons. *J Gen Physiol* **82**, 25–42.
- Hernández-Carballo CY, De Santiago-Castillo JA, Rosales-Saavedra T, Pérez-Cornejo P & Arreola J (2010). Control of volume-sensitive chloride channel inactivation by the coupled action of intracellular chloride and extracellular protons. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **460**, 633–644.



Hille B (1971). The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J Gen Physiol*. **58**, 599–619.

Hille B (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer, Sunderland, MA, EE.UU.

Hodgkin AL, Huxley AF & Katz B (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* **116**, 424–448.

Hodgkin AL & Huxley AF (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* **117**, 500–544.

Jentsch TJ, Steinmeyer K & Schwarz G (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**, 510–514.

Jentsch TJ, Pusch M, Rehfeldt A & Steinmeyer K (1993). The ClC family of voltage-gated chloride channels: Structure and function. *Ann N Y Acad Sci* **707**, 285–293

Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A & Yamada H (1999). The ClC chloride channel family. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **437**, 783-795.

Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F & Zdebik AA (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* **82**, 503–68.

Jentsch TJ, Neagoe I & Scheel O (2005). ClC chloride channels and transporters. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 319-325.

Jentsch TJ (2008). ClC chloride channels and transporters: From genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**, 3-36.

Jentsch TJ & Pusch M (2018). ClC chloride channels and transporters: Structure, function, physiology, and disease. *Physiol Rev* **98**, 1493–1590.

Kakazu Y, Akaike N, Komiyama S & Nabekura J (1999). Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci* **19**, 2843–2851.

Kandel ER, Schwartz JH & Jessell TM (2000). *Principles of Neural Science, 4th edition*. McGraw-hill, New York.

Lin YW, Lin CW & Chen TY (1999). Elimination of the slow gating of ClC-0 chloride channel by a point mutation. *J Gen Physiol* **114**, 1–12.

Lísal J & Maduke M (2008). The ClC-0 chloride channel is a “broken” Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 805–810.

Littleton JT & Ganetzky B (2000). Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* **26**, 35–43.

Lobet S & Dutzler R (2006). Ion-binding properties of the ClC chloride channel selectivity filter. *EMBO J* **25**, 24–33.

Ma L, Rychkov GY, Bykova EA, Zheng J & Bretag AH (2011). Movement of hClC-1 C-termini during common gating and limits on their cytoplasmic location. *Biochem J* **436**, 415–428.

Miller C & White MM (1980). A voltage-dependent chloride conductance channel from *Torpedo* electroplax membrane. *Ann N Y Acad Sci* **341**, 534–551.

Miller C (1982). Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **299**, 401–411.

Miller C & White MM (1984). Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2772–2775.

Miller C (2006). ClC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature* **440**, 484–489.

Mindell J & Maduke M (2001). ClC chloride channels. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3003.

Neher E & Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799–802.

Niemeyer MI, Cid LP, Zúñiga L, Catalán M & Sepúlveda F V (2003). A conserved pore-lining glutamate as a voltage- and chloride-dependent gate in the ClC-2 chloride channel. *J Physiol* **553**, 873–879.

Park E, Campbell EB & MacKinnon R (2017). Structure of a ClC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature* **541**, 500–505.

Park E & MacKinnon R (2018). Structure of the ClC-1 chloride channel from *Homo sapiens*. *Elife* **7**.

Picollo A, Malvezzi M, Houtman JCD & Accardi A (2009). Basis of substrate binding and conservation of selectivity in the CIC family of channels and transporters. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1294–1302.

Picollo A, Xu Y, Johner N, Bernèche S & Accardi A (2012). Synergistic substrate binding determines the stoichiometry of transport of a prokaryotic H(+)/Cl(-) exchanger. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 525–531.

Poroca DR, Pelis RM & Chappe VM (2017). CIC channels and transporters: Structure, physiological functions, and implications in human chloride channelopathies. *Front Pharmacol* **8**, 1–25.

Pusch M, Ludewig U, Rehfeldt A & Jentsch TJ (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**, 527–531.

Pusch M, Ludewig U & Jentsch TJ (1997). Temperature dependence of fast and slow gating relaxations of CIC-0 chloride channels. *J Gen Physiol* **109**, 105–116.

Pusch M, Jordt SE, Stein V & Jentsch TJ (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J Physiol* **515**, 341–353.

Richard EA & Miller C (1990). Steady-state coupling of ion-channel conformations to a transmembrane ion gradient. *Science* **247**, 1208–1210.

Robertson JL, Kolmakova-Partensky L & Miller C (2010). Design, function and structure of a monomeric CIC transporter. *Nature* **468**, 844–847.

Rychkov GY, Pusch M, Astill DSJ, Roberts ML, Jentsch TJ & Bretag AH (1996). Concentration and pH dependence of skeletal muscle chloride channel CIC-1. *J Physiol* **497**, 423–435.

Rychkov GY, Pusch M, Roberts ML, Jentsch TJ & Bretag AH (1998). Permeation and block of the skeletal muscle chloride channel, CIC-1, by foreign anions. *J Gen Physiol* **111**, 653–665.

Sánchez-Rodríguez JE, De Santiago-Castillo JA & Arreola J (2010). Permeant anions contribute to voltage dependence of CIC-2 chloride channel by interacting with the protopore gate. *J Physiol* **588**, 2545–2556.

Sánchez-Rodríguez JE (2010). *Regulación del canal de cloruro ClC-2 por iones* (tesis doctoral). Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP.

Sánchez-Rodríguez JE, De Santiago-Castillo JA, Contreras-Vite JA, Nieto-Delgado PG, Castro-Chong A, Arreola J (2012). Sequential interaction of chloride and proton ions with the fast gate steer the voltage-dependent gating in ClC-2 chloride channels. *J Physiol* **590**, 4239–4253.

Scheer BT (2014). Ion transport. *AccessScience*; DOI: 10.1036/1097-8542.352000.

Segev A, Garcia-Oscos F & Kourrich S (2016). Whole-cell patch-clamp recordings in brain slices. *J Vis Exp* **112**, e54024.

Suzuki M, Morita T & Iwamoto T (2006). Diversity of Cl<sup>-</sup> channels. *Cell Mol Life Sci* **63**, 12–24.

Traverso S, Elia L & Pusch M (2003). Gating competence of constitutively open ClC-0 mutants revealed by the interaction with a small organic inhibitor. *J Gen Physiol* **122**, 295–306.

Traverso S, Zifarelli G, Aiello R & Pusch M (2006). Proton sensing of ClC-0 mutant E166D. *J Gen Physiol* **127**, 51–66.

White MM & Miller C (1979). A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J Biol Chem* **254**, 10161–10166.

Zdebik AA, Zifarelli G, Bergsdorf EY, Soliani P, Scheel O, Jentsch TJ & Pusch M (2008). Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CLC proteins. *J Biol Chem* **283**, 4219–4227.

Zifarelli G, Murgia AR, Soliani P & Pusch M (2008). Intracellular proton regulation of ClC-0. *J Gen Physiol* **132**, 185–198.

Zifarelli G, De Stefano S, Zanardi I & Pusch M (2012). On the mechanism of gating charge movement of ClC-5, a human Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Biophys J* **102**, 2060–2069.

Zifarelli G & Pusch M (2015). ClC chloride channels and transporters. En *Handbook of ion channels*, eds. Zheng J & Trudeau MC, pp. 463–476. CRC Press, Boca Raton, FL, EE. UU.

# Apéndice

## La ecuación de Boltzmann

Supóngase que los canales de cloruro expresados en las células *HEK-293* pueden realizar transiciones entre un estado de equilibrio donde el canal está cerrado (*C*) y un estado de equilibrio donde el canal está abierto (*O*). Cada estado del sistema puede estar descrito por un estado global compuesto por todo el conjunto de microestados que lo componen. Si los estados globales *cerrado* y *abierto* del sistema son [*C*] y [*O*], respectivamente, la energía libre de Gibbs *G* para cada estado del sistema será

$$G_C = G_C^0 + RT \ln[C], \quad (\text{A1a})$$

$$G_O = G_O^0 + RT \ln[O], \quad (\text{A1b})$$

donde  $G_C^0$  y  $G_O^0$  son las energías libres molares del estado estándar, *R* es la constante universal de los gases y *T* la temperatura. De las relaciones A1a y A1b se puede ver que el cambio en la energía libre de la transición *C* a *O* está dada por la relación

$$\Delta G = G_O^0 - G_C^0 + RT \ln \frac{[O]}{[C]}. \quad (\text{A2})$$

En el equilibrio,  $\Delta G=0$ , por lo tanto

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[O]}{[C]} = -RT \ln K_{eq}, \quad (\text{A3})$$

donde  $\Delta G^0 = G_O^0 - G_C^0$ , y  $K_{eq}$  es la constante de equilibrio de la transición. La ecuación A3 representa el trabajo realizado sobre el sistema para lograr la configuración de equilibrio, es decir, cuando un 50% de canales se encuentran en el estado *C* y el otro 50% en el estado *O*.

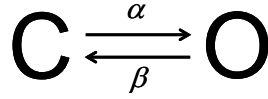
Para canales que dependen del voltaje, la energía libre del sistema tiene componentes dependientes e independientes del potencial

$$\Delta G^0(V_m) = \Delta G_{vi}^0 + \sum_{i=1}^m q_i \delta_i V_m, \quad (\text{A4})$$

el primer término de A4 es independiente del voltaje, mientras que el segundo término representa el trabajo realizado sobre *m* cargas eléctricas  $q_i$  al cambiar su posición dentro del gradiente de voltaje  $\delta_i V_m$  a través del canal en una transición. Utilizando A4, la ecuación A3 puede ser escrita como

$$\frac{[O]}{[C]} = e^{-(\Delta G_{vi}^0 + \sum_{i=1}^m q_i \delta_i V_m)/RT}. \quad (\text{A5})$$

Por otro lado, en un modelo simple de dos estados las transiciones pueden ser descritas por el esquema cinético



Aquí  $\alpha$  y  $\beta$  son las constantes cinéticas asociadas a las transiciones del estado abierto y cerrado respectivamente (Colquhoun y Hawkes, 1995). La constante cinética  $\alpha$  representa la velocidad con la cual los canales pasan desde el estado cerrado al estado abierto. Así que la ecuación asociada con la probabilidad de que el canal se encuentre en el estado abierto [O] será

$$P = \frac{[O]}{[C] + [O]}, \quad (\text{A6})$$

de A5 y A6 se obtiene

$$P(V_m) = \frac{1}{1 + e^{(\Delta G_{vi}^0 + \gamma V_m)/RT}}, \quad (\text{A7})$$

donde  $\gamma = \sum q_i \delta_i$ . Una forma más conveniente para esta expresión se logra sustituyendo  $RT/\gamma = V_s$  y  $\Delta G_{vi}/RT = -V_{0.5}/V_s$ , entonces

$$P(V_m) = \frac{1}{1 + e^{(V_m - V_{0.5})/V_s}}. \quad (\text{A8})$$

Esta última expresión es otra manera de escribir la ecuación de Boltzmann. Nótese que cuando  $V_m = V_{0.5}$ ,  $P = 0.5$ , por lo tanto,  $V_{0.5}$  representa el voltaje para el cual el 50% de canales están abiertos. También se tiene que  $\gamma = zF$ , con  $z$  la valencia de la carga aparente que pasa a través del canal en una transición y  $F$  la constante de Faraday. Es decir,  $zF$  es la carga eléctrica molar transportada a través de los canales iónicos en una sola transición.

La función de Boltzmann (A8) describe la probabilidad de apertura de un sistema de  $N$  canales como función del voltaje. En la ecuación A8 se asume que el sistema puede transitar entre un estado cerrado C a un estado abierto O.

## Glosario

**Alostería:** Regulación de una enzima u otra proteína al unirse una molécula en cierta ubicación (sitio alostérico) de la proteína, afectando las condiciones de unión de otra molécula en otra ubicación (sitio catalítico).

**Canal silvestre:** Se le llama “silvestre” al canal/proteína que no ha sido sometida a cambios o mutaciones en sus componentes.

**Células HEK-293:** Son una línea celular obtenida del riñón de embrión humano, del cual proviene su nombre (*Human Embryonic Kidney*). Estas células no poseen canales de cloruro CIC-2 de manera endógena, pero sí poseen canales de cloruro dependientes del volumen, los cuales son inactivados en estudios electrofisiológicos utilizando una solución externa hipertónica (Hernández-Carballo et al., 2010). Por tal razón, las células HEK-293 representan un buen modelo celular para estudiar los canales CIC.

**Coordinación:** Un enlace de coordinación o coordinado es un enlace covalente en el que un par de electrones compartido por dos átomos es aportado por sólo uno de ellos.

**Distribución binomial:** Es una distribución de probabilidad discreta que cuenta el número de “éxitos” en una secuencia de  $n$  ensayos en los que sólo se puede obtener “éxito” o “fracaso”; los ensayos son independientes entre sí, con una probabilidad fija  $p$  de ocurrencia del éxito por ensayo.

**Electrofisiología:** Estudio de las propiedades eléctricas de células y tejidos biológicos.

**Estérico:** Que tiene relación con la configuración espacial o masa de los átomos, iones o moléculas.

**Expresión:** Manifestación de algún gen o genes en un organismo.

**Extremo C-terminal:** Extremo de una proteína o polipéptido que finaliza con un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) de un aminoácido.

**Extremo N-terminal:** Extremo de una proteína o polipéptido que finaliza con un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) de un aminoácido.

**Filo:** El filo es la subdivisión básica del Reino animal y puede definirse como una agrupación de animales basada en su plan general de organización.

**Hélice  $\alpha$ :** Es una estructura secundaria de una proteína. Tiene una forma helicoidal, la cual se mantiene debido a la presencia de los puentes de hidrógeno que se forman entre átomos de oxígeno del grupo carbonilo de un aminoácido y el átomo de hidrógeno del grupo amino de otro aminoácido situado a cuatro aminoácidos de distancia de la cadena.

**Hiperpolarización y despolarización:** Se conoce como *hiperpolarización* de la membrana celular al hecho de que el potencial de membrana se vuelva más negativo, mientras que la *despolarización* sucede cuando el potencial se hace más positivo. Estos términos se comenzaron a emplear al estudiar el potencial de membrana en reposo de neuronas, el cual es de  $-60$  a  $-70$  mV. Esta diferencia de potencial neta a través de la membrana de la neurona

en reposo implica una polarización de su bicapa lipídica, de modo que si el potencial se hacía todavía más negativo la polarización aumentaba aún más: ocurría una *hiper*-polarización, mientras que si el potencial de membrana se hacía más positivo la diferencia de potencial absoluta a través de la membrana disminuía, y con ello lo hacía también la polarización de la bicapa, sucediendo una *des*-polarización. Por tanto, por convención se asigna el nombre de *potencial hiperpolarizante* a cualquier potencial negativo a través de la membrana celular y *potencial despolarizante* a cualquier potencial positivo.

**Ligando:** Sustancia (usualmente una molécula pequeña) que forma un complejo con una biomolécula, como una proteína.

**Lumen:** Espacio interior de un componente de la célula u organelo, así como de estructuras tubulares del organismo más grandes como arterias o intestinos.

**Membrana lipídica (celular):** Es una delgada membrana polar formada por dos capas de moléculas de lípidos, y que envuelve las células y sus organelos. Tiene un espesor nanométrico y es impermeable a la mayoría de las moléculas solubles en agua (moléculas hidrofílicas), como los iones. Se componen de fosfolípidos anfifílicos, con una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica.

**Morfología:** Rama de la biología encargada del estudio de las características de la estructura de un organismo.

**Organelo:** Estructura contenida en el citoplasma de las células, principalmente las eucariotas, y que desempeña alguna función importante para la célula.

**pH:** Es el logaritmo negativo base 10 de la concentración de protones o iones hidrógeno de una sustancia:

$$pH = -\log_{10}[H^+]$$

Un pH entre 7.2 y 7.4 se le considera fisiológico.

**Proteína:** Es la macromolécula biológica más importante. Químicamente es un polímero de aminoácidos, unidos por enlaces covalentes (enlaces peptídicos) y dispuestos de forma lineal.

**Residuo:** Cada uno de los aminoácidos que forman una proteína o un péptido. Un *residuo conservado* es un residuo que aparece en la misma posición en la secuencia de aminoácidos de proteínas de distintas especies.

**Secuencia primaria de aminoácidos:** Determina el número de aminoácidos y el orden en que están enlazados para formar la estructura primaria de una proteína. Para conocer la secuencia primaria de una proteína se utilizan métodos químicos conocidos como *secuenciación*.

**Sitio de pegado:** También llamado *sitio de unión*, es una región de una proteína, ADN o ARN en la que alguna molécula o ion específico puede formar un enlace químico.

**Sustrato:** Cada uno de los iones que puede ser movido a través de la membrana celular por los transportadores iónicos.



---

**Transfección:** Es un procedimiento para introducir a una célula información genética (ADN o ARN). Esta información genética es procesada por la maquinaria celular para sintetizar proteínas.

**Vector:** Es un elemento extracromosomal al que se le fusiona el ADN de interés para una transfección. Para generar la proteína CIC-2, se utilizó el vector pIRES2EGFP-mCIC2, el cual contiene los ADN que producen la proteína CIC-2 y una proteína verde fluorescente (EGFP) que sirve como indicador del éxito de la transfección.