BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

“Estudio biofísico del proceso de inactivación del canal de sodio de músculo esquelético de rata $Na_v1.4$”

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta:

M. en C. Alfredo Sánchez Solano

Directores de Tesis

D.C Eduardo M. Salinas Stefanón
Instituto de Fisiología

D.C. Lourdes Millán Pérez Peña
Centro de Química, ICUAP

Puebla, Puebla, Junio 2016

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

Laboratorio de Biofísica Cardiaca

"Estudio biofísico del proceso de inactivación del canal de sodio de músculo esquelético de rata $Na_v1.4$"

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta:

M. en C. Alfredo Sánchez Solano

Directores de Tesis

D.C Eduardo M. Salinas Stefanón
Instituto de Fisiología

D.C. Lourdes Millán Pérez Peña
Centro de Química, ICUAP

Comisión revisora:
D.C José Everardo Avelino Cruz
D.C. David Erasmo García Díaz
D.C. Eduardo Monjaraz Guzmán

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOFÍSICA CARDIACA, DEL INSTITUTO DE FISIOLOGÍA Y EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CENTRO DE QUÍMICA–ICUAP, DE LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.

EL FINANCIAMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO FUE APORTADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) A TRAVÉS DE LA BECA CON NÚMERO: 329859. No. DE REGISTRO: 226507.

INDICE

I. Índice de figuras y tablas VIII

II. Resumen 1

1. Introducción 2

2. Generalidades

2.1. Canales iónicos dependientes de voltaje 3

2.2. Origen y evolución 3

2.3. Descubrimiento y purificación de los canales de sodio 6

2.4. Estructura primaria de los canales de sodio 7

2.4.1. Subunidades β del canal de sodio dependiente de voltaje 9

2.4.2. Modulación de la corriente de sodio por la subunidad β1 10

2.5. Permeabilidad en el anillo DEKA 12

2.6. Activación del canal de sodio 14

2.6.1. Modelado estructural y dinámica molecular 15

2.6.2. Sensor de voltaje: Modelo de hélice 17

2.7. Inactivación del canal de sodio 18

2.7.1. Inactivación rápida 18

2.7.2. Inactivación lenta 20

2.8. Avances estructurales en canales de sodio dependientes de voltaje de origen bacterial 23

3. Planteamiento del problema 27

4. Hipótesis 28

5. Objetivo general 28

5.1 Objetivos particulares 28

6. Materiales y métodos

6.1 Mutagénesis dirigida

6.1.1. Diseño de los oligonucleótidos con las respectivas mutaciones 30

6.1.2. Procedimiento de mutagénesis 30

6.2 Extracción de ADN plasmídico por ebullición (mini–prep) 33

6.3 Propagación de los plásmidos mutados 34

6.4 Extracción del ADN plasmídico 34

6.5 Verificación de las mutaciones

6.5.1. Diseño de oligonucleótidos para la secuenciación 35

6.6 Determinación de la funcionalidad de los canales mutados

6.6.1. Técnica de expresión de canales iónicos en ovocitos de rana *Xenopus laevis* 36

6.6.2. Registro electrofisiológico 37

6.7 Funcionalidad de los canales mutados mediante la micro–inyección y expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* 37

6.8 Protocolos experimentales y análisis de datos 39

6.8.1. Protocolos de estimulación 42

7. Resultados 43

7.1 Mutaciones obtenidas 44

7.2 El canal de sodio $rNa_v1.4$ sin la subunidad β1

7.2.1. Efecto de las mutantes sobre la activación 48

7.2.2. Efecto de las mutantes sobre la inactivación rápida y lenta 52

7.3 El canal de sodio $rNa_v1.4$ con la subunidad β1

7.3.1. Efecto de las mutantes con β1 sobre la activación 58

7.3.2. Efecto de las mutantes con β1 sobre la inactivación 61

7.4 Deleción del péptido IFM 67

8 Discusión

8.1 Efecto de las mutaciones de dominio III sobre la activación del canal $rNa_v1.4$ 70

8.2 Efecto de las mutaciones de dominio III sobre la inactivación lenta del canal $rNa_v1.4$ 76

9. Conclusiones 78

10. Bibliografía 79

I. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		Pagina
Figura 1	Modelo esquemático de la secuencia completa y desplegado de un modelo 3D del poro interno con su filtro de selectividad (anillo DEKA) del canal de sodio en estado abierto.	8
Figura 2	Alineamiento múltiple de un fragmento de las asas–P de cada dominio, se muestra la conservación del anillo DEKA, anillo triptófanos y el anillo externo EEDD, en todas las isoformas de canales de sodio.	9
Figura 3	Visualización esquemática de la cadena principal con sus dominios de la subunidad β.	10
Figura 4	Expresión funcional de la subunidad β1 humana con la subunidad α del canal de sodio provenientes de músculo esquelético y corazón humano.	11
Figura 5	Posibles interacciones electrostáticas entre los residuos DEKA.	13
Figura 6	Estructura del canal Na_V	14
Figura 7	Mutaciones estratégicas para estudiar el efecto de la carga en el segmento S4.	15
Figura 8	Modelo de activación del canal iónico y apertura del poro.	17
Figura 9	Modelo de la “Bola y la Cadena”.	18
Figura 10	Mecanismo de inactivación de los canales de sodio.	20
Figura 11	La glicina conservada en el segmento S6 transmembrana.	25
Figura 12	Registros control en ovocitos que no recibieron inyección de ADNc para expresar canales de sodio nativo o mutado.	38
Figura 13	Registros control representativos en ovocitos que fueron inyectados para expresar canales $rNa_v1.4$.	39
Figura 14	Alineamiento comparativo de las secuencias bacteriales.	43
Figura 15	Modelo tridimensional del canal de sodio $rNa_v1.4$	44
Figura 16	Efecto de las mutaciones en el dominio DIII sobre las corrientes de Na^+.	48
Figura 17	Relación Corriente–Voltaje del canal $rNa_v1.4$ y sus mutantes.	50
Figura 18	Relación Conductancia–Voltaje del canal rNav1.4 y sus mutantes.	51
Figura 19	Constante de tiempo de inactivación.	52
Figura 20	Protocolo de inactivación de estado–estable.	53
Figura 21	Inactivación de estado–estable del canal rNav1.4 y sus mutantes.	54
Figura 22	Curso temporal de la recuperación de la inactivación del canal.	55
Figura 23	Dependencia de uso y frecuencia del canal rNav1.4 y sus mutantes.	57
Figura 24	Efecto de las mutaciones en el dominio DIII sobre las corrientes de Na+β1.	58
Figura 25	Relación Corriente–Voltaje del canal rNav1.4 y sus mutantes con β1.	60

Figura 26 Relación Conductancia–Voltaje del canal rNav1.4 y sus mutantes con β1. 60
Figura 27 Constantes de tiempo de inactivación con β1. 62
Figura 28 Inactivación de estado–estable del canal rNav1.4 y sus mutantes con β1. 63
Figura 29 Curso temporal de la recuperación de la inactivación del canal rNav1.4 y sus mutantes con β1. 65
Figura 30 Dependencia de uso y frecuencia del canal rNav1.4 y sus mutantes con β1. 66
Figura 31 Relación Corriente–Voltaje del canal rNav1.4 y el canal sin péptido IFM 67
Figura 32 Modelo *in sillico* del alineamiento del péptido IFM y su deleción virtual 68
Figura 33 Trazos crudos representativos del canal nativo rNav1.4 y el canal sin péptido IFM 69
Figura 34 Modelo *in sillico* del canal nativo rNav1.4 y la mutante G1148P 70
Figura 35 Modelo *in sillico* del canal nativo rNav1.4 y la mutante K1237A 72
Figura 36 Modelo *in sillico* del canal nativo rNav1.4 y la mutante G1275P 74
Figura 37 Modelo *in sillico* del canal nativo rNav1.4 y la mutante N1281A 75

Tabla 1 Condiciones de la mezcla de mutagénesis. 31
Tabla 2 Condiciones del termociclador 31
Tabla 3 Oligonucleótidos para mutación 45
Tabla 4 Oligonucleótidos para secuenciación 45
Tabla 5 Voltajes medios de activación en canal nativo y mutantes 51
Tabla 6 Constante de tiempo de inactivación en canal $rNa_v1.4$ y mutantes. 53
Tabla 7 Voltajes medios de inactivación de estado–estable en canal nativo y mutantes. 54
Tabla 8 Tiempos de recuperación de la inactivación obtenidos con un ajuste doble – exponencial. 56
Tabla 9 Voltajes medios de activación en canal nativo y mutantes con β1. 61
Tabla 10 Constantes de tiempo de inactivación en canal $rNa_v1.4$ y mutantes con β1. 63
Tabla 11 Voltajes medios de inactivación de estado–estable en canal nativo y mutantes con β1. 64
Tabla 12 Tiempos de recuperación de la inactivación con β1 obtenidos con un ajuste doble – exponencial. 66

II. RESUMEN

Los canales de sodio dependientes de voltaje son complejos proteicos heteroméricos, que inician el potencial de acción en células excitables. La apertura de los canales de Na^+ es breve, ya que éstos se inactivan en el orden de milisegundos. Los canales presentan dos formas de inactivación, una rápida y una lenta. El mecanismo de inactivación lenta está localizado en estructuras diferentes que la inactivación rápida. Ya que tiene similitudes con la inactivación tipo C de los canales de potasio que está conectado con el poro externo, aminoácidos correspondientes en el canal de sodio han sido blanco de mutagénesis de sitio. Se considera que los canales de sodio bacteriales tienen un proceso de inactivación semejante a la inactivación lenta. Mutaciones cerca del filtro de selectividad, en el S6 y en el dominio de sensor de voltaje en canales de sodio bacterianos, tienen efectos dramáticos, similares a la inactivación lenta en canales de sodio de mamífero. Sin embargo, a pesar de esta extensiva investigación, el mecanismo molecular de la inactivación lenta es desconocido y no hay mutación puntual que excluya sustancialmente la inactivación lenta, aunque, éstas han definido determinantes moleculares esenciales. A partir de métodos bioinformáticos, mutagénesis de sitio y registros electrofisiológicos, se han identificado aminoácidos, que desempeñan un papel crítico en el proceso de inactivación lenta. En este trabajo se propone caracterizar mediante mutagénesis de sitio la contribución de las estructuras: asa – P, asa intracelular S4 – S5 y segmento S6 del dominio DIII, sobre la inactivación lenta del canal de sodio de músculo esquelético de rata $Na_v1.4$. Nosotros deducimos que las regiones de bisagra juegan un papel importante en el acoplamiento conformacional entre el dominio sensor de voltaje y el poro en canales iónicos dependientes de voltaje. Nuestros resultados determinan que, glicina 1148 en la asa intracelular S4–S5, lisina 1237 en la asa–P, glicina 1275 y asparagina 1281 en el segmento S6, situados en el dominio DIII están implicados en la inactivación lenta en el canal de sodio $rNa_v1.4$, consistente con una inactivación tipo C observada en canales de potasio, y la participación de estas estructuras en la inactivación lenta es independiente de la inactivación rápida.

1. INTRODUCCIÓN

Para toda célula que conforma un tejido, es vital mantener una concentración diversa de substancias en su interior y en el exterior. Esto origina una desigualdad de cargas eléctricas en la célula, permitiendo a ésta un desequilibrio dinámico que oscila alrededor de un estado estable (potencial de reposo) el cual, mediante un mecanismo molecular, es capaz de reaccionar apropiadamente a una serie de variaciones para regresar a tal estado estable. Las variaciones a este potencial eléctrico por medio del intercambio de partículas inorgánicas con carga constituyen un comportamiento dinámico y regenerativo (conocido como potencial de acción). De esta forma la célula puede detectar las señales del ambiente, recibe y transmite información codificada.

Las responsable de originar y mantener este fenómeno, son un número de proteínas presentes en la membrana celular que forman vías conductoras de iones llamadas canales iónicos (Hille 2001). Estos canales, son poros acuosos constituidos básicamente por los siguientes componentes funcionales: un filtro de selectividad, un sensor de voltaje, un vestíbulo externo, un vestíbulo interno y, en algunos casos, una compuerta de inactivación. Dependiendo del tipo de mecanismo de compuerta, los canales se pueden distinguir en: a) canales activados por voltaje, b) activados por ligando y c) activados por tensión o volumen. Existen también canales que no requieren de alguno de estos mecanismos de compuerta y son llamados canales de fondo (*background*), estos están activados constinuamente y abren y cierran continuamente sin aparente modulación (Hille 2001).

Hodgkin y Huxley en 1952, desarrollaron el primer modelo para explicar la excitabilidad basada en dos propiedades elementales: la permeabilidad iónica (flujo de iones a través de los canales de la membrana plasmática) y el mecanismo de compuerta (cambios conformacionales dinámicos en respuesta a fluctuaciones iónicas de la membrana). El desarrollo de la técnica de registro de corrientes a través de la membrana de células excitables por fijación de voltaje en 1940 desarrollada por Cole, permitió a Hodgkin y Huxley sentar las bases iónicas del potencial de acción, por lo que se hicieron acreedores al premio nobel de fisiología en 1963. En la actualidad, esta técnica permite profundizar en el estudio de las propiedades de estos canales: conducción, dependencia de voltaje, rectificación, selectividad iónica, activación, inactivación y la farmacología de los compuestos químicos que se sabe, tienen efectos directos sobre el canal, modificando sus características electrofisiológicas (Balser 1999, Catterall 2000, Hille 2001).

2. GENERALIDADES

2.1 Canales iónicos dependientes de voltaje.

Los canales iónicos son estructuras proteicas incluidas en las membranas celulares que forman poros macromoleculares que permiten el flujo pasivo de los iones (Na^+, K^+, Cl^- y Ca^{+2}) a favor de su gradiente de concentración química, pero al ser partículas cargadas eléctricamente, también se mueven a favor de su gradiente eléctrico, de esta manera los iones pueden ingresar o salir de las células debido a que son impulsados por su gradiente electroquímico. Este movimiento de iones a través de los canales genera corrientes eléctricas que producen cambios en el voltaje transmembrana o potencial de membrana (E_m) entre el interior y exterior celular. Los canales iónicos dependientes de voltaje, son aquellos que responden a cambios en el E_m, este cambio genera la apertura o cierre del poro (Hille 2001).

2.2 Origen y evolución

Las bacterias, al igual que las eucariotas, presentan en su interior celular una alta concentración de potasio y baja de calcio, sin embargo, algunas no requieren ni de cloro ni de sodio, pues la mayoría de las bacterias carecen de canales para estos iones, mientras que claramente presentan canales de potasio. De esta forma se considera que la aparición de los canales de potasio y calcio, ocurre antes que los de sodio, ya que los organismos unicelulares presentan éstos dos tipos de canales. Es posible que los canales de calcio hayan evolucionado de los canales de potasio primordiales por duplicación del gen ancestral de un solo dominio y los canales de sodio hayan evolucionado de manera análoga, o a su vez, de mutaciones del canal de calcio, ya que los cuatro dominios que forman el canal de sodio guardan más similitud con los correspondientes cuatro dominios del canal de calcio que entre sí mismos (Marban, Yamagishi et al. 1998, Goldin 2002).

La levadura es el organismo más simple que presenta canales de calcio de cuatro dominios (Yu, Yarov-Yarovoy et al. 2005). Se cree que el uso de sodio en lugar del calcio, hizo posible la conducción rápida y señalización de altas frecuencias eléctricas en los primeros organismos multicelulares (Chopra, Watanabe et al. 2007).

Los potenciales de acción dependientes de sodio, son comunes en medusas, estos organismos poseen dos formas de simetría radial (medusa nadadora y pólipos sensibles) dotados con una red de nervios descentralizados y receptores simples, su cuerpo consiste en

dos epitelios separados por mesoglea (sustancia gelatinosa inerte), (Seipel and Schmid 2005). Existe evidencia molecular que sostiene la hipótesis de que las células nerviosas y musculares coevolucionaron de un precursor mioepitelial. El surgimiento de locomoción rápida precisa del desarrollo de una relación estrecha entre el sistema de músculos y sistema nervioso (Goldin 2002, Seipel and Schmid 2005).

Por mucho tiempo se pensó que los canales de sodio eran exclusivos de organismos eucariotas, sin embrago, se ha descubierto un canal de sodio procarionte en la bacteria de agua salada *Bacillus halodurans*, denominado NaChBac. Éste es dependiente de voltaje, posee un solo dominio que se ensambla como un homotetrámero y es selectivo a iones de sodio. Sin embargo, como es de suponer, tanto su selectividad (anillo EEEE similar al canal de calcio), dependencia de voltaje (posee un asa S3–S4 corto) y su proceso de inactivación (mucho más lenta, tipo C) parece ser fundamentalmente distinta a la de canales heterotetrámeros eucariotas (Catterall 2001).

Debido al hecho de que los mamíferos y los peces poseen diferente número de isoformas del canal de sodio y de acuerdo a análisis filogenéticos entre especies, se cree que la duplicación de genes de canales de sodio ancestrales ocurrió por separado en teleóstos y tetrápodos, en los primeros, debido a una duplicación del genoma completo (Seipel and Schmid 2005, Chopra, Watanabe et al. 2007).

Por lo tanto, los modelos evolutivos dominantes, proponen que las 10 isoformas de canal de sodio de mamíferos, fueron originadas a partir de una duplicación por tándem de al menos 2 de los 4 genes ancestrales (presentes en peces), que a su vez provienen de poliploidización (duplicación que origina más de dos conjuntos pareados de cromosomas homólogos en un organismo) de uno o dos genes precursores Nav1 en cordados (Chopra, Watanabe et al. 2007).

Bajo este contexto evolutivo, es importante mencionar que casi todo gen de canal iónico se expresa en cerebro, aunque éste pertenezca a otro tipo celular, por lo que la expansión y divergencia de los canales iónicos sensibles a voltaje, debió ser central al incrementarse la complejidad del sistema nervioso central de los vertebrados (Seipel and Schmid 2005).

Los invertebrados, a diferencia de los vertebrados, poseen un número menor de genes que codifican para canal de sodio, por ejemplo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, solo posee un gen de canal de sodio (SCNA_DROME). Sin embargo, estudios recientes evidencian que insectos como éste y la cucaracha alemana *Blattella germanica*, son capaces

de producir una diversidad funcional de canales de sodio (hasta 60 variaciones), por medio de *splicing* alternativo y edición de ARN, al procesar el transcripto de un solo gen de canal de sodio (Du, Nomura et al. 2009).

Los canales de sodio dependientes de voltaje de invertebrado que se ha podido expresar *in vitro*, son los de insectos; y su expresión funcional robusta requiere de una subunidad accesoria llamada TipE, una proteína transmembrana accesoria (con dos supuestos segmentos transmembrana) (Du, Nomura et al. 2009). Al comparar los registros de corrientes en neuronas de Drosophila, se observa una tasa más lenta de recuperación, dependiente de repolarización, en las corrientes de sodio durante activaciones repetidas de neuronas mutantes ($TipE^{-}$) con respecto al fenotipo nativo.

A pesar de la similitud funcional de TipE en la mosca de la fruta (Vsscβ en la mosca doméstica), con la subunidad accesoria de vertebrados β1, existe una baja similitud estructural a nivel de secuencia primaria de aminoácidos entre estas proteinas (Feng, Deak et al. 1995). La secuencia de TipE posee un 11% de identidad y un 22% de similitud con respecto a β1 de rata.

De este modo, las subunidades β no se encuentran en los genomas de invertebrados, mientras que en peces teleostos, anfibios, aves y mamiferos, todas las secuencias de subunidades β son ortólogos, es decir, tienen un ancesto común y pertenecen al mismo clado (ramificación de un árbol filogenético) (Chopra, Watanabe et al. 2007). Los análisis filogenéticos sugieren la existencia de dos genes precursores para la variedad de subunidades β1/ β3 y β2/ β4 en los primeros vertebrados, sin embargo, es probable que el ancestro común de teleóstos y tetrápodos hace más de 400 millones de años haya poseido 4 distintos genes ancestrales de la subunidad β (Chopra, Watanabe et al. 2007).

La similitud de las secuencias en vertebrados a una familia de proteínas inmunoglobulínicas más antigua, sugiere que los genes de las subunidades β pudieron haber surgido *de novo* a partir de genes que codifican para moléculas de adhesión celular, receptores de membrana o componentes innatos del sistema inmune. Por lo tanto, se cree que esta familia de genes surgió en las primeras etapas de la evolución de los vertebrados, antes de la divergencia de teleóstos y tetrápodos y probablemente desempeñaron un papel en la diversificación y especialización de la señalización eléctrica de los primeros vertebrados, por lo que la formación del complejo macromolecular α–β constituye una innovación altamente conservada y funcionalmente importante de los vertebrados (Chopra, Watanabe et al. 2007).

2.3 Descubrimiento y purificación de los canales de sodio

Hodgkin y Huxley (Hodgkin and Huxley 1952), usaron técnicas de fijación de voltaje para demostrar tres principales características que han llegado a ser propiedades del canal de sodio: a) activación sensible al voltaje, b) inactivación rápida y c) conductancia selectiva del ión. El análisis detallado de la función del canal de sodio durante los 1960´s y 1970´s, usando el método de fijación de voltaje, aplicado al axón gigante de calamar y fibras nerviosas de vertebrado, dieron modelos mecánicos para la función del canal de sodio (Armstrong 1981, Hille 1992, Hille 2001).

Estos estudios predijeron que los canales de sodio eran proteínas de membrana difícil de identificar y de aislar como otras muchas proteínas de membranas excitables.

Durante los 70´s del siglo pasado, una nueva línea de investigación emergió proveyendo un nuevo desarrollo de métodos de análisis molecular de canales de sodio. Así, diferentes métodos bioquímicos para medir el flujo iónico a través de canales de sodio, alta afinidad de unión de neurotoxinas, la solubilización con detergentes y la purificación de proteínas de canales de sodio marcados por neurotoxinas fueron progresivamente desarrollados (Ritchie and Rogart 1977, Catterall 1980). Estos enfoques bioquímicos, llevaron al descubrimiento del canal de sodio en 1980. La afinidad dada por un fotorreactivo derivado de la toxina α de escorpión, permitió identificar la principal subunidad α (260 kDa) y la subunidad auxiliar β1 (36 kDa) del canal de sodio cerebral (Beneski and Catterall 1980). Posteriormente, la purificación parcial de TTX, unida a proteínas del pez eléctrico, revelaron una correlación entre la actividad de unión de TTX y una proteína de ~ 270 kDa (Agnew, Moore et al. 1980).

Subsecuentes estudios de purificación mostraron que el canal de sodio del cerebro de mamífero, es un complejo formado por subunidades α (260 kDa), β1 (36 kDa) y β2 (33 kDa) (Hartshorne and Catterall 1981, Hartshorne, Messner et al. 1982); el canal de sodio purificado del pez eléctrico, es una proteína de 270 kDa (Miller, Agnew et al. 1983); y el canal de sodio de músculo esquelético es un complejo de subunidades α y β1 (Barchi 1983). La reconstitución de la neurotoxina saxitoxina, cuando activó el flujo iónico a través de los canales de sodio purificados de cerebro y músculo esquelético, reveló un poro funcional (Talvenheimo, Tamkun et al. 1982, Kraner, Tanaka et al. 1985) y la fusión dentro de una bicapa de membrana, mostró una activación sensible al voltaje (Hartshorne, Keller et al. 1985, Furman, Tanaka et al. 1986). Todos estos estudios mostraron que el canal de sodio contiene los elementos esenciales para

la conducción iónica y apertura dependiente de voltaje, esto abrió camino para el análisis molecular detallado en canales iónicos.

2.4 Estructura primaria de los canales de sodio

Noda et al., (1984) mediante la clonación y análisis de secuencias del ADNc que codifica para el polipéptido del pez eléctrico. Permitió conocer la estructura primaria de un canal iónico sensible al voltaje. La secuencia aminoacídica reveló una gran proteína con cuatro dominios homólogos, cada uno con 6 segmentos transmembrana α–hélices. El motivo estructural del canal de sodio con dominios homólogos, es el bloque estructural de canales de calcio y potasio dependientes de voltaje y una gran familia de canales iónicos, incluyendo los canales dependientes de nucleótidos cíclicos, canales de calcio activados por potasio y canales de calcio tipo trp. La información contenida en esta estructura primaria revolucionó la investigación de los canales iónicos dependientes de voltaje (Noda, Shimizu et al. 1984).

Se han determinado las regiones de la proteína que hacen contacto con los iones, utilizando técnicas de mutación puntual y estudiando los efectos producidos por el bloqueo con toxinas como: tetrodotoxina (TTX) y saxitoxina (STX) (Schlief, Schonherr et al. 1996).

Los diferentes canales de sodio en mamífero, tienen en general características funcionales similares, y pequeñas diferencias en sus propiedades electrofisiológicas y moleculares, que distinguen la variedad de isoformas que contribuyen a sus funciones específicas en la fisiología y farmacología (Yu and Catterall 2003). Diferentes tipos de tejido expresan variados canales de sodio. $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ y $Na_v1.6$ son expresados principalmente dentro del sistema nervioso central; $Na_v1.4$ es encontrado predominantemente en músculo esquelético; $Na_v1.5$ primordialmente en músculo cardiaco y $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$ son encontrados en el sistema nervioso periférico. (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005).

En la figura 1, se observa la estructura de un canal de sodio dependiente de voltaje, mismo que está formado por un único polipéptido que consta de cuatro dominios (DI–DIV), cada uno con seis segmentos transmembrana (S1–S6). El cuarto segmento transmembrana de cada dominio, contiene cargas positivas provenientes de la arginina (R) que están involucradas en la detección de variaciones en el voltaje, la región del asa del poro entre S5 y S6 forma el dominio del poro por el cual los iones sodio fluyen.

Las subunidades β´s (β1/3 y β2/4) son proteínas transmembrana que tienen un dominio de inmunoglobulina extracelular que se co-ensambla con la subunidad α del Na_v (Lai and Jan 2006).

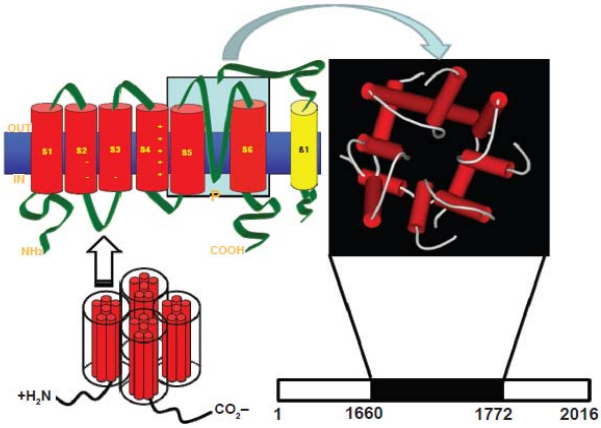


Figura 1: Modelo esquemático de la secuencia completa y desplegado de un modelo 3D del poro interno con su filtro de selectividad (anillo DEKA) del canal de sodio en estado abierto.

Existe evidencia experimental que los segmentos transmembranales S4, sirven como sensores de voltaje para abrir o cerrar el canal y que las asas P que unen los segmentos S5 y S6 forman la región más estrecha, así como los segmentos S5 y S6 forman las paredes del poro conductor (figura 1; vista superior y lateral). Cada asa P, contiene un aminoácido que se conserva en toda la familia de canales de sodio, estos son: aspartato, glutamato, lisina y alanina (vista superior en la figura 1); a esta zona se le conoce como anillo DEKA (Catterall 2001).

Balser y cols., mostraron la presencia de un anillo hidrófobo conformado por triptófanos. Sus estudios revelaron que W402C acelera la inactivación lenta del canal de sodio y muestra las primeras evidencias de la interacción entre las estructuras del poro y el proceso de inactivación lenta (Balser, Nuss et al. 1996). Por otro lado, Salinas–Stefanón y cols., observaron que la mutación W756C generó una inactivación más lenta que la observada en el canal nativo (Salinas-Stefanon, Martinez-Morales et al. 2011).

Otro anillo conservado en todos los canales de sodio dependientes de voltaje en mamíferos es el anillo EEDD, el cual es externo al anillo DEKA y WWWW, y contiene aminoácidos cargados negativamente, estos son: glutamato–glutamato–aspartato–aspartato. Se ha observado por mutación sitio–dirigida que cambios en los aminoácidos de este anillo podría acoplarse a una compuerta de inactivación lenta, esto se determinó introduciendo pares

de cisteínas, también se determinó que el anillo EEDD sirve para concentrar cationes en la entrada del canal (Xiong, Li et al. 2003).

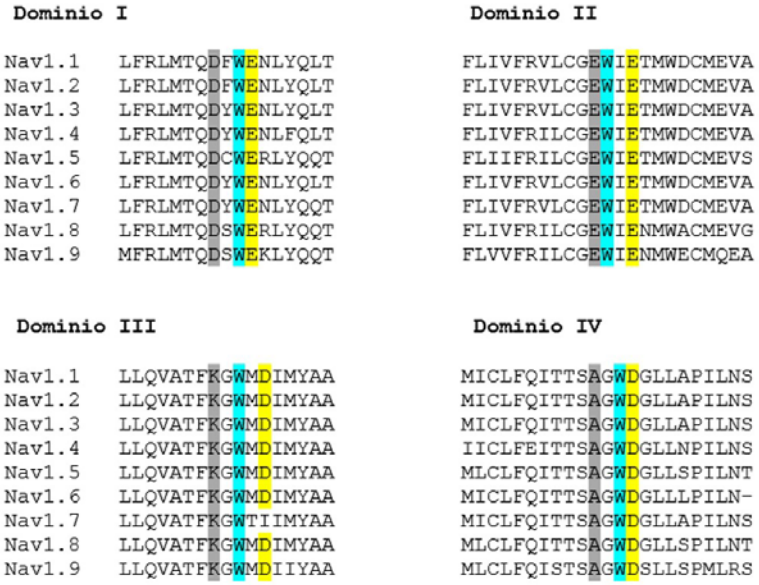


Figura 2: Alineamiento múltiple de un fragmento de las asas–P de cada dominio, se muestra la conservación del anillo DEKA (gris), anillo triptófanos (azul) y el anillo externo EEDD (amarillo), en todas las isoformas de canales de sodio.

2.4.1 Subunidades β del canal de sodio dependiente de voltaje

La purificación y caracterización de las subunidades α de los canales de sodio facilitó la caracterización de las subunidades auxiliares β de los canales iónicos (Catterall 1984).

Todas las subunidades β poseen un dominio inmunoglobulínico extracelular estructuralmente homólogo al dominio variable de la superfamilia de inmunoglobulinas a la que pertenecen las moléculas de adhesión celular (CAMs) (figura 3).

La subunidad β1 fue aislada y caracterizada por Isom et al., en 1992, (Isom, De Jongh et al. 1992).

Las subunidades β1 y β3 se asocian de manera no–covalente a la subunidad α, mientras que las subunidades β2 y β4 se encuentran unidas covalentemente a la subunidad α mediante un puente de disulfuro (Brackenbury and Isom 2008).

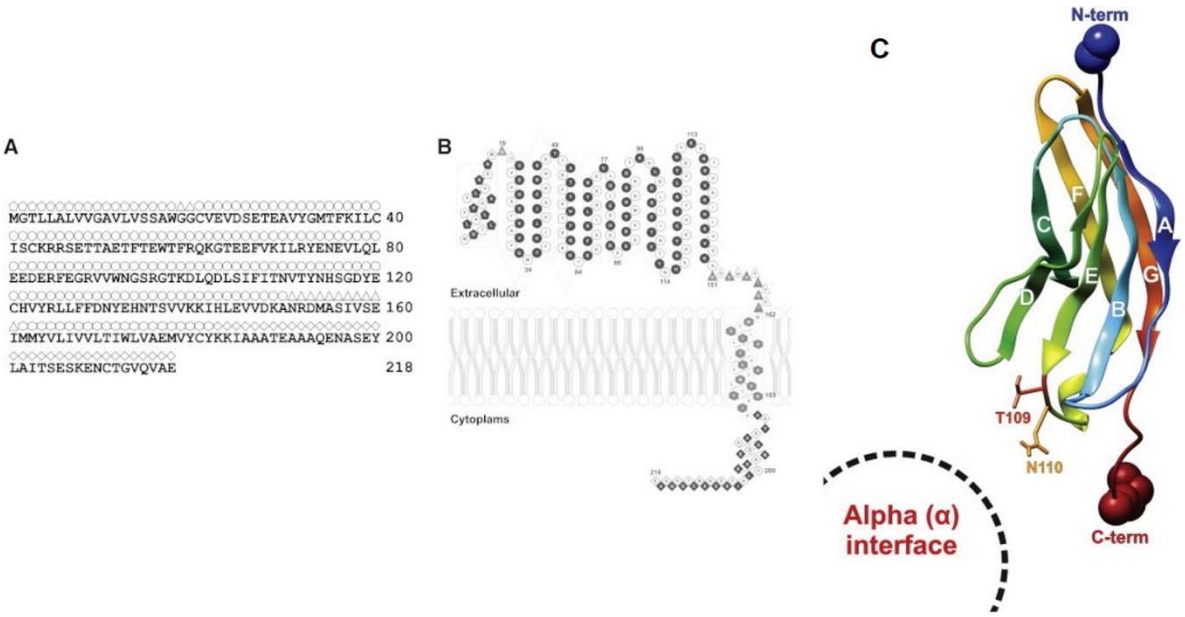


Figura 3: Visualización esquemática de la cadena principal con sus dominios de la subunidad β. (A) Secuencia, (B) Topología y (C) Modelo 3D.

2.4.2 Modulación de la corriente de sodio por la subunidad β1

Cuando la estructura primaria y la expresión funcional de la subunidad β1 fue publicada por Isom y cols., reportaron que la co-expresión de subunidades β1 con subunidades α, incrementa la amplitud de la corriente de sodio, acelera su inactivación y modifican la dependencia de voltaje de inactivación hacia potenciales de membrana hiperpolarizantes (Isom, De Jongh et al. 1992).

La hipótesis de mayor aceptación, propone que la subunidad β1 estabiliza a la α en una conformación que inactiva y recupera (*gating*) en modo rápido. En la ausencia de β1, la subunidad α puede fluctuar entre dos conformaciones, resultando en un modo rápido y uno lento de *gating*. β1 podría alterar el equilibrio entre estos dos estados, favoreciendo el modo rápido de *gating*. Esto explicaría porque ambos modos son evidentes cuando solo la subunidad α es expresada en ovocitos de *Xenopus laevis*, pero el modo de *gating* rápido prevalece cuando la subunidad β1 es co-expresada (Bennett, Makita et al. 1993).

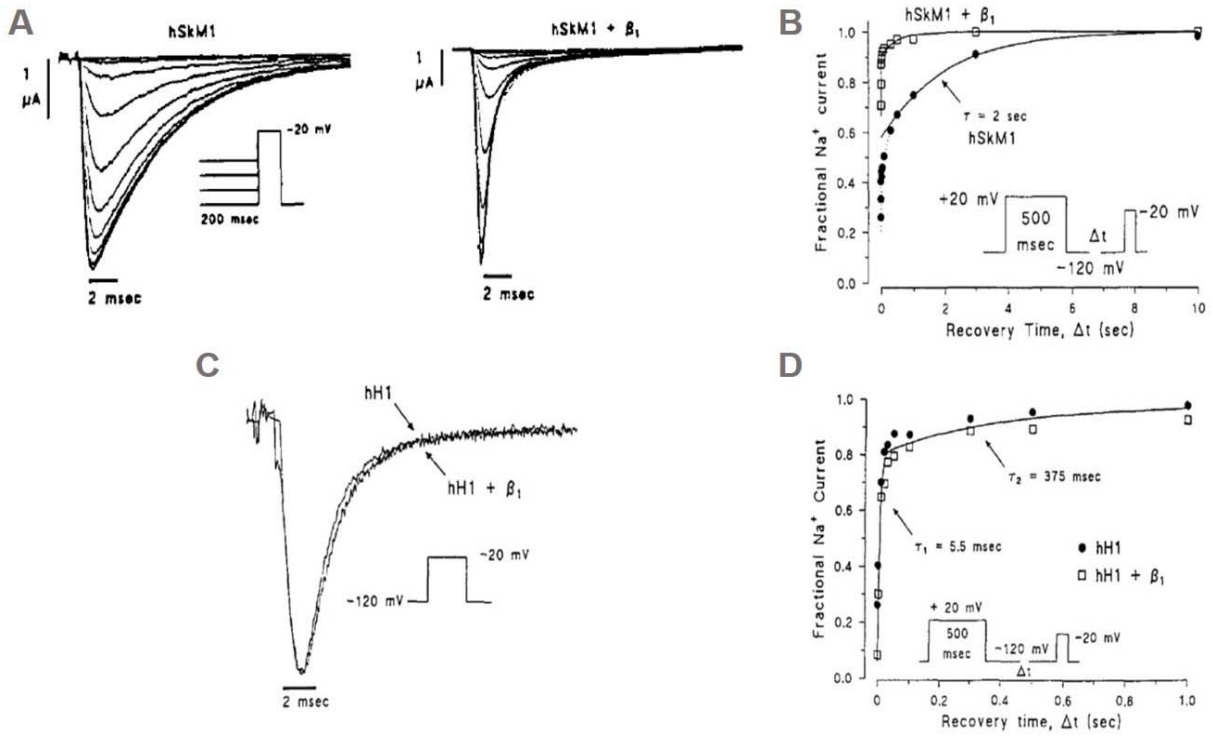


Figura 4: Expresión funcional de la subunidad β1 humana con la subunidad α del canal de sodio provenientes de músculo esquelético y corazón humano. **A.** Trazos de corrientes obtenidas en ovocitos de *Xenopus* expresando solo hSkM1 ($hNa_v1.4$) o en combinación con β1 a diferentes pulsos de voltaje (–80 a +10 mV) partiendo de un potencial de sostenimiento de –100 mV. **B.** Recuperación de la inactivación de hSkM1 (círculos negros) y co-expresión de hSkM1 con β1 (círculos blancos). **C.** Trazos de corrientes obtenidas de ovocitos expresando hH1 ($hNa_v1.5$) y hH1 + β1) durante un pulso de voltaje a –20 mV partiendo de un potencial de sostenimiento de –120 mV. D. Recuperación de la inactivación de hH1 (círculos negros) y co-expresión de hH1 con β1 (círculos blancos). Modificado de Makita, Bennett et al. 1994.

En general, la co-expresión de la subunidad β1 con varias isoformas de la subunidad α de vertebrados acelera la inactivación, cambia la dependencia de voltaje de inactivación de estado estable y aceleran la recuperación de la inactivación (Patton, Isom et al. 1994, Chen and Cannon 1995, Makita, Bennett et al. 1996, Tan, Choi et al. 2011). Sin embargo, Makita y cols., señalaron que la secuencia nucleotídica de la subunidad β1, obtenida de músculo cardiaco y esquelético, es idéntico al obtenido de cerebro humano. Por otro lado, al demostrar la expresión funcional de la subunidad β1 en ovocitos de rana *Xenopus laevis* microinyectados usando las isoformas hNav1.4 (hSkM1) y hNav1.5 (hH1) observaron: en hSkM1 + β1, corrientes con inactivación más rápida así como una recuperación de la inactivación más rápida que la observada en la microinyección con hSkM1; en contraste, la co-expresión de hH1 + β1 no muestran efecto detectable sobre la cinética de activación o inactivación. Sus datos demuestran que la subunidad β1 es funcional en los canales de sodio, pero no afecta la actividad en todas las isoformas de canales de sodio (figura 4) (Makita, Bennett et al. 1994).

2.5 Permeabilidad en el anillo DEKA

Trimmer y cols., aislaron el ADNc que corresponde a la subunidad α del canal de sodio de músculo esquelético de rata. Este péptido tiene un tamaño de 1840 aminoácidos, también se le denomina micro1 (μ1) (Trimmer, Cooperman et al. 1989).

Favre y cols., demostraron que el anillo DEKA es crucial para la selectividad de iones Na^+ sobre otros iones, realizaron mutaciones a alanina de los primeros tres residuos del anillo DEKA. Sus resultados electrofisiológicos y de permeabilidad sugirieron que el ácido aspártico 400 (D400A) no es esencial para la selectividad iónica del canal, por otra parte la mutación del ácido glutámico en el dominio II (E755A) incremento la permeabilidad (P_K/P_{Na}), por otro lado en la mutación de lisina (K1237A) la selectividad por Na^+ ó K^+ es indistinta. Sus resultados también revelan que el canal es permeable a Ca^{2+} extracelular en los casos en que la lisina 1237 es remplazada por aminoácidos neutros (alanina, cisteína, metionina y fenilalanina) o carga negativa (glutamato) demostrando que la lisina es estructuralmente esencial para rechazar Ca^{2+} y sugiriendo que esta exclusión se debe a una interacción electrostática, de igual manera señalaron que la selectividad Na^+/K^+ se debe a la presencia de lisina en el dominio III del anillo DEKA (Favre, Moczydlowski et al. 1996).

Por otro lado, Chiamvimonvat y cols., realizaron mutaciones a cisteína en el anillo DEKA y encontraron que la mutación K1237C incrementa la permeabilidad del canal a cationes monovalentes como: K^+ y NH_4^+, mientras la mutación E755C altera la selectividad a cationes monovalentes como: NH_4^+, pero no a K^+, Cs^+ o NMG^+ (N-metil-D-glucamina). La substitución a cisteína de los residuos D400 ó A1529 no tiene efectos sobre la selectividad a cationes monovalentes y todas las mutantes son permeables a Li^+, pero no son permeables a NH_4^+, K^+, Cs^+ o NMG^+. Además las mutaciones a cisteína no causaron restructuración en el poro del canal de sodio obteniendo canales funcionales con apertura dependiente de voltaje y selectividad por cationes monovalentes (Chiamvimonvat, Perez-Garcia et al. 1996).

Sun et al., realizaron mutaciones a alanina en el anillo DEKA transfectando en la línea celular HEK-293, coincidieron que lisina influye en la selectividad por Na^+, ya que el mutante DEAA es permeable a una amplia clase de cationes monovalentes que normalmente no tienen paso a través del canal nativo, también concluye que las cargas de los aminoácidos del anillo DEKA son determinantes estructurales del comportamiento de exclusión molecular del canal de sodio μ1 (Sun, Favre et al. 1997).

Una mejor descripción de estas mutaciones fue realizada por Hilber y cols., (figura 4) la cual plantea que el anillo DEKA no solo afecta la selectividad, también altera las propiedades de cierre del canal. Construyeron mutantes con carga neutra: D400A, E755A y K1237A encontrando que los canales mutados D400A y K1237A pasaron a un estado inactivado del cual se recupera lentamente, llamado por ellos "inactivación ultra-lenta". Sus datos sugieren que la interacción entre la carga positiva del residuo K1237 y la carga negativa del residuo D400 estabilizan la estructura del poro y de este modo se previene el paso a una inactivación ultra-lenta. Por otra parte, la interacción entre K1237 y E755 parece proveer las bases para la selectiva permeabilidad de Na^+ sobre K^+ (Hilber, Sandtner et al. 2005).

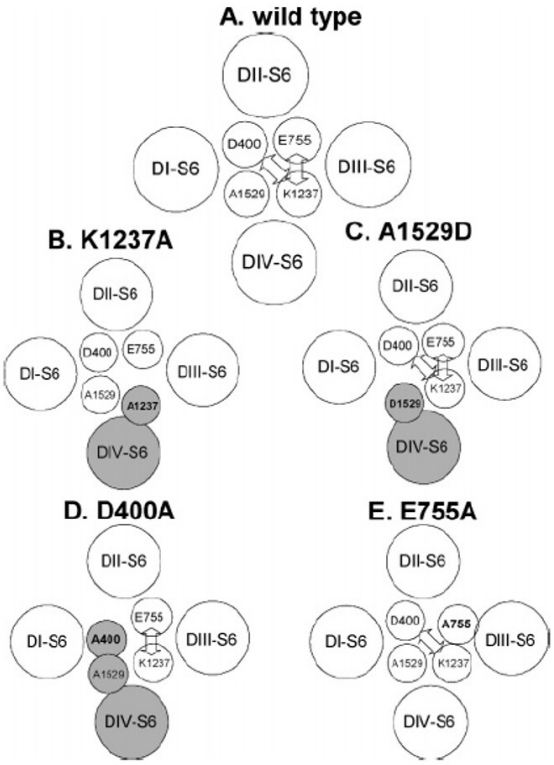


Figura 5: Posibles interacciones electrostáticas entre los residuos DEKA se indican con flechas. **A**. nativo; interacciones electrostáticas entre residuos DIII-K1237, DI-D400 y DII-E755 estabilizan la estructura del filtro de selectividad. **B.** mutación DIII-K1237A, se pierden las interacciones electrostáticas entre los residuos DIII-K1237, DI-D400 y DII-E755 resultando en un desplazamiento del asa P del DIII. **C.** mutación DIV-A1529D, la carga negativa en el DIV produce una repulsión electrostática entre las asas P del DIV y DI. **D.** mutación DI-D400A, se pierde la interacción electrostática entre DI-D400 y DIII-K1237 resultando en un desplazamiento del asa P del DI produciendo una interacción con el asa P del DIV. **E.** mutación DII-E755, se pierde la interacción electrostática entre DII-E755 y DIII-K1237. Sin embargo, aun interactúa DI-D400 con DIII-K1237 estabilizando la estructura del filtro de selectividad. (Hilber, Sandtner et al. 2005).

2.6 Activación del canal de sodio

La obtención del código genético y su posterior secuenciación de los canales iónicos, permitió un enfoque molecular para entender la señalización bioeléctrica en esta creciente investigación. El primer gen clonado de un canal de sodio dependiente de voltaje reveló un patrón de aminoácidos de arginina y lisina espaciados regularmente en los segmentos S4 (Noda, Shimizu et al. 1984), semejante a otros miembros de la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje.

El índice hidropático de la secuencia de aminoácidos del canal de sodio, predice cuatro dominios de seis segmentos transmembrana cada uno. El segmento S4 en estos canales son homólogos en los cuatro dominios, pero difieren en la cantidad de carga.

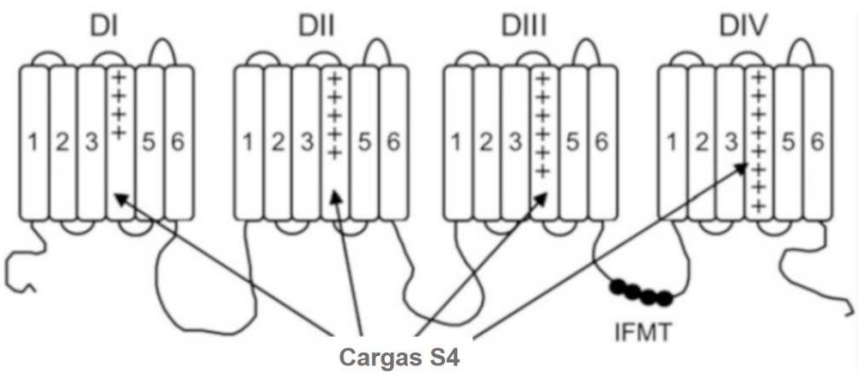


Figura 6: Estructura del canal Na_V, muestra la distribución asimétrica de las cargas positivas en el segmento S4 en los dominios I al IV (DI – DIV) y el péptido de inactivación IFM. Modificado de (Peters and Ruben 2014).

Varias décadas de investigación y diversos resultados experimentales soportan la hipótesis que el segmento S4 se mueve hacia el exterior en respuesta a la despolarización de membrana. La técnica de mutagénesis llego a ser posible cuando las secuencias de los canales de sodio de músculo esquelético y neuronal se obtuvieron. En este sentido, el segmento S4 fue de interés, se realizaron mutaciones de arginina a lisina sobre el segmento S4 para investigar las funciones de estos segmentos (Figura 7). De inmediato fue evidente que la activación del canal de sodio fue perturbada con la mutación de los aminoácidos positivos, apoyando la hipótesis que los segmentos S4 actúan como sensores de voltaje para promover la activación e inactivación (Stuhmer, Conti et al. 1989).

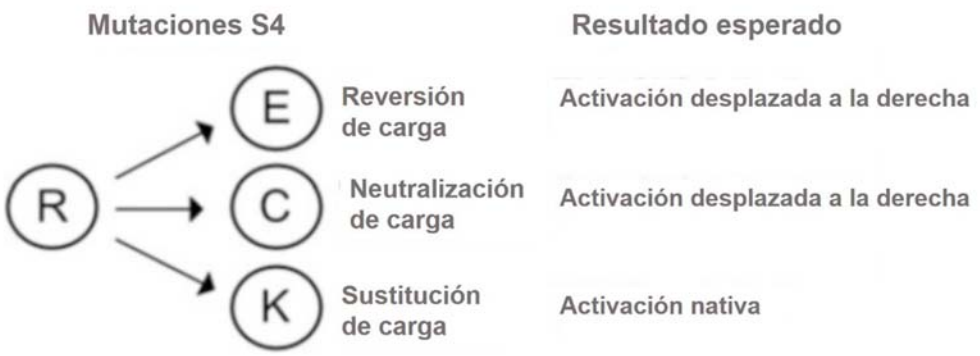


Figura 7: Mutaciones estratégicas utilizadas en el estudio del efecto de la carga sobre el segmento S4. Modificado de (Stuhmer, Conti et al. 1989).

2.6.1 Modelado estructural y dinámica molecular

La estructura cristalográfica del canal de potasio procariota KcSA, reveló los aminoácidos específicos con las funciones de permeación y selectividad iónica. Con la difracción de rayos–X, la microscopia electrónica del canal de potasio dependiente de voltaje KvAP, la subsecuente cristalización y caracterización del canal de potasio *Shaker* y Kv1.2 en mamífero, se proporcionaron detalles estructurales en el sensor de voltaje de canales iónicos (Cuello, Cortes et al. 2004, (Long, Campbell et al. 2005, Long, Campbell et al. 2005). Es importante destacar que estos antecedentes, iniciaron una tendencia para incorporar el detalle estructural con la investigación de su función en el canal iónico de potasio.

El modelado estructural a menudo emplea modelos de homología del canal de interés, basados en la premisa de que los canales iónicos dependientes de voltaje comparten cierta homología considerable en su secuencia, especialmente en las regiones de sensor de voltaje. La estructura cristalográfica se determina normalmente en un entorno de despolarización, proporcionando datos sobre el estado activado en los canales de potasio (Long, Campbell et al. 2005, Long, Campbell et al. 2005), y sodio (Payandeh, Scheuer et al. 2011, Payandeh, Gamal El-Din et al. 2012, Zhang, Ren et al. 2012). Modelos en estado cerrado o intermedio se han construido a partir de una comparación de estas estructuras con datos experimentales sobre el movimiento del S4 combinando técnicas de mutagénesis, fluorescencia, espectroscopia, unión de metales y/o experimentos de bloqueo con disulfuro, para establecer posibles posiciones de los aminoácidos cargados del S4 u otras interacciones con el sensor de voltaje (DeCaen, Yarov-Yarovoy et al. 2008, Yarov-Yarovoy, DeCaen et al. 2012). Datos de difracción de rayos–X de la región S1–S4, obtenidas de la estructura cristalográfica del canal de nucleótidos cíclicos

bacterial MIotiK1, adquirido en estado cerrado, también ha demostrado ser útil en la generación de modelos de canales iónicos dependientes de voltaje en la conformación de reposo (Clayton, Altieri et al. 2008). En general, estas investigaciones apoyan un modelo de compuerta de voltaje en el que la hélice S4 se transloca a una corta distancia a través de un campo eléctrico con limitado movimiento de las hélices S1, S2 y S3 (Delemotte, Klein et al. 2012, Vargas, Yarov-Yarovoy et al. 2012).

El modelado estructural o por homología de canales iónicos en estado cerrado o abierto ha sido explorado en simulaciones computacionales sobre el movimiento del sensor de voltaje y cálculos de trayectoria por dinámica molecular (Delemotte, Klein et al. 2012, Vargas, Yarov-Yarovoy et al. 2012).

Todas las simulaciones en dinámica molecular para los canales de potasio (Kv) han sido usadas para investigar o predecir eventos de plegamiento estructural, eventos de permeación iónica o estados intermedios, la conformación helice 3–10 propuesta para favorecer el alineamiento del S4 y sus contra-cargas en la activación, y la definición de posiciones en la compuerta del poro (Delemotte, Tarek et al. 2011, Gajewski, Dagcan et al. 2011, Jensen, Jogini et al. 2013).

Simulaciones de dinamica molecular en la activación del canal de sodio, fueron empleados en varios estudios sobre el sensor de voltaje. La incorporacion de datos electrofisiológicos en el modelo utilizado para las simulaciones, es un metodo que restringe a la proteina a un entorno previsto o a evaluar el equilibrio de esa proteina en un entorno sin restricciones (Sompornpisut, Roux et al. 2008). El estado activado de NaChBac se predijó de esta manera, mediante la ejecución de simulaciones de dinámica molecular del sensor de voltaje unido a la membrana después de determinar las restricciones para cada aminoácido en dicho segmento con respecto a su accesibilidad al disolvente (Chakrapani, Sompornpisut et al. 2010). La extensa caracterización fisica en este estudio, proporciona un apoyo complementario a las predicciones de simulaciones por dinámica molecular de las interacciones del S4 con sus contra-cargas en el NaChBac. Estas y otras simulaciones de dinámica molecular en los canales de sodio bacteriales como NavAv predicen interacciones del S4 con sus contra-cargas durante la activación, esto promovido por la formación dinámica de la conformación helicoidal 3–10 del S4 (Amaral, Carnevale et al. 2012).

2.6.2 Sensor de voltaje: Modelo de hélice

Con la demostración del segmento S4 como sensor de voltaje, surge un objetivo importante y es explicar como se consigue el movimiento del sensor de voltaje en un entorno energéticamente desfavorable, dispuesto por una membrana plasmatica hidrófoba. Estados intermedios que favorezcan energéticamente la translocación, son una importante consideración para una eficiente transferencia de carga a través de una barrera hidrofóbica. Los aminoácidos de carga positiva del sensor de votaje, se podrian estabilizar con aminoácidos de carga negativa que respondan a la despolarización de membrana (figura 8). Este mecanismo propuesto ha evolucionado de lo teórico a lo experimental. Los primeros antecedentes fueron observados en los canales de potasio (*Shaker*, HCN2, BK, y KCNQ), donde aminoácidos de carga negativa en el sensor de voltaje modulan la activación del canal (Papazian, Shao et al. 1995, Chen, Mitcheson et al. 2000, Ma, Lou et al. 2006, Pless, Galpin et al. 2011). Investigaciones basadas en la estructura cristalográfica del canal de potasio, apoyan el modelo de hélice deslizante o tornillo (Yarov-Yarovoy, Baker et al. 2006). Usando el modelo de helice deslizante, recientes estudios han previsto una caracterización funcional de las contra-cargas en los canales de sodio. Es interesante notar que los modelos recientes de la estructura de los canales de sodio postulan que las cargas negativas de los segmentos S1 y S3 proporcionan asociaciones por puentes de sal con los aminoácidos positivos del segmento S4 en el movimiento de tornillo para la translocación del sensor de voltaje (Guy and Seetharamulu 1986).

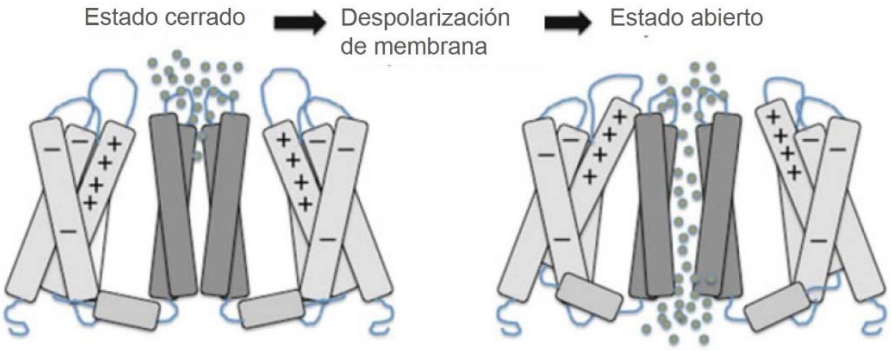


Figura 8: Modelo de activación del canal iónico y apertura del poro. Las contra-cargas identificadas del canal NacBac son mostradas con (–), estos forman pares de iones con las cargas (+) del segmento S4 para impulsar el segmento hacia afuera y el asa intracelular S4–S5 jala para abrir la compuerta del poro y así permitir la permeabilidad iónica. Modificado de (Peters and Ruben 2014).

2.7 Inactivación del canal de sodio

En todos los canales iónicos estudiados hasta la fecha, incluido el canal de sodio, tiene dos o más estados de configuración relativamente estables. Cada una de estas configuraciones estables representa un estado funcional diferente (Kandel 2013).

La *"inactivación"* es el periodo refractario después de la activación, por el cual algunos canales regulados por voltaje tienen que entrar. En los canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje se piensa que la inactivación es el resultado de una variación de la conformación intrínseca, controlada por una subunidad o región del canal separado de la que controla la activación (Kandel 2013).

La apertura de los canales de Na^+ es muy breve, ya que éstos se inactivan inmediatamente. Los canales de Na^+ presentan dos formas de inactivación, una rápida y una lenta. Para explicar este fenómeno, Clay Armstrong y Francisco Bezanilla (1977) propusieron que la inactivación del canal de Na^+ se produciría cuando el canal abierto (Activado) es bloqueado por un tapón sujeto por una cadena (el mecanismo de la bola y la cadena; figura 9), evitando de esta forma el cierre de la compuerta de activación.

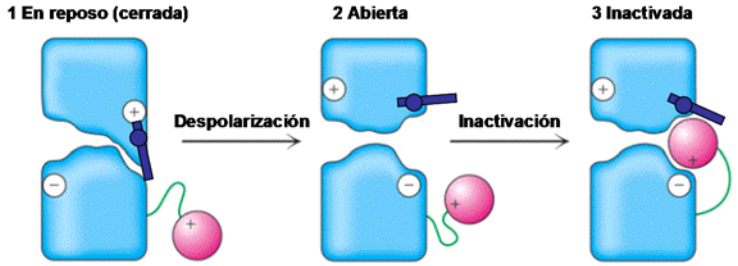


Figura 9. Modelo de la "Bola y la Cadena". Ilustración de la posición de las compuertas de activación e inactivación cuando el canal está en reposo (1), cuando se han abierto los canales de Na^+ (2), y cuando se han inactivado esos canales (3). Es el movimiento de la carga positiva sobre la compuerta de activación a través del campo eléctrico de la membrana lo que genera la corriente de activación. (Modificado de Hille, 2001).

2.7.1 Inactivación rápida

Este proceso está localizado en la superficie citoplasmática del canal, ya que puede inhibirse con diversas proteasas, p.ej. pronasa o α-quimotripsina (Armstrong, Bezanilla et al. 1973, Armstrong and Hille 1998). Durante la despolarización, la compuerta de activación del canal se abre y la bola de inactivación puede unirse a su zona receptora, lo que obstruye el vestíbulo interno e impide la entrada de iones Na^+, con lo que el canal pasa al estado inactivo. Diversos estudios han demostrado que el asa que une los dominios DIII-DIV juega un papel

importante en el proceso de inactivación (Stuhmer, Conti et al. 1989, Catterall 1992): a) los anticuerpos policlonales dirigidos contra este segmento retrasan la inactivación, algo que no sucede cuando se utilizan anticuerpos contra otras porciones del canal (Vassilev, Scheuer et al. 1988). b) La sección del asa que une los dominios DIII-DIV produce un marcado retraso de la inactivación (Patton, West et al. 1992, Patton, West et al. 1993), mientras que la sección del que une los dominios DII-DIII no la modifica (Stuhmer 1991). c) La mutación de 6 de los 12 aminoácidos cargados positivamente que existen en esta asa por residuos de aspartato o glutamato acelera la inactivación del canal (Moorman, Kirsch et al. 1990).

El segmento intracelular que une los dominios DIII – DIV, comprende 60 residuos, 12 de los cuales son argininas o lisinas que pueden tener sitios de unión a tripsina u otros agentes que remueven la inactivación de los canales de Na^+. Este segmento intracelular contiene una secuencia hidrofóbica pequeña de tres aminoácidos: isoleucina (Ile) 1488, fenilalanina (Phe) 1489 y metionina (Met) 1490 (IFM), localizados en el asa que une DIII-DIV, juega un importante papel en la inactivación rápida característica del canal de Na^+ y puede tener propiedades de una inactivación tipo “bola” (figura 9). La F1489 es la más crítica, ya que su mutación por ácido glutámico (F1489E) suprime la inactivación y disminuye la conductancia máxima del canal (West, Patton et al. 1992, West, Scheuer et al. 1992); las mutaciones I1488E y M1490E disminuyen la inactivación, pero de forma mucho menos importante. Además, la mutación del triplete IFM por QQQ suprime la inactivación del canal (West, Patton et al. 1992, West, Scheuer et al. 1992, Mitrovic, George et al. 1994, Mitrovic, George et al. 1995). Estos resultados sugieren que durante la activación del canal el segmento S6III-S1IV, que contiene la secuencia IFM se dobla y podría actuar como una compuerta de inactivación que ocluye el vestíbulo interno del canal e impide la entrada de Na^+. El punto receptor para la compuerta de inactivación incluye residuos hidrofóbicos localizados en el extremo intracelular del segmento S6IV y en el lazo intracelular S4-S5III y S4-S5IV (McPhee, Ragsdale et al. 1995, Smith and Goldin 1997, Filatov, Nguyen et al. 1998, McPhee, Ragsdale et al. 1998).

La propia activación del canal de Na^+ activa el proceso de inactivación. En canales mutados se ha demostrado que el movimiento hacia el medio extracelular del S4IV es la señal que inicia la activación rápida del canal y al mismo tiempo pone en marcha el proceso de inactivación del canal (Chahine, George et al. 1994, O'Leary, Chen et al. 1995).

Una clase de toxinas de escorpión (α-NaTx) y toxinas de anemona, enlentencen o eliminan la inactivación rápida de los canales de Na^+ con un significativo efecto sobre la activación. Las mutaciones en ocho diferentes residuos del asa extracelular S3-S4 del dominio IV deprime su unión (Rogers, Qu et al. 1996), y la mutación en las 3 argininas externas en el segmento S4 del dominio IV reduce la acción de estas toxinas en el movimiento de la compuerta cargada (Sheets, Kyle et al. 1999).

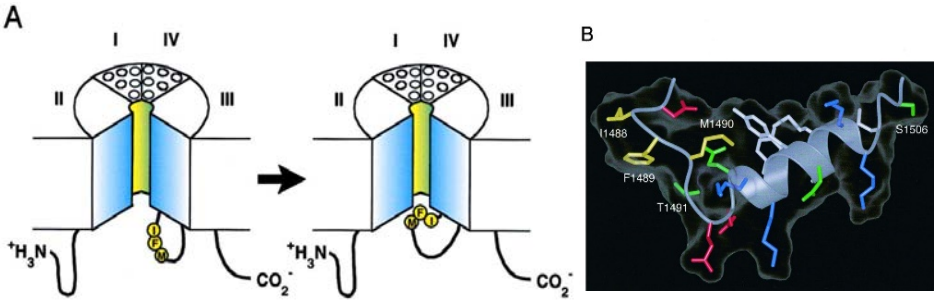


Figura 10. Mecanismo de inactivación de los canales de sodio. (A) Se ilustra el mecanismo de tapón de bisagra del canal de Na_v. El asa intracelular que conecta los dominios III y IV del canal de Na^+ representa la formación de una tapa de bisagra. Se muestra que el residuo fenilalanina-1489 (F) ocluye la boca intracelular del poro en el canal de Na^+ durante el proceso de inactivación. (B) Estructura tridimensional del segmento central de la compuerta de inactivación determinado por NMR multidimensional (Rohl, Boeckman et al. 1999). Isoleucina-1488, fenilalanina-1489, y metionina-1490 (IFM) se ilustran en amarillo. También se indican la treonina-1491, que es importante para la inactivación y la serina-1506, que es un sitio de fosforilación y modulación por la proteína cinasa C (Modificado de Catterall, 2000).

2.7.2 Inactivación lenta

Cuando un axón o un músculo se despolariza por algunos segundos o minutos, los canales de Na^+ entran en una clase de estado inactivado "inactivación lenta de Na^+". Repolarizaciones por segundos o minutos, son necesarias para re-establecer los canales (Adelman and Palti 1969, Chandler and Meves 1970, Khodorov, Shishkova et al. 1974, Fox 1976, Khodorov 1981). Este mecanismo persiste tras la supresión de la inactivación rápida, aunque puede inhibirse tras realizar mutaciones en la porción citoplasmática de los segmentos S5 y S6 (Hayward, Brown et al. 1997), lo que sugiere que este tipo de inactivación implica un cambio conformacional en la boca interna del canal que produce su cierre.

El mecanismo de inactivación lenta es más complicado, localizado en estructuras diferentes que la inactivación rápida y es poco entendida (Vilin and Ruben 2001). Ya que tiene similitudes con la inactivación tipo C de los canales de potasio que está conectado con el poro externo, aminoácidos correspondientes en el canal de sodio han sido blanco de mutagénesis sitio dirigida. Así, en la ausencia de β1, el mutante W402C (Región P1, $rNa_v1.4$) afecta la

inactivación rápida (Balser, Nuss et al. 1996), mientras que la mutación del aminoácido adyacente, E403C o E403R, parece estar a favor de entrar en un estado de inactivación lenta (Zhang, Xu et al. 2003) al igual que W434A (Wang and Wang 1997). E403 junto con E758, D1214 y D1532 en posiciones comparables en los dominios II, III y IV respectivamente, forman un anillo externo cargado (EEDD) cuyo arreglo estructural se ha visto que está asociado con la inactivación lenta (Xiong, Li et al. 2003).

La mutación K1237S lleva al canal a un tipo de inactivación muy lenta ("ultra – lenta", (Todt, Dudley et al. 1999)). Esta inactivación muy lenta también se ha observado con el canal mutante A1529D del asa P del DIV, en el filtro de selectividad (Hilber, Sandtner et al. 2001).

En canales $rNa_v1.4$, removiendo el péptido de inactivación rápida IFM por la mutación a QQQ (IFM1303QQQ), la inactivación lenta se mantiene intacta (Featherstone, Richmond et al. 1996, Vedantham and Cannon 1998). Se ha mostrado que la inactivación rápida inmoviliza las compuertas de carga (Bezanilla and Armstrong 1977); por consiguiente, Featherstone et al., estipulan que la inmovilización de la compuerta de carga, implica una parcial o completa inmovilización de uno o más segmentos S4. Si la inactivación lenta depende de la movilidad de los segmentos S4, o la inmovilización del S4 es simultaneo con la inmovilización del mecanismo de inactivación lenta, entonces la inactivación rápida con su resultante inmovilización de las corrientes de gating podría plausiblemente resultar en canales con una inactivación lenta más tardada y menos completa de acuerdo con sus resultados. (Featherstone, Richmond et al. 1996).

Por su parte Kontis y Goldin, buscando el papel de las cargas positivas del sensor de voltaje en la inactivación rápida y lenta del canal de sodio $rNa_v1.2$ cerebral, realizaron mutaciones en la segunda y cuarta carga positiva conservada en el segmento S4 de los cuatro dominios heterólogos. Ambas mutaciones fueron hechas a glutamina neutralizando la carga y lisina conservando la carga. Para determinar si la inactivación rápida alteraba los efectos de las mutaciones sobre la inactivación lenta, las mutaciones fueron también construidas en un canal que tenía la inactivación rápida removida por la incorporación de la mutación IFMQ3 en el asa intracelular DIII–DIV. Las mutaciones desplazaron la $V_{1/2}$ de la inactivación rápida en una dirección negativa, de manera similar las mutaciones en los dominios II y III desplazaron la $V_{1/2}$ de la inactivación lenta en una dirección negativa. Cuando la inactivación rápida fue eliminada, las mutaciones resultaron en un desplazamiento positivo de la $V_{1/2}$ en la inactivación lenta.

Los efectos de las mutaciones sobre la inactivación lenta fueron diferentes cuando la inactivación rápida estaba intacta. La mayor parte de las mutaciones causaron significativos desplazamientos de la $V_{1/2}$ en una dirección negativa, pero la magnitud de los efectos no está correlacionada con la reducción en la carga. Las sustituciones conservando la carga en las mismas posiciones tuvieron efectos comparables, demostrando que los desplazamientos no fueron causados por la eliminación de la carga. Estos resultados indican que la estructura de los aminoácidos en esas posiciones en el S4 tienen roles más importantes en la transición al estado de inactivación lenta cuando la inactivación rápida está presente que cuando está ausente. En conclusión, Kontis y Goldin sugieren con base a sus resultados, que las regiones del S4 de los cuatro dominios del canal de sodio están involucrados en la dependencia de voltaje de inactivación, pero en distintos grados. Finalmente, los estudios muestran que hay una interacción entre los procesos de inactivación rápida y lenta (Kontis and Goldin 1997). Esta observación es interpretada de diversas formas (Featherstone, Richmond et al. 1996, Townsend and Horn 1997, Vedantham and Cannon 1998). El acoplamiento entre la inactivación rápida y lenta ha sido también propuesta por análisis de mutación puntual en F1304Q del canal $Na_v1.4$ (Nuss, Balser et al. 1996). Los canales de sodio dependientes de voltaje exhiben dos formas de inactivación. Mientras estudios previos han sugerido que la inactivación rápida y lenta son estructuralmente procesos independientes de compuerta, poco es conocido sobre la relación entre los dos. Vedantham y Cannon, probaron esta relación examinando los efectos de la inactivación lenta sobre un marcador conformacional de la inactivación rápida, el asa DIII–DIV que se cree forma parte de la partícula de inactivación rápida, fenilalanina fue sustituida por cisteína en la posición 1304 en el canal de sodio $Na_v1.4$. La accesibilidad de F1304C fue usado como un marcador conformacional para probar la estructura de la compuerta de inactivación rápida durante el desarrollo y recuperación de la inactivación lenta. Encontraron que F1304C no es alterada por la inactivación lenta y que la accesibilidad de la mutante no es enlentecida después de largas despolarizaciones 2–10s. Esto es consistente con la interpretación de que el decaimiento del componente lento en el trazo de corriente de F1304C, es debido a la inactivación lenta y no a la inactivación rápida, y soporta la hipótesis, generalmente aceptada, que la inactivación rápida y lenta son estructuralmente distintas. Vedantham y Cannon con base en sus resultados sugieren las siguientes conclusiones: a) la inactivación rápida y lenta son procesos estructuralmente distintos que no están acoplados, b)

con largas despolarizaciones, la inactivación rápida precede a la inactivación lenta (Vedantham and Cannon 1998).

Posteriormente McCollum y cols. se hicieron la pregunta: ¿El asa DIII–DIV interactúa con estructuras que controlan la inactivación lenta? Su estudio trató de clarificar el mecanismo molecular por el cual el asa DIII–DIV podría afectar la inactivación lenta en $hNa_v1.4$. Para esto se enfocaron sobre las cargas cercanas a la partícula de inactivación IFM (D1309 y EE1314, 15) ya que las mutaciones de los aminoácidos cargados cercanos al motivo IFM había sido mostrado que afecta la dependencia de voltaje de la inactivación y deactivación (Groome, Fujimoto et al. 2003). Sus resultados mostraron que las mutaciones: D1309Q o R y E1314R, E1315R, desplazan a la derecha la relación de estado estable entre la inactivación lenta y el potencial de membrana, sugiriendo que la probabilidad de inactivación lenta es dependiente, al menos en parte, de las interacciones adyacentes al motivo IFM y las estructuras que regulan la probabilidad de inactivación lenta. (McCollum, Vilin et al. 2003).

Considerando los estudios previos donde mutaciones en el sensor de voltaje S4 y el asa DIII–DIV afectan las transiciones de compuerta dependientes de voltaje, se considera un modelo donde la interacción entre la inactivación rápida y lenta se da mediante la unión del motivo IFM durante la inactivación rápida impidiendo las subsecuentes transiciones de poro que resultan en la inactivación lenta.

2.8 Avances estructurales en canales de sodio dependientes de voltaje de origen bacterial

La familia de canales de sodio bacteriales representa un probable ancestro de los canales de sodio (Na_v) y calcio (Ca_v) en vertebrados. Recientemente se han cristalizado los canales de sodio de *Arcobacter butzleri* (Na_vAb) y de la bacteria marina *alphaproteobacterium HIMB114* (*Rickettsiales sp. HIMB114*; denotado Rh: Na_vRh) obtenidos por Payandeh y cols., 2011; Zhang y cols., 2012, respectivamente.

Los canales de sodio cristalizados, en combinación con un análisis de la estructura tridimensional, basados en métodos computacionales, análisis experimental y simulaciones de dinámica molecular, han permitido observar una arquitectura común en estos canales. Dicha arquitectura consiste de un poro de conductividad iónica (PM) y cuatro dominios periféricos con sensor de voltaje (VSDs).

Los canales dependientes de voltaje de potasio (K_v) y sodio bacteriales (Na_v) son homotetrámeros de subunidades que contienen 6 segmentos transmembrana (S1 – S6), a diferencia de los canales en vertebrado de calcio (Ca_v) y sodio (Na_v) que tienen 4 dominios heterólogos ligados a un solo polipéptido.

En los canales de sodio bacteriales, los segmentos S5 y S6 de las cuatro subunidades forman el PM y los segmentos S1 – S4 forman el VSDs, contienen un segmento S4 altamente conservado y cargado positivamente, donde las despolarizaciones causan su movimiento hacia el exterior durante la activación del canal. El movimiento de S4 esta acoplado a través del asa intracelular S4 – S5 a la compuerta de activación para abrir el poro.

En los canales de sodio de mamífero, dos procesos de inactivación físicamente distintos controlan la actividad del canal. La inactivación rápida opera en una escala de tiempo de milisegundos y se encuentra en una región citoplasmática entre los dominios tres y cuatro, lo que le confiere una inactivación rápida mediante un mecanismo de bola y cadena. En contraste, la inactivación lenta se desarrolla más lentamente, su papel fisiológico se resalta por enfermedades que involucran mutaciones, que afectan la inactivación lenta y clínicamente relevante por drogas que se unen a éste para bloquear el estado de inactivación lenta.

A diferencia de la inactivación rápida, la estructura y mecanismo involucrado en la inactivación lenta en canales de sodio se mantiene pobremente definida.

Los canales de sodio bacteriales, comparten propiedades con sus más complejos descendientes en vertebrados, incluyendo, activación dependiente de voltaje, inactivación y sensibilidad farmacológica. Sin embargo, su simple estructura homotetramérica, deja los canales de sodio bacteriales sin la compuerta de inactivación rápida que tienen los canales de mamífero. Sin embargo, se considera que estos canales bacteriales tienen un proceso de inactivación semejante a la inactivación lenta. Mutaciones cerca del filtro de selectividad (Yue, Navarro et al. 2002, Pavlov, Bladen et al. 2005), en el S6 (Zhao, Scheuer et al. 2004, Irie, Kitagawa et al. 2010) y en el VSDs de canales de sodio bacteriales, tienen efectos dramáticos, similares a la inactivación lenta en canales de sodio de mamífero.

Zhao y cols., (2004) mostraron que la prolina favorece la flexión de α–hélices, la sustitución de glicina 219 por prolina, estabiliza el estado abierto en el canal de sodio bacterial NaChBac. Esta glicina es importante, ya que en canales de potasio KcsA y MthK hace una flexión en el segmento TM2, favoreciendo la inactivación tipo C de estos canales.

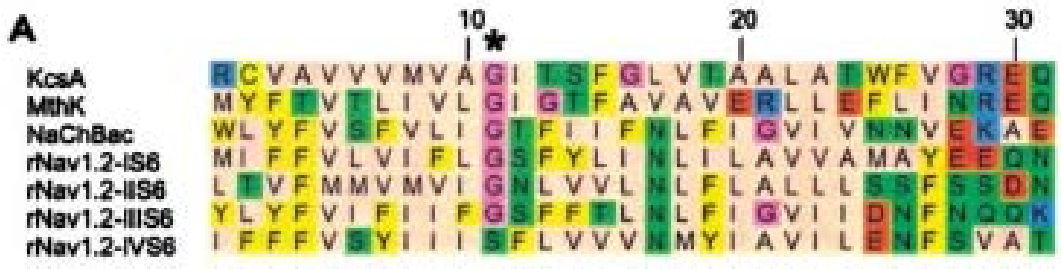


Figura 11. La glicina conservada en el segmento S6 transmembrana se encuentra marcada por una estrella en el alineamiento con las secuencias que revisten el poro de: KcsA canal de potasio de *Streptomyces lividans*; MthK canal de potasio de *Methanobacterium thermautotrophicum*; NaChBac canal de sodio bacterial de *Bacillus halodurans*; y cada S6 de los cuatro dominios (I – IV) de $Na_v1.2$ canal de sodio dependiente de voltaje de cerebro de rata (Zhao, Scheuer et al. 2004).

Además, otras tres mutaciones a prolina en la misma faz de S6, como G219, produjeron canales que activan a voltajes hiperpolarizantes e inactivan muy lentamente. El análisis detallado muestra que las mutaciones G219P y L226P causan un desplazamiento hacia potenciales negativos en la activación, y un enlentecimiento en la inactivación. Ellos sugieren que el movimiento de flexión en G219 es un elemento crucial para una apertura rápida y cierre del poro en este diverso conjunto de canales iónicos. En contraste, los canales estructuralmente relacionados TRP (6–TM), los cuales activan lentamente en respuesta a estímulos térmicos o la unión de ligandos, no tienen esta glicina conservada en su segmento S6 y cierra lentamente debido a que sus segmentos S6 son relativamente inflexibles. Estos resultados predicen que la sustitución por glicina en dichos canales puede favorecer el estado cerrado y acelerar la deactivación, mientras las sustituciones por prolina favorecen el estado abierto y enlentecimiento en la deactivación.

En el canal de sodio bacterial de *Arcobacter butzleri* (Na_vAb), Payandeh y cols., (2011) muestran un alineamiento múltiple donde incluyen el canal de sodio NaChBac, se observa que en la posición equivalente a G219 hay una valina (V205) y el segmento S6 no contiene ninguna glicina. Payandeh y cols., (2012) mencionan en sus estudios electrofisiológicos del canal Na_vAb, que la corriente se recupera en tres fases: temprana (τ = 103 ms), intermedia (τ = 3.8 s) y tardía (τ > 1 min), es decir, tarda en llegar a un estado de inactivación lenta, por lo tanto la recuperación es muy lenta, quizás debido a una estructura inflexible del segmento S6. Cuando presentan la mutación I217C en el segmento S6, el canal inactiva más rápido y la recuperación de la inactivación la hace en dos fases: temprana (137 ms) e intermedia (1.8 s). A pesar de que su modelo obtenido mediante la cristalización de Na_vAb, ellos mencionan que el mecanismo

molecular a través del cual la mutación I217C pueda causar esos efectos es desconocido, y especulan que la mutación favorece a una conformación cerrada casi simétrica de la compuerta de activación intracelular, como se observa en su estructura cristalográfica, el cual puede ser único en un estado pre–abierto en comparación con todos los demás estados del canal.

En general, la probable interpretación del extenso trabajo sobre canales de sodio Nav en toda la gama de filogenia, es que las bases estructurales para la inactivación lenta es conservada e involucra una red de cambios conformacionales acoplados, que se extienden desde la compuerta de activación intracelular, sobre el segmento S6 a el filtro de selectividad y vestíbulo externo.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En trabajos previos del laboratorio de Biofísica cardiaca (Martínez, 2011; Sanchez, 2011), se observó que las mutaciones de lisina 1237 en la isoforma esquelética $rNa_v1.4$ y lisina 1419 en la isoforma cardiaca $hNa_v1.5$, a cisteína, alteraban la selectividad del canal y mostraban una aceleración en la inactivación del canal, aunque el efecto era drástico en la isoforma $rNa_v1.4$ que en $hNa_v1.5$. La pregunta fue, ¿solo la mutante K1237C muestra esos efectos? o ¿la conservación de carga positiva como arginina (R), un aminoácido neutro como alanina (A) o una inversión de carga a negativo como acido glutámico (E), mostrarían efectos diferentes a los observados en K1237C?

Se ha observado que las mutaciones que deterioran la inactivación lenta, causan parálisis periódica de músculo esquelético y arritmias en corazón (Ruff and Cannon 2000, Wang, Makita et al. 2000). Además, mutaciones puntuales en diferentes regiones de canales de sodio tienen significantes efectos sobre la inactivación lenta (Heinemann, Terlau et al. 1992, Chiamvimonvat, Perez-Garcia et al. 1996, Favre, Moczydlowski et al. 1996, Kontis and Goldin 1997, Sun, Favre et al. 1997, Wang and Wang 1997, Xiong, Li et al. 2003, Zhang, Xu et al. 2003, Hilber, Sandtner et al. 2005, Chen, Yu et al. 2006).

Chen et al., 2006, mostraron en la isoforma neuronal $rNa_v1.2$ que asparagina (N) esta conservada en todas las subunidades S6 del canal neuronal, las mutaciones a alanina (A) de las 4 asparaginas, mostró en N418A–DI y N1466A–DIII, un enlentecimiento en la recuperación de la inactivación. Las asparaginas, ¿se encuentran en la isoforma $rNa_v1.4$? y ¿tendrán el mismo efecto que el observado en el canal neuronal?

Estudios con los canales de sodio bacteriales cristalizados en combinación con un análisis computacional de la estructura tridimensional, análisis experimental y simulaciones de dinámica molecular (Zhao, Scheuer et al. 2004, Payandeh, Scheuer et al. 2011, Payandeh, Gamal El-Din et al. 2012, Zhang, Ren et al. 2012), ha dejado ver aminoácidos importantes en la activación e inactivación del canal, mismos que no han sido estudiados en canales de sodio de mamífero. La estructura homotetramérica en los canales de sodio bacterianos no muestra una compuerta de inactivación rápida (IFM) como la que tienen los canales de mamífero. Sin embargo, se considera que estos canales bacteriales tienen un proceso de inactivación semejante a la inactivación lenta. Los alineamientos múltiples muestran una conservación de

estos aminoácidos e indirectamente involucre la conservación de los componentes estructurales de la inactivación lenta.

Sin embargo, el mecanismo molecular de la inactivación lenta es desconocido y no hay mutación puntual que excluya sustancialmente la inactivación lenta, aunque, estas han definido determinantes moleculares esenciales.

En este trabajo se propone caracterizar el efecto de lisina 1237 ubicado en el poro central, glicina 1148 que se encuentra en el segmento citoplasmático S4–S5, glicina 1275 y asparagina 1281 ubicados en el segmento S6, sobre la inactivación lenta del canal de sodio de músculo esquelético de rata $Na_v1.4$ mediante mutagénesis de sitio y registros electrofisiológicos.

4. HIPÓTESIS

La inactivación lenta en el canal de sodio sensible a voltaje $rNa_v1.4$ involucra a las estructuras del poro (asa–P) y el segmento S6 del domino D–III, en un proceso de inactivación semejante a la inactivación tipo C.

5. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que las estructuras del asa intracelular S4–S5, asa–P y segmento S6 del dominio D–III están relacionadas con la inactivación lenta y participan de forma independiente a la inactivación rápida en el canal de sodio $rNa_v1.4$.

5.1 Objetivos particulares

1. Caracterizar los efectos electrofisiológicos de las mutaciones de lisina 1237 a arginina, cisteína, alanina y ácido glutámico.

2. Determinar si G1148P del segmento S4 – S5, DIII afecta la inactivación del canal de sodio.

3. Determinar si G1275P del segmento S6 – DIII afecta la inactivación lenta.

4. Describir los efectos electrofisiológicos del mutante N1281A del segmento S6 – DIII sobre la inactivación lenta.

5. Determinar si los procesos de inactivación rápida y lenta son independientes mediante la caracterización electrofisiológica de una canal de sodio carente de IFM.

6. Caracterizar el efecto electrofisiológico de la mutante K1237E sobre el canal de sodio carente de IFM.

7. Caracterizar el efecto electrofisiológico de la subunidad β1 en las mutantes obtenidas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Mutagénesis dirigida sitio específica

Para la mutagénesis de sitio se utilizó el kit QuikChange II XL site-directed mutagenesis (No. 200521 Agilent Technologies Inc.) y se siguieron las especificaciones marcadas en el mismo.

6.1.1 Diseño de los oligonucleótidos con las respectivas mutaciones.

El kit especifica algunas características que debe cumplir el oligonucleótido tales como: un tamaño de entre 25 y 45 nucleótidos, un promedio de 10 a 15 bases a cada lado de la mutación de interés, una temperatura de fusión (Tm) de hasta 78°C, un porcentaje óptimo de 40% en contenido de GC (Guanina-Citosina), además que el oligonucleótido termine en una o más bases G o C.

Para realizar esto, se utilizó la secuencia de ARNm del canal $rNa_v1.4$ (NCBI–M26643) clonado en el vector pGW1H, en el que se localizó el codón responsable de traducir el aminoácido glicina 1148, lisina 1237 del anillo DEKA, glicina 1275 y asparagina 1281; de esta forma se pudieron diseñar los oligonucleótidos mutagénicos.

Posteriormente, se hizo la valoración de los oligonucleótidos, haciendo combinaciones en el número de nucleótidos a cada lado del codón de interés, esta valoración se realizó en el programa Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com/calc/analyzer) el cual muestra los valores de %GC, Tm y horquillas formadas entre otras características.

6.1.2 Procedimiento de mutagénesis

El procedimiento se basó en una reacción de PCR usando una ADN polimerasa de alta potencia y comprende las siguientes etapas;

Etapa 1: PCR

En la tabla 1 se muestran los reactivos que se utilizaron, así como los volúmenes para cada reacción de mutación.

Tabla 1: Condiciones de la mezcla de mutagénesis.

Control PCR		Muestra PCR	
Reactivo	µL	Reactivo	µL
Buffer 10x	5	Buffer 10x	5
DNA Plasmídico	2	pGW1H / µ1 (10 ng/µL)	*X*
Primer 1	1.25	Forward (100 ng/µL)	*X*
Primer 2	1.25	Reverse (100 ng/µL)	*X*
dNTP mix	1	dNTP mix	1
Quik solution	3	Quik solution	3
H_2O estéril	36.5	H_2O estéril	*X*
Polimerasa pfu Turbo	1	Polimerasa pfu Turbo	1
Volumen total	50	Volumen total	50

Los parámetros para el termociclador se muestran en la tabla 2:

Tabla 2: Condiciones del termociclador

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	1 minuto
2	18	95°C	50 segundos
		60°C	50 segundos
		68°C	15 minutos
3	1	68°C	7 minutos

Una vez terminada la PCR, las muestras se colocaron en hielo por 2 minutos y posteriormente se guardaron a –20ºC.

Etapa 2: Digestión con la enzima *DpnI*

Se hizo una digestión con la enzima *DpnI* para eliminar las cadenas parentales metiladas, por lo tanto se adicionó 1.5 µL de *DpnI* a la muestra y al control, se mezcló por pipeteo y se centrifugó 1 minuto a 3000 rpm.

Las muestras se incubaron a 37°C por 2 horas. Después del tiempo de incubación se guardaron a –20°C.

Etapa 3: Transformación

Se descongelaron en hielo las bacterias competentes One Shot® TOP10 *E. coli* (TermoFisher Scientific – Cat. 4040–10) y las muestras de PCR.

Se colocaron 100 µL de bacterias One Shot® en 2 tubos eppendorf de 1.5 mL estériles. Se adicionaron en el control 100 µL de buffer TCM (6.7 mM Tris-HCl pH 7.6, 6.7 mM $CaCl_2$ y 6.7 mM $MgCl_2$). Posteriormente al tubo de muestra se le adicionan 2 µL de la digestión ADN/*DpnI* y 98 µL de buffer TCM.

Se mezcló el contenido y se colocó en hielo por 40 minutos. Transcurrido el tiempo, se hizo el choque térmico colocando las muestras en baño maría a 42°C por 2 minutos, cuidando el tiempo y temperatura ya que este paso es crítico para la transformación.

Se colocaron los tubos en hielo por 90 segundos y posteriormente se le adicionaron a cada uno 500 µL de medio LB Broth (SIGMA – Cat. L3022), los cuales se incubaron a 37°C por una hora con agitación (225-250 rpm).

Terminada la incubación, se centrifugaron los tubos a 6,000 rpm por 5 minutos. Se eliminaron 600 µL del sobrenadante y con el resto, se resuspendió el botón de bacterias One Shot® transformadas.

Se tomaron 100 µL de la mezcla y se colocaron en placas LB Broth con 100 µg/mL de ampicilina y se distribuyeron por estriado. Las placas se incubaron a 37°C por 12 horas.

a) Preparación del medio LB-Broth

Para la preparación de 200 mL de medio se pesaron 4 gramos del medio LB-Broth (SIGMA– Cat. L3022) y se disolvieron en un volumen aproximado de 185 mL de agua destilada con agitación constante.

Una vez disuelto completamente el medio, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1N y se aforó a 200 mL.

Se colocaron 100 mL de medio LB-Broth en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con su respectivo tapón y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 1 Kg/cm^2 de presión.

b) Placas LB-agar con ampicilina

Una vez preparado el medio LB-Broth (SIGMA– Cat. L3022) y ajustado el pH a 7 se agregaron 3 gramos de Agar Select por cada 200 mL de medio LB-Broth. Se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 1 Kg/cm^2 de presión, una vez esterilizado el medio, se descongeló la ampicilina stock, que está a una concentración de 100 µg/µL. Se esperó un tiempo para llevar el medio a una temperatura de 37ºC y se agregaron 200 µL de ampicilina para obtener la concentración deseada de 100 µg/mL. Se agitó y se vertió en las placas, las cuales se colocaron en refrigeración hasta su utilización.

6.2 Extracción de ADN plasmídico por ebullición (mini-prep)

La presencia de colonias indica que la transformación funcionó, sin embargo, para saber si se transformaron con el plásmido correcto, se aisló el ADN plasmídico mediante mini-preparación, para esto, cinco colonias se inocularon por separado en tubos falcón de 15 mL, conteniendo 3 mL de medio LB-Broth (SIGMA) con 3 µL de ampicilina (100 µg/µL). Los 5 tubos se colocaron en una incubadora con agitación a 225-250 rpm a 37°C, durante 20 horas.

Se preparó lisozima (10 mg/mL), pesando 10 mg en 1 mL de agua estéril que se disolvieron mediante agitación en vortex. Ésta se colocó en hielo hasta su utilización.

Se tomaron 2 mL de bacterias de cada tubo y se colocaron en un tubo eppendorf estéril, el resto del cultivo se guardó a 4°C para su posterior utilización. Los 5 tubos eppendorf se centrifugaron durante 5 minutos a 5,000 rpm para posteriormente eliminar el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con 300 µL de STET (4% Sacarosa, 5% Triton 100X, 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 7.4), y se adicionaron 50 µL de lisosima a una concentración de 10 mg/mL y se mezcló por inversión.

Una vez hecha la mezcla, se colocaron los tubos eppendorf en agua hirviendo durante 1 minuto. Después se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Terminada la centrifugación, se eliminó la pastilla con un palillo de dientes estéril y se adicionaron 300 µL de isopropanol y se agitó en vortex.

Se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos, después se elimina el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos para después eliminar el sobrenadante y se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Una vez seca la pastilla, se resuspendió en 50 µL de TE pH 8.0 y finalmente se determinó la concentración agregando 10 µL de ADN plasmídico en 1 mL de agua estéril y en un espectrofotómetro se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm. Una preparación pura de ADN da una relación A_{260}/A_{280} de 1.4 a 2.

Aplicando la siguiente formula, se obtuvo la concentración del plásmido en µg / µL:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{Volumen\ total}{Volumen\ de\ muestra}$$

$$\text{ADN (µg / µL)} = \frac{Factor\ de\ dilución\ (Abs.260nm)(50)}{1000}$$

Dónde: 50 es el factor de conversión para ADN (50 µg ADN = 1 OD a 260 nm)

1000 volumen de la celda.

6.3 Propagación de los plásmidos mutados

De los cultivos de las minipreps que dieron el patrón de restricción correcto, se hizo un pre-cultivo; para esto 2 mL de medio líquido LB Broth (SIGMA) se colocaron en un tubo estéril de 15 mL. Se agregaron 2 µL de ampicilina [100 µg/µL] para tener una concentración final de 100 µg/mL; después se adicionó 1 mL del cultivo de la miniprep que cumplió el patrón de restricción. Esté se incubó con agitación a 225-250 rpm a 37ºC durante 20 horas, transcurrido el tiempo, a dos matraces con 100 mL de medio LB-Broth y ampicilina [100 µg/mL], se les adicionaron 1.5 mL del pre-cultivo a cada uno y se incubaron con agitación a 225-250 rpm a 37ºC durante 20 horas.

6.4 Extracción del ADN plasmídico

Antes de la extracción del ADN plasmídico se colocaron en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL, 150 µL de glicerol estéril y 850 µL de bacterias transformadas, se re suspendieron y se colocaron en hielo por 20 minutos y posteriormente se guardaron a –80°C.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el Kit Hi Speed Plasmid Midi (No. 12643, QIAGEN). En 6 tubos de 30 mL se distribuyó el contenido de los dos matraces, para posteriormente centrifugarse a 5 000 rpm por 8 minutos a una temperatura de 4°C.

Una vez terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se agregaron 6 mL de buffer de re suspensión, distribuidos en los 6 tubos y se resuspendió la pastilla de células de cada tubo y después de esta etapa, el contenido de los 6 tubos se colocó en un solo tubo.

Se adicionaron 6 mL de buffer de lisis y se mezclaron hasta obtener una mezcla de color azul la cual se dejó en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron 6 mL del buffer de neutralización y se mezcló por inversión hasta que la coloración azul desapareció, esta suspensión se transfirió a una jeringa con filtro y tapón, y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Durante la incubación se equilibró la columna Hi Speed Midi con 4 mL de buffer de equilibrio QBT, una vez transcurridos los 10 minutos se removió la tapa del filtro Cartridge, se insertó el émbolo y se filtró el lisado celular dentro de la columna Hi Speed Midi.

Posteriormente se lavó la columna Hi Speed Midi con 20 mL de buffer QC. Una vez que el contenido pasó por la columna se recuperó el ADN que esta adherido a la resina de la columna con 5 mL de buffer de elusión QF en un tubo de 15 mL.

Se precipitó el ADN adicionando 3.5 mL de isopropanol, se agitó en el vortex y se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente.

Durante la incubación se quitó el émbolo de la jeringa de 20 mL y se colocó el filtro precipitador QIA Midi, una vez que pasó el tiempo de incubación, se transfirió la mezcla ADN/isopropanol a la jeringa, y se filtró. Después se removió el filtro precipitador QIA Midi. Se colocó nuevamente el filtro precipitador QIA Midi y se lavó con 2 mL de etanol al 70%. Nuevamente se removió el filtro precipitador QIA Midi, se sacó el émbolo y se colocó el precipitador QIA Midi para introducir aire y de esta forma secar el filtro.

Se quitó el émbolo de la jeringa de 5 mL y se colocó el precipitador QIA Midi, agregando 500 µL de buffer TE, se colocó el émbolo y se recuperó el ADN plasmídico en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, este paso se repitió dos veces.

Finalmente, se determinó la concentración, agregando 10 µL de ADN plasmídico en 1 mL de agua estéril y midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro. La concentración se obtiene como se mencionó anteriormente.

6.5 Verificación de las mutaciones

6.5.1 Diseño de oligonucleótidos para la secuenciación

Para verificar el cambio del aminoácido de interés en el canal, se diseñaron y mandaron a sintetizar un par de oligonucleótidos, uno sentido y otro anti-sentido, para cada aminoácido mutado, considerando 300 bases a cada lado de la mutación. Se consideraron los siguientes

parámetros para su diseño: una longitud de 25 a 30 pb, una Tm de 60°C, un porcentaje de 50% en contenido de GC y el mínimo de horquillas posible. Estos diseños fueron evaluados en el programa Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com/calc/analyzer). Estos oligonucleótidos se diseñaron para obtener un fragmento entre 600 y 800 pb.

Las muestras se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología, UNAM, Morelos. Una vez que se obtuvo el electroferograma, se editó mediante el programa BioEdit (BioEdit Sequence Aligment Editor, Tom Hall) , y la secuencia se alineó con la secuencia del canal nativo $rNa_v1.4$, para corroborar que se ha introducido la respectiva mutación.

6.6 Determinación de la funcionalidad de los canales mutados

6.6.1 Técnica de expresión de canales iónicos en ovocitos de rana *Xenopus laevis*

Soluciones

- Solución OR-2 (en mM): NaCl 82.5; KCl 2.5; $MgCl_2$ 1; HEPES 5, para la digestión enzimática se adiciona colagenasa 1.3 mg/ml (tipo 1A, Sigma), pH 7.6 (Li, Galue et al. 1999).
- Solución ND-96 (en mM): NaCl 96; KCl 2.5; $MgCl_2$ 1; $CaCl_2$ 1.8; HEPES 5; ácido pirúvico 5; teofilina 0.5; gentamicina 50 µg/ml, pH 7.6 (Sah, Tsushima et al. 1998).
- Solución para registro (en mM): NaCl 96; KCl 2.5; $MgCl_2$ 1; $BaCl_2$ 1; HEPES 5, pH 7.6 (Li, Galue et al. 1999).

Obtención de ovocitos: la rana *Xenopus laevis* (Xenopus 1; Ann Arbor, MI. USA) se anestesió por inmersión (20 minutos) en una solución de Tricaína (0.2% de ácido 3-aminobenzoico etil-ester tricaina; Sigma Chemical Co., St Louis, MO); una vez anestesiada se sometió a una cirugía abdominal para obtener los lóbulos ováricos que contienen a los ovocitos.

Cirugía: se realizó una pequeña incisión de ~3 mm en el abdomen, se removieron secciones de los lóbulos ováricos cortando porciones pequeñas de ~1 cm, para colocarlas en una caja Petri que contenía solución OR-2. Durante todo el transcurso de la cirugía la rana se mantuvo en una cama fría y constantemente fue humectada con solución OR-2.

Proceso enzimático: los lóbulos ováricos se colocan en tubos de ensayo que contienen colagenasa disuelta en solución OR-2 (tipo 1A Sigma, 1.3 mg/ml). Se realizan tres periodos de agitación mecánica (en forma orbital) dos periodos de 30 min y uno de 15 min con lavado

(solución OR-2) y cambio de solución enzimática entre los periodos. Dicho proceso permite separar a los ovocitos de los lóbulos ováricos y remover el tejido folicular que recubre a cada ovocito. Después de la digestión enzimática los ovocitos se colocan en una caja Petri con solución ND-96.

Selección de ovocitos: se seleccionan sólo los ovocitos que tengan una forma esférica bien definida con una división clara entre ambos polos (animal y vegetal), y un diámetro ~1 mm (diámetro que corresponde a los estadios V y VI, ovocitos maduros).

Micro Inyección de ovocitos: Para la micro inyección del ADN plasmídico se utiliza la técnica de inyección intranuclear empleando un microinyector automático (Nanoliter 2000 Pump-head y Micro4^{TM} pump controller, WPI, Sarasota, FL. USA).

Los ovocitos seleccionados son inyectados con ADN plasmídico nativo y mutado (por separado) que codifica para la subunidad α del canal rNa$_v$1.4 de músculo esquelético de rata (1.2 a 1.5 ng en 30 nL). Posteriormente los ovocitos son incubados en la solución ND-96 a 18°C hasta su registro.

6.6.2 Registro electrofisiológico

Los registros se desarrollan en ovocitos de 18 a 24 hrs post inyección a temperatura ambiente (22-23°C) utilizando la técnica de fijación de voltaje con doble microelectrodo (Methfessel y cols., 1986); para el registro de la corriente de sodio (I_{Na+}) se utiliza un amplificador Warner OC-725C (Warner Intrument Corp., Hamden, CT. USA) el cual se comanda mediante el programa pClamp8 (Axon Instrument, Union City, CA. USA). Los electrodos (TW120F-6, WPI, Sarasota, FL. USA) se llenan con KCl 3M, teniendo una resistencia final de 0.5 a 1 MΩ (Schreibmayer y cols., 1994).

6.7 Funcionalidad de los canales mutados mediante la micro-inyección y expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Con el propósito de comprobar que la corriente observada al realizar los registros electrofisiológicos se debía a la inyección intranuclear de los ADNc que codifican para los distintos canales de sodio mutados se llevaron a cabo registros en ovocitos que no recibieron inyección con ADNc. En la figura 12 es posible apreciar que tanto en el ovocito que no recibió

inyección (figura 12A), como el que fue inyectado con el vehículo para el ADNc (agua inyectable; figura 12B), solo se observaron las corrientes capacitivas que indican el proceso de carga y descarga de la membrana. Del mismo modo, no hubo cambio en el potencial de reposo del ovocito y una corriente de fuga menor a 0.1.

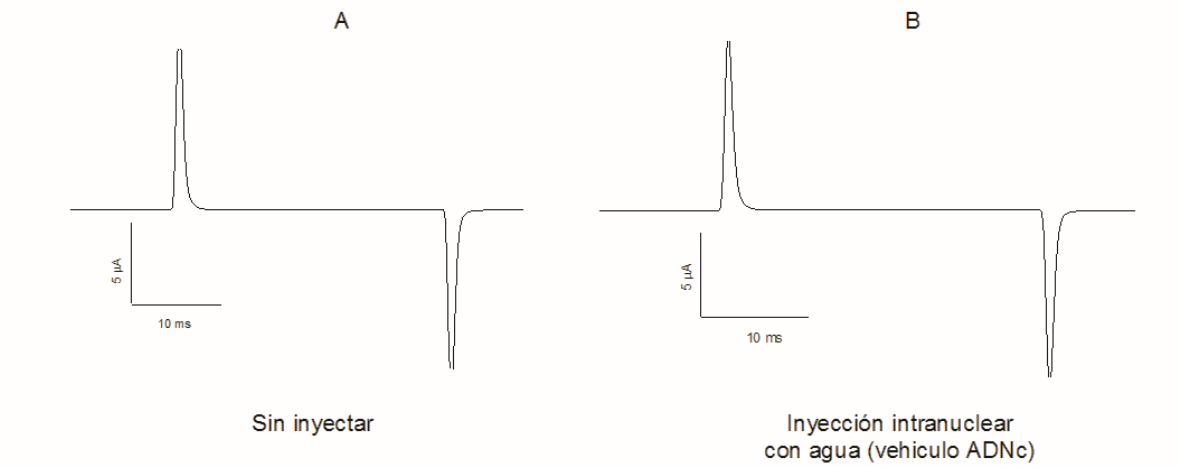


Figura 12: Registros control en ovocitos que no recibieron inyección de ADNc para expresar canales de sodio nativo o mutado. Se observan las corrientes capacitivas en A) Ovocito sin inyectar, B) Ovocito inyectado con el vehículo para el ADNc (agua inyectable). En ambos casos se aplicaron pulsos despolarizantes a –20 mV partiendo del potencial de reposo –100 mV.

Por otro lado, cuando los ovocitos se inyectaron en el núcleo con ADNc para expresar canales $Na_v1.4$, se observaron corrientes iónicas de Na^+ además de las corrientes capacitivas que se muestran en la figura 12A. Para demostrar que las corrientes observadas fueron producidas por el flujo de iones Na^+ a través de los canales, se realizaron registros en los que el Na^+ 96 mM de la solución de registro fue sustituido por 90 mM de cloruro de tetraetil – amonio (0 Na^+) y se aprecia que la corriente iónica desapareció (figura 12B).

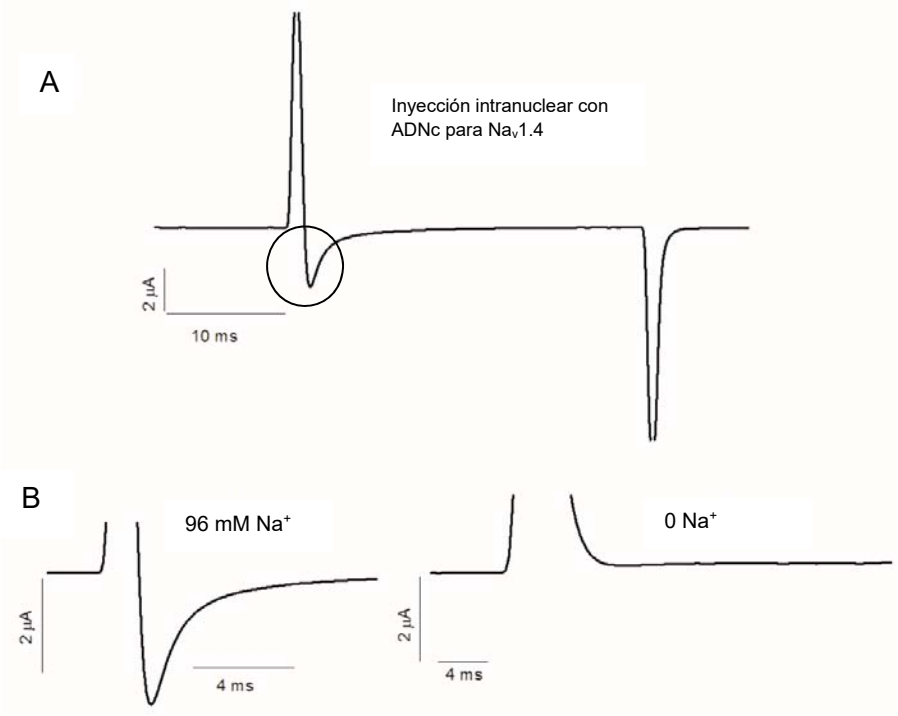


Figura 13: Registros control representativos en ovocitos que fueron inyectados para expresar canales $Na_v1.4$. A) Registro donde se aprecian las corrientes capacitivas de la membrana y la corriente de sodio (encerrada en un círculo) en un ovocito que expresó canales $Na_v1.4$. B) Izquierda: cuando hay Na^+ en la solución de registro; derecha: cuando se elimina el sodio en la solución de registro (0 Na^+) desaparece la corriente.

6.8 Protocolos experimentales y análisis de datos

Todos los protocolos experimentales son aplicados en condiciones control (96 mM Na^+) para cada mutante.

La perfusión de la solución se realiza utilizando un sistema de perfusión (Val404®, CIDES Tecnología, México).

Para generar la corriente de Na^+ en el ovocito se aplica un protocolo de pulsos despolarizantes partiendo de un potencial de sostenimiento de -100 mV hasta +50 mV en incrementos de 10 mV con una duración de 30 ms. Para construir la relación corriente contra voltaje (Curva I – V) se mide la magnitud del pico de la corriente generada en cada paso de voltaje y se normaliza contra el pico máximo de la corriente obtenida; estos valores son graficados en función del potencial de membrana. Esto nos permite observar la dependencia de voltaje en la activación del canal.

Para analizar la inactivación de estado estable se emplea un protocolo convencional de doble pulso. Este protocolo parte de un potencial de sostenimiento de -100 mV y se aplican pulsos condicionantes con duración de 1s de -120 a +20 mV con incrementos de 10 mV, cada pulso es seguido por un pulso de prueba a -20 mV con duración de 25 ms. Para obtener la relación de estado estable se mide la magnitud del pico de la corriente generada por el pulso de prueba y se grafica en función del potencial de membrana del pulso condicionante; los datos normalizados son ajustados utilizando la ecuación de Boltzmann:

$$y = \frac{A_1}{1 + e^{(V - V_{1/2})/k}} + A_2$$

donde $V_{1/2}$ es el voltaje en el cual se alcanza el 50% de canales inactivados, *k* es la pendiente, A_1 es la amplitud de la relación y A_2 es la amplitud del componente cuando no inactiva.

Los efectos sobre la conductancia al Na^+ se analizan calculando la g_{Na+} a partir de los datos obtenidos de la relación corriente contra voltaje. Los puntos mostrados en las gráficas de conductancia se obtienen usando la siguiente ecuación:

$$g_{Na^+} = \frac{I_{Na^+}}{(E_m - E_{Na^+})}$$

donde g_{Na+} es la conductancia de la membrana al Na^+, I_{Na}^+ es el pico de corriente correspondiente a cada valor del potencial de membrana (E_m), y E_{Na}^+ es el potencial de equilibrio del Na^+ (se toma el valor experimental del control y en cada mutante). Los datos obtenidos son normalizados con respecto a la conductancia máxima (g_{max}) y ajustados mediante la ecuación de Boltzmann.

La recuperación de la inactivación de la I_{Na+} se estudia mediante un protocolo de doble pulso. En estos experimentos la I_{Na+} se inactiva por la aplicación de un pulso condicionante de 500 ms a –20 mV partiendo de un potencial de sostenimiento de –100 mV y posteriormente se retorna al potencial de sostenimiento durante un periodo de tiempo variable (Δt) antes de aplicar un segundo pulso (pulso de prueba) a –20 mV durante 20 ms. El curso temporal de la recuperación de la inactivación se determina midiendo la relación de la amplitud de la I_{Na+} generada durante la aplicación del pulso de prueba entre la magnitud de la I_{Na+} generada durante la aplicación del pulso condicionante, esta relación es graficada en función del Δt. Los datos graficados se ajustan mediante una función exponencial doble:

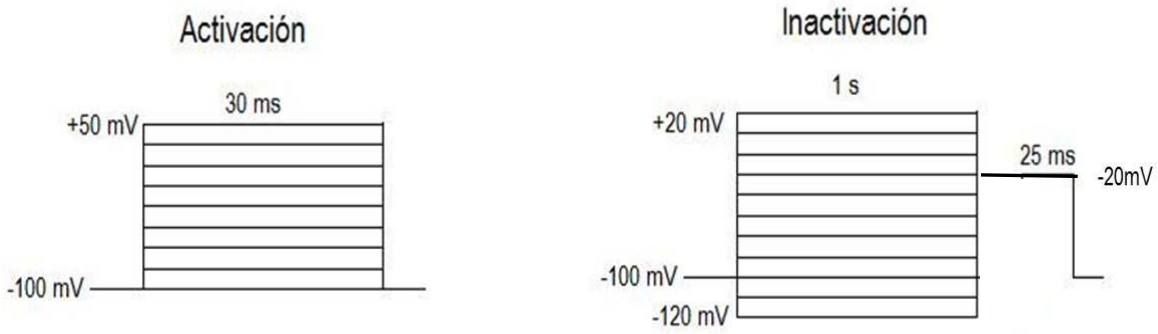
$$y = A_1 e^{-x/\tau_1} + A_2 e^{-x/\tau_2}$$

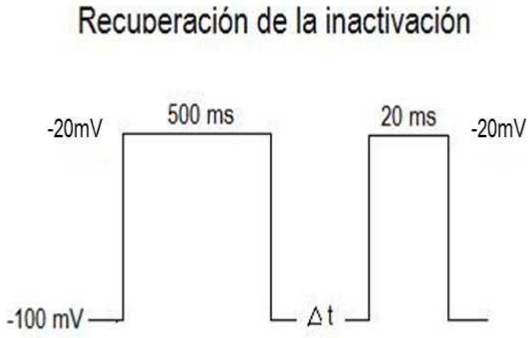
donde $A_{1,2}$ es la amplitud; τ_1 y τ_2 son las constante de tiempo de recuperación rápida y lenta, respectivamente.

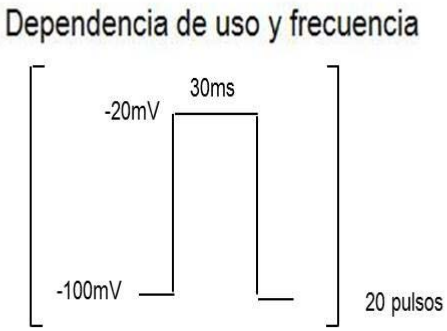
Para estudiar la dependencia de uso y frecuencia se utiliza un protocolo que consiste en la aplicación de trenes de estimulación de 20 pulsos partiendo de un potencial de sostenimiento de –100 mV hasta –20 mV con una duración de 30 ms. Estos trenes de estimulación se aplican a tres diferentes frecuencias: 1Hz, 2Hz y 5Hz. La frecuencia se analizada midiendo la relación de cada pico de corriente generada entre el pico de corriente generada por el pulso número 1 del tren de estimulación; este procedimiento se utiliza para cada una de las frecuencias. Los datos obtenidos se grafican en función del número de pulsos.

Todas las gráficas y ajustes se realizan mediante los programas OriginPro7 (OriginLab Corp. Northampton, MA, USA) y SigmaPlot 8.02 y 9 (SPSS Inc., Chicago, Il. USA). Todos los datos se presentan como la media ± esm. de una n que se indica en cada gráfica. La significancia de la diferencia entre medias se obtiene con la prueba t-student pareada. Se considera estadísticamente significativa cuando $p< 0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$.

6.8.1 Protocolos de estimulación







7. RESULTADOS

La expresión de canales en la membrana de los ovocitos de *Xenopus laevis*, es un sistema muy útil para los estudios electrofisiológicos ya que los efectos pueden ser observados en una población homogénea de canales. Los canales de sodio de músculo esquelético de rata, en nuestros experimentos, fueron expresados en la membrana celular del ovocito, mostrando propiedades funcionales y similares a las del canal original.

En este trabajo se presentan diferentes herramientas electrofisiológicas, que ayudaron a dilucidar el posible mecanismo de inactivación.

Posteriormente, con la cristalización del canal de sodio bacterial de *Arcobacter butzleri* (Na_vAb), *Bacillus halodurans* (NaChBac) y *Rickettsiales sp. HIMB114* denotado Rh (Na_vRh), los estudios sobre activación, inactivación y farmacología en estos canales mostraron la posibilidad de conservación de aminoácidos involucrados en la inactivación lenta, considerando que estos canales carecen del péptido de inactivación IFM, al realizar un alineamiento con la finalidad de observar esa conservación de aminoácidos, fueron notables la presencia de glicinas en el asa citoplasmática S4 – S5, S5 y S6, y la conservación de asparaginas en el S6 de los cuatro dominios.

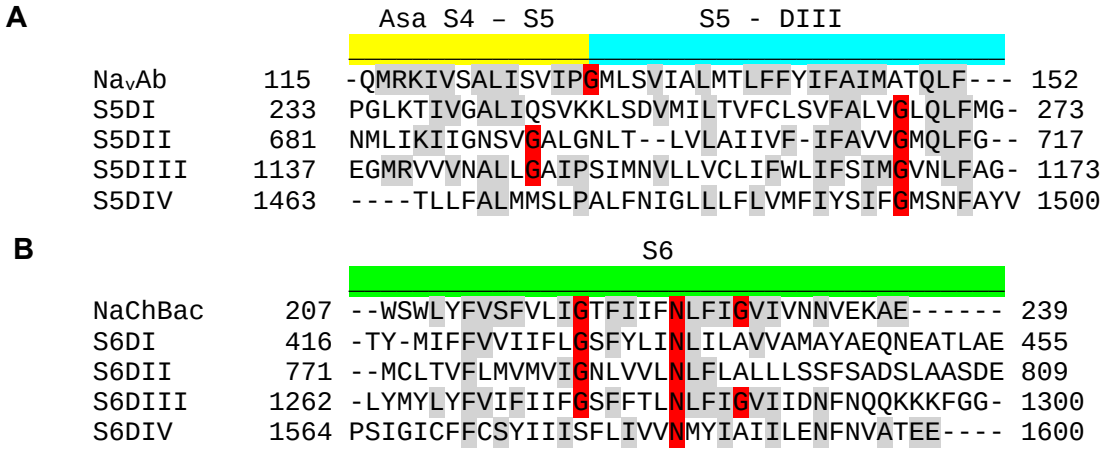


Figura 14: Alineamiento comparativo de las secuencias bacteriales en **A)** *Arcobacter butzleri* (Na_vAb) comparando con el asa intracelular S4–S5 y segmento S5, y en **B)** *Bacillus halodurans* (NaChBac) con sus semejantes, el segmento S6, del canal de sodio de músculo esquelético de rata ($rNa_v1.4$). Se muestran en gris los aminoácidos conservados entre el canal de sodio bacterial y el canal $rNa_v1.4$, en rojo los aminoácidos de interés glicina (G) y asparagina (N).

7.1 Mutaciones obtenidas

Los canales iónicos dependientes de voltaje comparten una estructura común, formada por un poro central (PC) y cuatro dominios contiguos con sensor de voltaje (DSV).

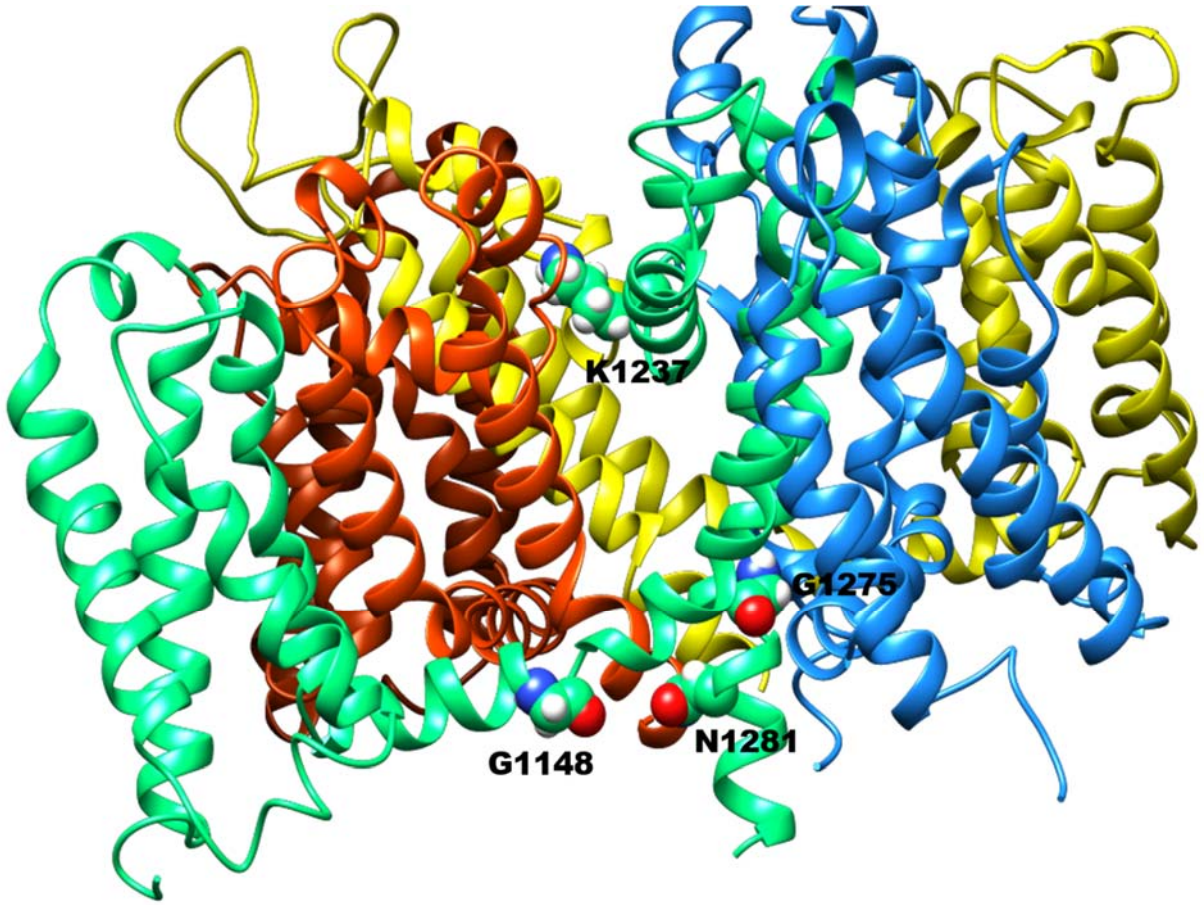


Figura 15: Modelo tridimensional del canal de sodio rNa$_v$1.4. Se muestra en amarillo el dominio I, en azul el dominio II, en verde el dominio III y en naranja el dominio IV. Los aminoácidos mostrados en esferas corresponden a G1148, K1237, G1275 y N1281, los cuales fueron propuestos para su mutación, todos estos se encuentran en el DIII.

El modelo del canal de sodio rNav1.4, en la figura 15, muestra los aminoácidos propuestos para su mutación: G1148P se encuentra en el segmento citoplasmático S4–S5 que conecta el dominio sensor de voltaje (DSV) con el segmento S5 del poro central, las mutaciones de K1237 a A, C, E y R se observa en el asa–P, en el poro central, la mutante G1275P se posiciona en el segmento S6 en una región intermedia del segmento y la mutación del aminoácido N1281A se encuentra en el extremo citoplasmático del segmento S6.

A continuación se muestran los diseños de oligonucleótidos utilizados para las mutaciones y secuenciación de las mismas.

Tabla 3: Oligonucleótidos para mutación.

Secuencia del oligonucleótido para mutación	Tamaño (nt)	GC (%)	Tm (°C)
K1237R	36	52.8	66.4
Fw– CTTCAGGTGGCCACATTCAGAGGTTGGATGGATATC			
Rv– GATATCCATCCAACCTCTGAATGTGGCCACCTGAAG			
K1237A	36	50	65.0
Fw– CTTCAGGTGGCCACATTCGCAGGTTGGATGGATATC			
Rv– GATATCCATCCAACCTGCGAATGTGGCCACCTGAAG			
K1237E	36	50	64.8
Fw– CTTCAGGTGGCCACATTCGATGGTTGGATGGATATC			
Rv– GATATCCATCCAACCATCGAATGTGGCCACCTGAAG			
G1148P	39	59	69.8
Fw– GTGAACGCCCTCCTGCCTGCTATCCCCTCCATCATGAAC			
Rv– GTTCATGATGGAGGGGATAGCAGGCAGGAGGGCGTTCAC			
G1275P	29	48.3	60.3
Fw– CTTCATCATCTTCCCTTCCTTCTTCACCC			
Rv– GGGTGAAGAAGGAAGGGAAGATGATGAAG			
N1281A	29	55.2	63.6
Fw– CTTCTTCACCCTCGCACTCTTCATCGGTG			
Rv– CACCGATGAAGAGTGCGAGGGTGAAGAAGG			
ΔIFM	34	47.1	62.6
Fw– GAAGTTTGGAGGGAAAGACA–CAGAGGAACAGAAG			
Rv– CTTCTGTTCCTCTG–TGTCTTTCCCTCCAAACTTC			

Tabla 4: Oligonucleótidos para secuenciación

Secuencia del oligonucleótido para secuenciación	Tamaño (nt)	GC (%)	Tm (°C)
K1237			
Fw - GTCTGCCTCATCTTCTGGCTCATCTT	26	50	60.3
Rv - CCTCTGTCATGAAGATGTCTTTCCCTCC	28	50	60.1
G1148P			
Fw - TCTACATTGAACAGCGACGAGTCATCC	27	48.1	60.0
Rv - ATAGTGTGGCTGCTCCTCTTTCTCC	25	52	60.2
G1275P – N1281A			
Fw - GGAAAGTTCTACTACTGCGTCAACACC	27	48.1	59.1
Rv - CAAACATCTTCAGCACACACTCCC	24	50	58.3
ΔIFM			
Fw - GTCTGCCTCATCTTCTGGCTCATCTT	26	50	60.3
Rv - AGGGCAAACATCTTCAGCACACAC	24	50	60.1

A continuación se muestran los alineamientos de las secuencias de mutantes obtenidas comparadas con la secuencia del canal nativo obtenido por Trimmer y cols., 1989 (GenBank:

M26643). La secuencia nucleotídica corresponde a un fragmento del empalme entre los oligonucleótidos de secuenciación.

Secuenciación de K1237R

```
rNav1.4         CGCTGGATGAATGTCAAGGTCAACTACGACAACGTGGGTCTGGGCTATCTCTCCCTCCTT 4140
K1237R          CGCTGGATGAATGTCAAGGTCAACTACGACAACGTGGGTCTGGGCTATCTCTCCCTCCTT 493
                ************************************************************

rNav1.4         CAGGTGGCCACATTCAAGGGTTGGATGGATATCATGTATGCAGCTGTGGACTCCCGGGAG 4200
K1237R          CAGGTGGCCACATTCAGAGGTTGGATGGATATCATGTATGCAGCTGTGGACTCCCGGGAG 553
                ***************..*****************************************

rNav1.4         AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 4260
K1237R          AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 613
                ************************************************************
```

Secuenciación de K1237A

```
rNav1.4         CGCTGGATGAATGTCAAGGTCAACTACGACAACGTGGGTCTGGGCTATCTCTCCCTCCTT 4140
K1237A          CGCTGGATGAATGTCAAGGTCAACTACGACAACGTGGGTCTGGGCTATCTCTCCCTCCTT 490
                ************************************************************

rNav1.4         CAGGTGGCCACATTCAAGGGTTGGATGGATATCATGTATGCAGCTGTGGACTCCCGGGAG 4200
K1237A          CAGGTGGCCACATTCGCAGGTTGGATGGATATCATGTATGCAGCTGTGGACTCCCGGGAG 550
                ***************  *****************************************

rNav1.4         AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 4260
K1237A          AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 610
                ************************************************************
```

Secuenciación de K1237E

```
rNav1.4         TCCGCTGGATGAATGTCAAGGTCAACTACGACAACGTGGGTCTGGGCTATCTCTCCCTCC 4140
K1237E          TCCGCTGGATGAATGTCAAGGTCAACTACGACAACGTGGGTCTGGGCTATCTCTCCCTCC 489
                ************************************************************

rNav1.4         TTCAGGTGGCCACATTCAAGGGTTGGATGGATATCATGTATGCAGCTGTGGACTCCCGGG 4200
K1237E          TTCAGGTGGCCACATTCGATGGTTGGATGGATATCATGTATGCAGCTGTGGACTCCCGGG 549
                ****************.* ***************************************

rNav1.4         AGAAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCT 4260
K1237A          AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 609
                ************************************************************
```

Secuenciación de G1148P

```
rNav1.4          TACTCTGAGCTGGGGCCCATCAAATCCCTGCGCACACTCCGGGCCCTGCGACCTCTGAGG 3840
G1148P           TACTCTGAGCTGGGGCCCATCAAATCCCTGCGCACACTCCGGGCCCTGCGACCTCTGAGG 222
                 ************************************************************

rNav1.4          GCACTGTCTCGATTTGAGGGTATGAGGGTGGTGGTGAACGCCCTCCTGGGAGCTATCCCC 3900
G1148P           GCACTGTCTCGATTTGAGGGTATGAGGGTGGTGGTGAACGCCCTCCTGCCTGCTATCCCC 282
                 ************************************************  :*********

rNav1.4          TCCATCATGAACGTCCTCCTCGTCTGCCTCATCTTCTGGCTCATCTTCAGCATCATGGGG 3960
G1148P           TCCATCATGAACGTCCTCCTCGTCTGCCTCATCTTCTGGCTCATCTTCAGCATCATGGGG 342
                 ************************************************************
```

Secuenciación de G1275P

```
rNav1.4          AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 4260
G1275P           AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 249
                 ************************************************************

rNav1.4          ATCATCTTCGGCTCCTTCTTCACCCTCAACCTCTTCATCGGTGTCATCATCGACAACTTC 4320
G1275P           ATCATCTTCCCTTCCTTCTTCACCCTCAACCTCTTCATCGGTGTCATCATCGACAACTTC 309
                 *********  ********************************************

rNav1.4          AACCAACAGAAGAAGAAGTTTGGAGGGAAAGACATCTTCATGACAGAGGAACAGAAGAAA 4380
G1275P           AACCAACAGAAGAAGAAGTTTGGAGGGAAAGACATCTTCATGACAGAGGAACAGAAGAAA 369
                 ************************************************************
```

Secuenciación de N1281A

```
rNav1.4          AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 4260
N1281A           AAAGAGGAGCAGCCACACTATGAGGTGAACCTCTACATGTACCTCTACTTCGTCATCTTC 251
                 ************************************************************

rNav1.4          ATCATCTTCGGCTCCTTCTTCACCCTCAACCTCTTCATCGGTGTCATCATCGACAACTTC 4320
N1281A           ATCATCTTCGGCTCCTTCTTCACCCTCGCACTCTTCATCGGTGTCATCATCGACAACTTC 311
                 ***************************...*****************************

rNav1.4          AACCAACAGAAGAAGAAGTTTGGAGGGAAAGACATCTTCATGACAGAGGAACAGAAGAAA 4380
N1281A           AACCAACAGAAGAAGAAGTTTGGAGGGAAAGACATCTTCATGACAGAGGAACAGAAGAAA 371
                 ************************************************************
```

Secuenciación de ΔIFM

```
rNav1.4          ATCATCTTCGGCTCCTTCTTCACCCTCAACCTCTTCATCGGTGTCATCATCGACAACTTC 4320
DelIFM           ATCATCTTCGGCTCCTTCTTCACCCTCAACCTCTTCATCGGTGTCATCATCGACAACTTC 469
                 ************************************************************

rNav1.4          AACCAACAGAAGAAGAAGTTTGGAGGGAAAGACATCTTCATGACAGAGGAACAGAAGAAA 4380
DelIFM           AACCAACAGAAGAAGAAGTTTGGAGGGAAAGAC---------ACAGAGGAACAGAAGAAA 520
                 *********************************         ******************

rNav1.4          TACTACAATGCGATGAAGAAGCTTGGCTCCAAGAAGCCCCAGAAGCCAATTCCCCGGCCT 4440
DelIFM           TACTACAATGCGATGAAGAAGCTTGGCTCCAAGAAGCCCCAGAAGCCAATTCCCCGGCCT 580
                 ************************************************************
```

Todas las mutantes propuestas fueron confirmadas por secuenciación, esto permitió asegurar que los canales expresados en la membrana celular del ovocito eran únicamente la población homogénea del canal mutante en cuestión obtenidas de la inyección del DNAc.

7.2 El canal de sodio rNa$_v$1.4 sin la subunidad β1

7.2.1 Efecto de las mutantes sobre la activación

Los ovocitos de *Xenopus laevis* expresaron canales nativos y mutantes que respondieron a la activación por voltaje (Fig. 16A, B y C), comparable con otros sistemas de expresión en células de mamífero (Balser, Nuss et al. 1996, Catterall, Goldin et al. 2005). Los trazos mostrados fueron obtenidos partiendo de un potencial de sostenimiento a –100 mV con pulsos despolarizantes de 10 mV, hasta +50 mV. Se muestran los trazos crudos del canal rNa$_v$1.4 (Fig. 16A), la mutación K1237C (Fig. 16B) y G1275P (Fig. 16C).

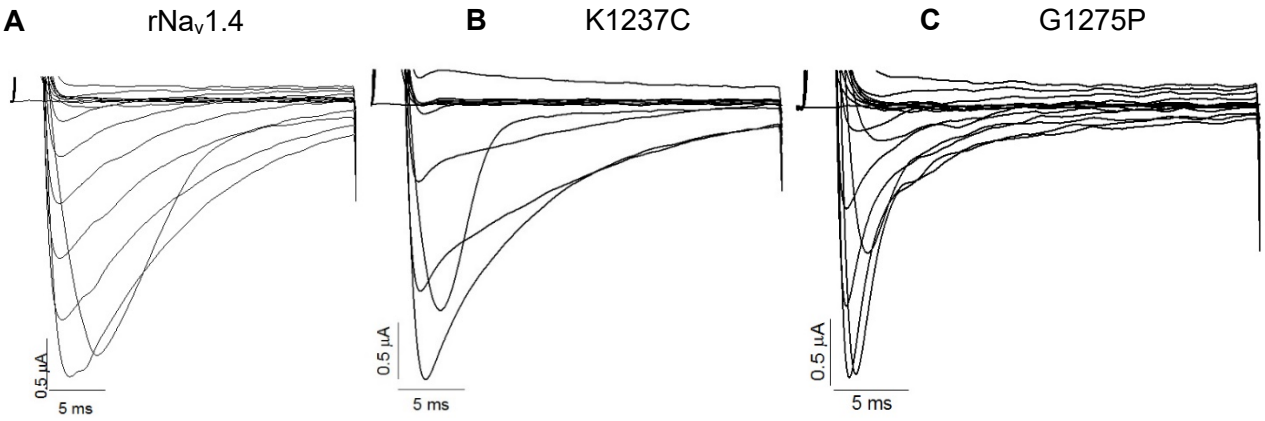


Figura 16: Efecto de las mutaciones en el dominio DIII sobre las corrientes de Na^+. Corrientes obtenidas a diferentes voltajes partiendo de un potencial de sostenimiento de –100 mV con pulsos despolarizantes cada 10 mV, hasta 50 mV. **A**) canal nativo rNa$_v$1.4, **B**) mutante de lisina 1237 a cisteína, en el anillo DEKA, y **C**) mutante de glicina 1275 a prolina, en el segmento S6 del dominio DIII.

En las curvas de relación corriente–voltaje, la figura 17A muestra la comparación de las mutantes de lisina 1237 contra el canal nativo. Podemos observar que en todas las mutantes se ve afectado significativamente el potencial de inversión, ya que el gráfico muestra que todas las mutantes invierten alrededor de 0 mV, considerando que el nativo invierte en +40 mV.

También, podemos observar que el voltaje de activación en las mutantes es de alrededor de –50 y –40 mV. Y el voltaje de corriente máxima también se ve afectado, ya que muestra

corrientes máximas en voltajes de –40 y –30 mV, en canal de sodio rNa_v 1.4 ha sido reportado voltajes de corriente máxima entre –30 y –20 mV (Catterall, y cols., 2005).

Este cambio en el potencial de inversión (V_{rev}) ya había sido evidenciado por Favre y cols., 1996, su mutante K1237A mostró un cambio en el V_{rev} de 12 ± 3 mV. Por otro lado, Heinemann y cols., 1992, también habían mostrado en el canal neuronal un cambio en el V_{rev} en su mutante K1422E.

Estos autores coinciden que al hacer el cambio de lisina del anillo DEKA por cualquier aminoácido, incluso arginina (R), se pierde la selectividad por Na^+ y hace al canal permeable a cualquier cation presente en las soluciones y el medio intracelular, como K^+, Ca^{+2}, Ba^{+2}, etc. Esto permite que al activarse el canal el flujo de cationes cambie el punto de equilibrio, llevando al canal a un equilibrio prematuro al observado cuando está presente lisina.

Cuando el anillo DEKA es modificado a DECA (K1237C) y DEAA (K1237A), no muestra cambios drásticos en la corriente de salida a los observados cuando está presente una carga ya sea positiva o negativa. Podemos notar en la mutante a arginina (K1237R) un proceso similar a una rectificación cuando llega a 20 mV, esto no había sido observado o comentado por ningún investigador, y lo único que podemos argumentar es un efecto debido a una conservación de carga por el cambio de lisina a arginina y la permeabilidad inespecífica del canal en la corriente de salida, quizás debido a un arreglo estructural en el poro. Un efecto contrario se observa en la mutante K1237E (DEEA), esto hace recordar los primeros experimentos por Heinemann y cols., 1992 asemejando al filtro en canales de Ca^{+2} EEEE, la presencia de 3 cargas negativas en el filtro de selectividad del canal de sodio muestra una mayor corriente saliente a las observadas en las otras mutaciones de lisina.

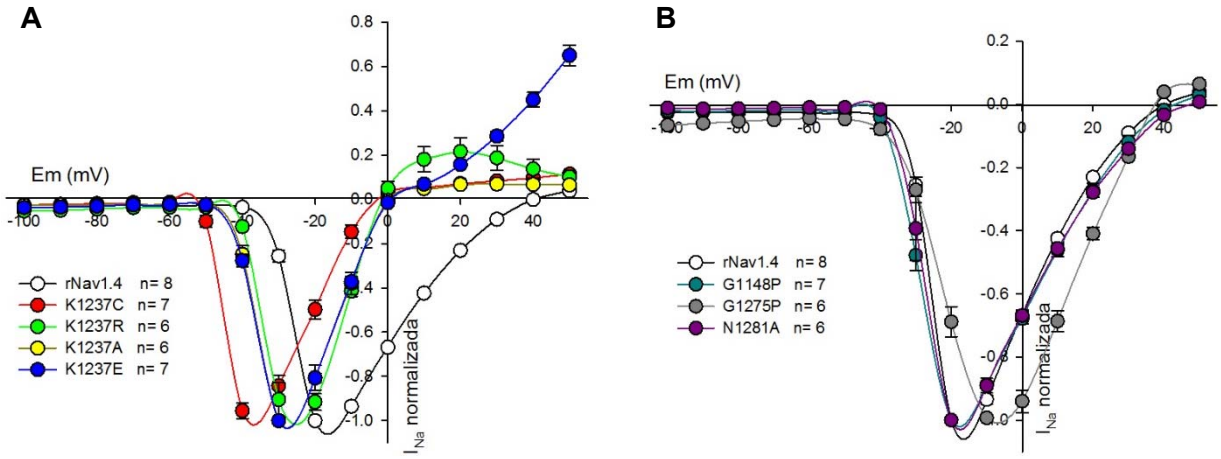


Figura 17: Relación Corriente – Voltaje del canal rNav1.4 y las diferentes mutantes obtenidas. **A**) Efecto de las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA, **B**) Efecto de las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6.

Las mutaciones realizadas en el dominio DIII (Fig. 17B) no muestran cambios significativos en la activación o voltaje de inversión (V_{rev}), sin embargo, la mutación de glicina 1275 a prolina (G1275P) modificó el voltaje de corriente máxima, llevándolo hacia potenciales despolarizantes, cabe mencionar que este desplazamiento no muestra significancia con respecto al canal nativo.

Con la finalidad de observar si los cambios en la activación, voltaje de corriente máxima así como el V_{rev} afectaban la conductancia, construimos las curvas normalizadas de conductancia – voltaje (G–V, Fig. 18). La activación de canales iónicos activados por voltaje es evaluada en base a su respuesta funcional y esto es evidenciada en la relación conductancia – voltaje. El ajuste de datos con la ecuación de Boltzmann, nos permitió obtener y comparar una $V_{1/2}$ de activación así como una pendiente de la curva (Tabla 5).

A pesar de notar un desplazamiento hacia voltajes despolarizantes con las mutantes de lisina 1237 (Fig. 18A), el ajuste de Boltzmann solo muestra cambios significativos en la mutante K1237C con una $V_{1/2}$ de – 44.18±0.84 mV (n= 7, p= 0.05), con respecto al nativo que mostro una $V_{1/2}$ de – 37.39±2.42 mV (n= 8). Este cambio en el $V_{1/2}$ de activación no afecto de manera significativa la pendiente de la curva. No así, en la mutante K1237E, en la cual no observamos un cambio significativo en la $V_{1/2}$ de activación pero si un cambio significativo en la pendiente k (p= 0.05).

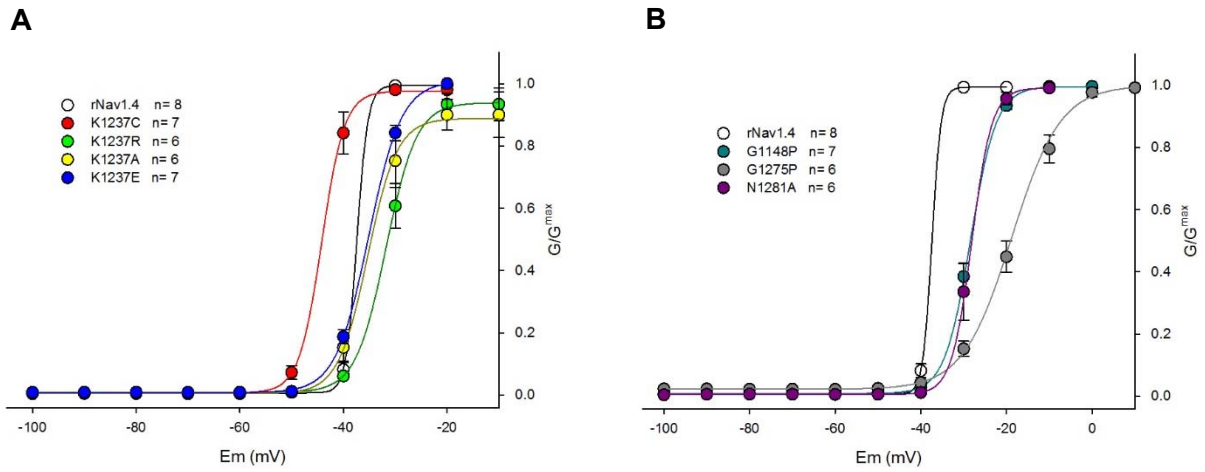


Figura 18: Relación Conductancia – Voltaje del canal rNav1.4 y las diferentes mutantes obtenidas. **A**) Efecto de las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA, y **B**) Efecto de las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6. Las líneas continuas fueron obtenidas del ajuste de Boltzmann. Las barras muestran la media ± el error estándar.

En las mutaciones sobre el asa intracelular S4–S5 y segmento S6 (Fig. 18B), se nota un desplazamiento hacia potenciales despolarizantes, incluso la mutante G1275P muestra una conductancia mayor a +10 mV, cuando en canal nativo la mayor conductancia es a –20 mV. Las mutaciones en los segmentos del asa intracelular S4–S5 y segmento S6, muestran cambios significativos en la $V_{1/2}$ de activación (Tabla 5). Los valores obtenidos con el ajuste son G1148P una $V_{1/2}$ de –28.39±0.48 mV ($p< 0.01$), G1275P una $V_{1/2}$ de –18.76±0.37 mV ($p< 0.001$) y N1281A una $V_{1/2}$ de activación de –28.09±0.99 mV ($p< 0.01$). Al comparar las pendientes contra el canal nativo también observamos cambios significativos en las mutantes de glicina (G1148P y G1275P; $p< 0.01$).

Tabla 5: Voltajes medios de activación en canal nativo y mutantes.

Canal	$V_{1/2}$ Activación	Pendiente (k)	n
$rNa_v1.4$	-37.39±2.42	k= 1.04±0.96	8
K1237C	-44.18±0.84*	k= 2.18±0.33	7
K1237R	-31.75 ±0.25	k= 2.93±0.09	6
K1237A	-35.30±0.47	k= 2.83±0.11	6
K1237E	-35.14±0.05	k= 3.18±0.03*	7
G1148P	-28.39±0.48**	k= 3.00±0.20**	7
G1275P	-18.76±0.37***	k= 5.67±0.19**	6
N1281A	-28.09±0.99**	k= 2.35±0.22	6

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

7.3.2 Efecto de las mutantes sobre la inactivación rápida y lenta

La inactivación lenta es una propiedad conservada en todos los canales de sodio, por lo tanto, la mutación de aminoácidos altamente conservados en los segmentos del asa–P, asa intracelular S4–S5 y segmento S6, en canales de sodio bacteriales y mamífero, alteran la inactivación lenta sin generar cambios en otras propiedades de los canales de sodio. De esta manera, los resultados obtenidos con las mutantes proporcionan información sobre las estructuras moleculares involucradas en la inactivación lenta.

Para conocer si las mutaciones afectaban las constantes de tiempo de inactivación. Se realizó el ajuste de la inactivación del canal en el voltaje de corriente máxima a una monoexponencial. La figura 19A, muestra los tiempos de inactivación de cada mutante comparados contra el canal nativo.

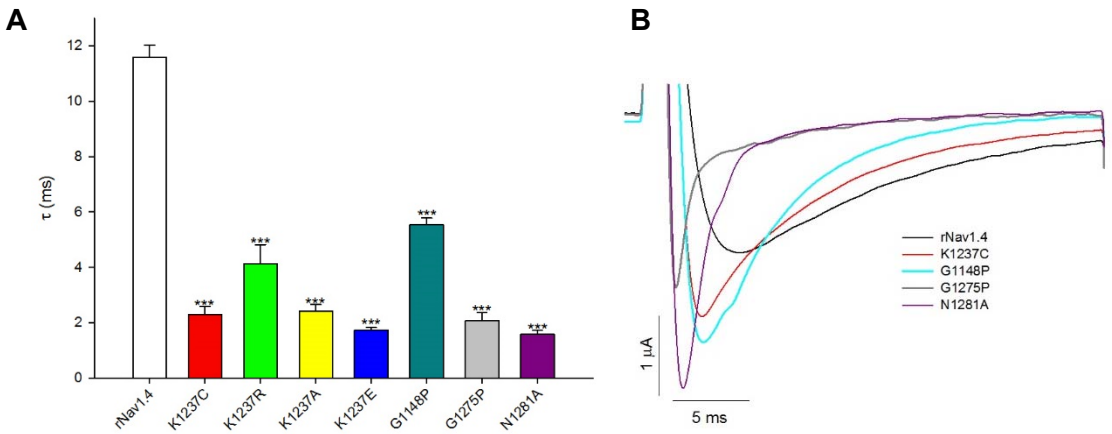


Figura 19: Constante de tiempo de inactivación (τ) obtenida del ajuste a una mono-exponencial en la inactivación de la corriente de cada mutante. A) Grafica en barras de los tiempo obtenidos para cada mutante, las barras muestran la media ± el error estándar, y B) Trazos crudos representativos de algunas mutantes que muestra la aceleración en la inactivación. ***p<0.001.

En la figura 19A, se observa que las mutaciones afectaron de manera significativa las constantes de tiempo de inactivación, los tiempos muestran que las mutaciones aceleraron la inactivación del canal por ende el tiempo de inactivación disminuye considerablemente con respecto al canal nativo (Tabla 6). En los trazos de la figura 19B, las mutantes G1275P y N1281A muestran una inactivación más rápida que las mutantes K1237C y G1148P.

Tabla 6: Constante de tiempo de inactivación en canal $rNa_v1.4$ y mutantes.

Canal	Tiempo (ms)	n
$rNa_v1.4$	11.59±0.44	8
K1237C	2.29±0.28***	7
K1237R	4.13 ±0.68***	6
K1237A	2.41±0.23***	6
K1237E	1.74±0.08***	7
G1148P	5.54±0.23***	7
G1275P	2.08±0.28***	6
N1281A	1.57±0.15***	6

***p<0.001

La figura 20A muestra el protocolo de inactivación de estado estable utilizado en este estudio.

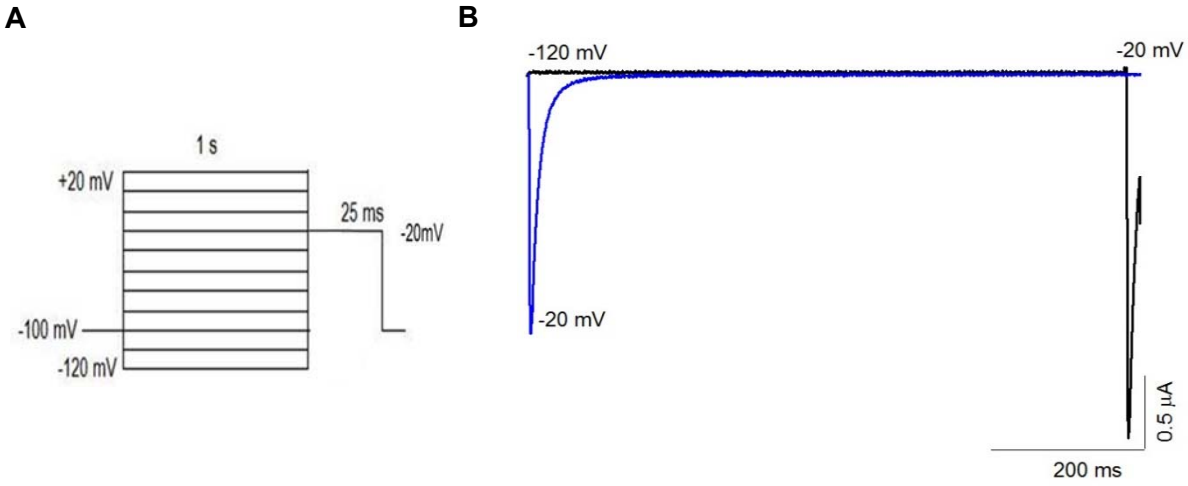


Figura 20: **A)** Protocolo de inactivación de estado–estable, y **B)** Trazo crudo representativo, se muestra en negro el trazo de corriente a un pulso condicionante de –120 mV y el trazo de corriente a un pulso de prueba de –20 mV, en azul los trazos de corriente durante el pulso condicionante y el pulso de prueba a –20 mV.

En la figura 20B, la amplitud del pico del pulso de prueba refleja la fracción de canales que son activables al final del pulso condicionante. Para obtener la relación de estado estable (Fig. 21), se midió la amplitud del pico de la corriente generada por el pulso de prueba y se graficó en función del potencial de membrana del pulso condicionante; los datos normalizados fueron ajustados a una ecuación de Boltzmann. Podemos observar que todas las mutantes tienen un desplazamiento hacia potenciales hiperpolarizantes. La tabla 7 muestra las $V_{1/2}$ y pendientes (k) obtenidas con el ajuste de Boltzmann, es importante destacar que este desplazamiento es significativo con respecto al canal nativo.

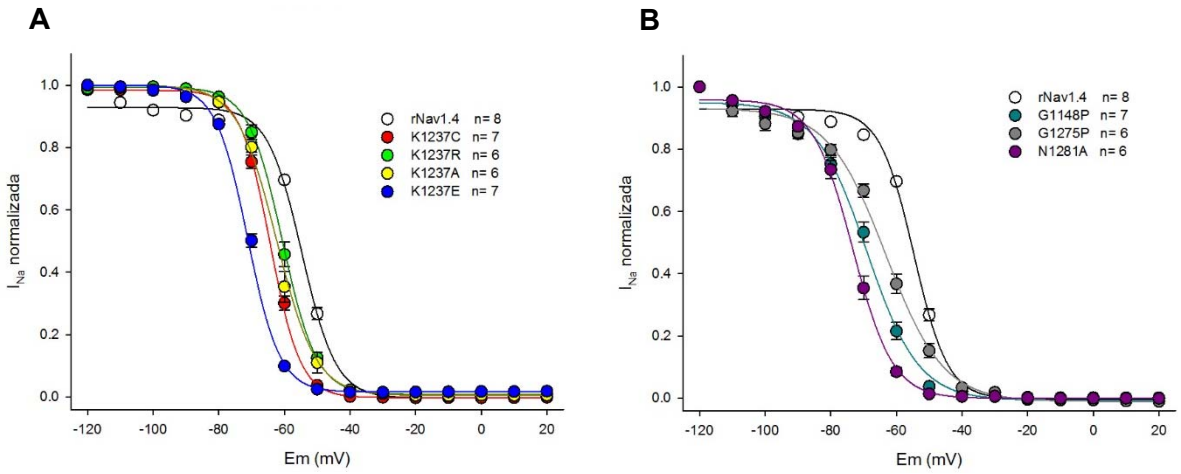


Figura 21: Inactivación de estado–estable del canal rNav1.4 y las diferentes mutantes obtenidas. **A**) Efecto de las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA, y **B**) Efecto de las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6. Las líneas continuas fueron obtenidas del ajuste de Boltzmann. Las barras muestran la media ± el error estándar.

Tabla 7: Voltajes medios de inactivación de estado–estable en canal nativo y mutantes.

Canal	$V_{1/2}$ Inactivación	Pendiente (k)	n
$rNa_v1.4$	-54.69±0.62,	k= 5.18±0.52	8
K1237C	-64.32±0.20***	k= 4.57±0.09	7
K1237R	-60.62±0.33***	k= 5.21±0.15	6
K1237A	-62.38±0.49***	k= 5.98±0.20	6
K1237E	-71.17±0.57***	k= 4.86±0.27	7
G1148P	-69.04±0.73***	k= 7.88±0.64**	7
G1275P	-63.20±0.88***	k= 8.70±0.78**	6
N1281A	-73.28±0.42***	k= 6.09±0.36	6

**p<0.01, ***p<0.001

Hemos observado en la constante de tiempo de inactivación, una aceleración en la inactivación de todas las mutantes. Considerando que la compuerta de inactivación rápida regresa a su posición cuando el potencial es restaurado a valores negativos después de una despolarización, y si consideramos que la inactivación lenta involucra un arreglo estructural de los segmentos propuestos, el protocolo de recuperación de la inactivación nos indicaría si el tiempo influye en estos mecanismos de inactivación. Las mutaciones de lisina (Fig. 22A), muestran una aceleración en la recuperación de la inactivación del canal, probablemente la ausencia de lisina permita un arreglo estructural del poro más rápido que en presencia de ésta. La mutante G1148P se encuentra en el asa intracelular S4 – S5, la recuperación de la inactivación de esta mutante muestra un enlentecimiento en los primeros 100 ms,

posteriormente la recuperación con respecto al canal nativo no parece tener diferencia significativa. La función de esta asa es comunicar el S4 con el S5, es decir, el desplazamiento del sensor de voltaje S4 genera también un movimiento del S5 permitiendo la interacción de aminoácidos con el asa P y el S6.

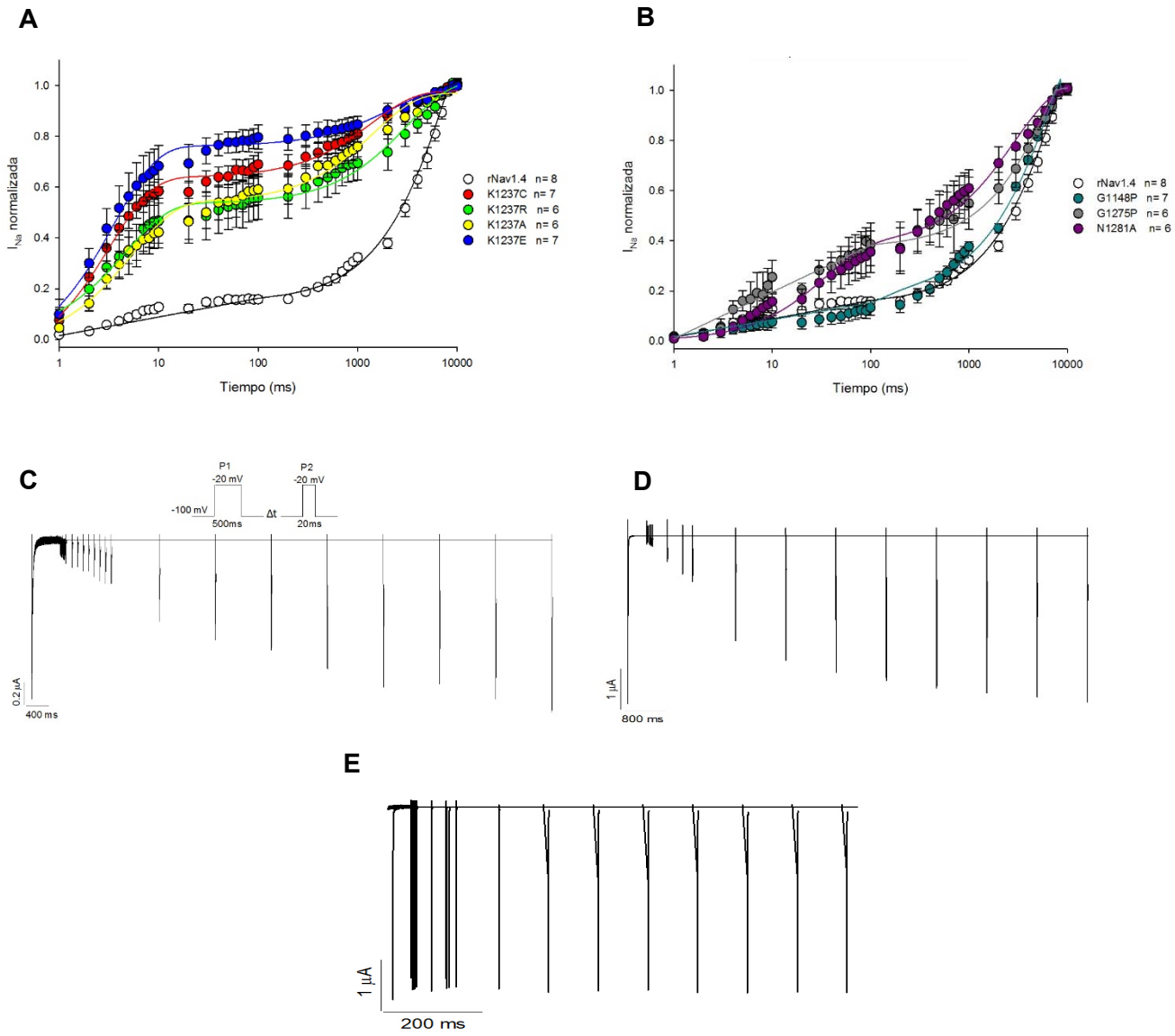


Figura 22: Curso temporal de la recuperación de la inactivación del canal rNav1.4 y las diferentes mutantes obtenidas. **A**) Efecto de las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA, y **B**) Efecto de las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6. Las líneas continuas muestran el ajuste obtenido con una doble-exponencial. Las barras muestran la media ± el error estándar. **C**) Protocolo utilizado en la recuperación de la inactivación con sus correspondientes trazos crudos de corriente, que muestran el aumento gradual de la amplitud de corriente conforme Δt aumenta, el trazo corresponde al canal rNav1.4. **D**) Los trazos de corriente corresponden al canal mutante G1148P. **E**) Los trazos de corriente corresponden al canal mutante K1237E.

Por otro lado, la mutante G1275P en el segmento S6 parece lento en los primeros 4 ms y después acelera la recuperación hasta los 3000 ms y posteriormente la recuperación se enlentece similar al canal nativo. La mutante N1281A muestra el mismo comportamiento, lento los primeros 5 ms y después acelera de manera importante la recuperación de la inactivación, el tiempo obtenido con el ajuste en la recuperación lenta es de 5977.95 ms, sin embargo, no es significativo con respecto al canal nativo.

Tabla 8: Tiempos de recuperación de la inactivación obtenidos con un ajuste doble – exponencial.

Canal	Recuperación rápida (ms)	Recuperación lenta (ms)	n
rNa$_v$1.4	4.4945 ± 0.5456	7681.049 ± 547.7189	8
K1237C	3.2060 ± 0.2363*	1412.6789 ± 213.1052***	7
K1237R	4.5908 ± 0.7335	3037.0214 ± 827.9375***	6
K1237A	5.1608 ± 0.6632	1355.9775 ± 284.5839***	6
K1237E	2.5643 ± 0.2744**	1756.9968 ± 387.3682***	7
G1148P	79.2858 ± 22.6596**	7533.4440 ± 965.6028	7
G1275P	27.4028 ± 6.8449***	6165.5105 ± 1614.7566	6
N1281A	30.3037 ± 3.9607***	5977.9527 ± 1060.9551	6

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

La tabla 8 muestra los tiempos de recuperación rápida y lenta obtenidos con el ajuste exponencial, podemos observar que las mutantes K1237C y K1237E aceleran de manera significativa la recuperación rápida, sin embargo, todas las mutantes de lisina aceleran de manera significativa la recuperación lenta. En contraste, las mutantes en el asa S4–S5 y segmento S6 enlentecen de manera significativa la recuperación rápida sin afectar la recuperación lenta. Es importante destacar, que la mutante G1148P aumenta en mayor medida el tiempo de recuperación lenta con un valor de 79.28±29.65 ms comparado con 4.49±0.54 ms observados en el canal nativo.

Estos resultados nos indicaban la posibilidad de acumular canales inactivados, para observar esto realizamos los protocolos de dependencia de uso del canal a las frecuencias mostradas en la figura 23.

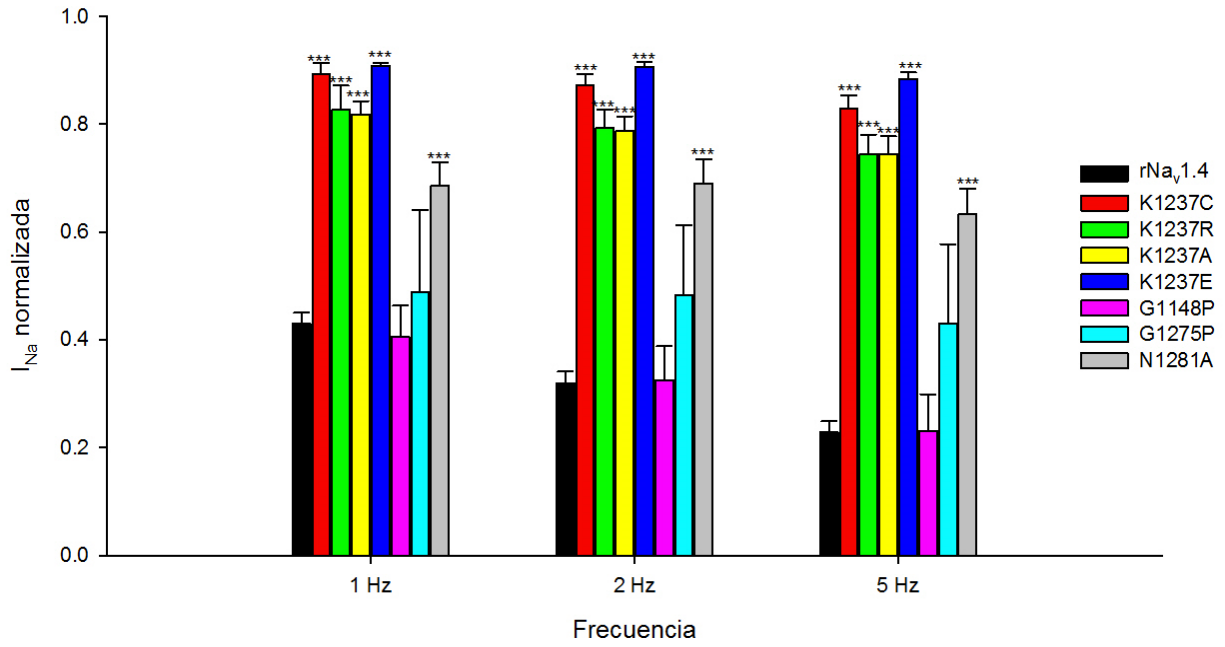


Figura 23: Dependencia de uso y frecuencia del canal rNav1.4, las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA y las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6. Las barras muestran la media ± el error estándar. ***p<0.001.

El grafico de uso y frecuencia (Fig. 23) muestra poca acumulación de canales inactivados al aumentar la frecuencia en las mutantes de K1237 y N1281A, es sabido, que el canal de sodio de músculo esquelético es dependiente de la subunidad accesoria β1, los resultados muestran que las mutaciones generan algún arreglo estructural que permite al canal recuperar más rápido, permitiendo la disponibilidad de canales aun a una frecuencia de 5 Hz. La única mutación que muestra un comportamiento semejante al canal nativo es G1148P.

En general, todas las mutantes mostraron cambios significativos en diferentes parámetros cinéticos como $V_{1/2}$ en activación, el tiempo de inactivación, $V_{1/2}$ en inactivación y el tiempo de recuperación de la inactivación. Observamos aceleración en la inactivación, enlentecimiento en algunos mutantes y particularmente aquellos que mostraron enlentecimiento la pregunta que nos hacíamos fue: si perse, el canal de sodio rNa$_v$1.4 mostraba ciertos parámetros cinéticos lentos, como inactivación, recuperación de la inactivación y acumulación de canales inactivados y la presencia de estas mutaciones en regiones del poro, asa S4–S5 y segmento S6 afectaban el arreglo estructural para generar canales rápidos o lentos. La presencia de una subunidad accesoria como β1, ¿afectaría este arreglo estructural?

7.3 El canal de sodio rNa$_v$1.4 con la subunidad β1

Debemos tomar en cuenta que los canales iónicos dependientes de voltaje son complejos proteicos altamente flexibles, cambios conformacionales significativos deben de ocurrir durante sus transiciones entre los estados de reposo, activado e inactivado en respuesta a despolarizaciones (O'Reilly, Eberhardt et al. 2012). Por lo tanto, se debe considerar la existencia de múltiples y modos consecutivos de asociación molecular entre las subunidades α y β1 del canal de sodio.

Consecuentemente la unión de la subunidad β1 a la α reduce la barrera de energía de tal modo que la probabilidad de transitar en el modo rápido incrementa debido a la formación de la interface funcional proteína–proteína. Si bien, tanto los resultados experimentales y predicciones computacionales coinciden con esta teoría, también introducen el argumento de que el efecto alostérico por el cual β1 modula la dependencia de voltaje, no depende uno del otro (Islas, Sanchez-Solano et al. 2013).

7.3.1 Efecto de las mutantes con β1 sobre la activación

Los trazos mostrados fueron obtenidos partiendo de un potencial de sostenimiento a –100 mV con pulsos despolarizantes cada 10 mV, hasta +50 mV. Se muestran los trazos crudos representativos del canal rNa$_v$1.4+ β1 (Fig. 24A), la mutación K1237C+ β1 (Fig. 24B) y G1275P+ β1 (Fig. 24C).

Podemos observar en la figura 24A, el efecto que tiene β1 sobre la subunidad α de rNa$_v$1.4, experimentos realizados en la década de los 90´s mencionan el rol de la subunidad β1 en la modulación de la inactivación lenta en canales hSkM1 (hNa$_v$1.4). La co-expresión de la subunidad β1 incrementa el efecto de dar complemento a la inactivación lenta de un ~57% a ~85% en canales de sodio hSkM1. En contraste, β1 no afecta la inactivación lenta en canales de sodio cardiaco hH1 (hNa$_v$1.5). Los datos sugieren que β1 tiene diferentes mecanismos específicos de interacción con la subunidad α en canales de sodio hSkM1 y hH1 (Vilin, Makita et al. 1999).

Datos publicados por Makita y cols., indican que la región del poro (asas – P) en canales de sodio hNa$_v$1.4 y hNa$_v$1.5 pueden ser determinantes en la modulación de la activación inducida por β1 (Makita, Bennett et al. 1996).

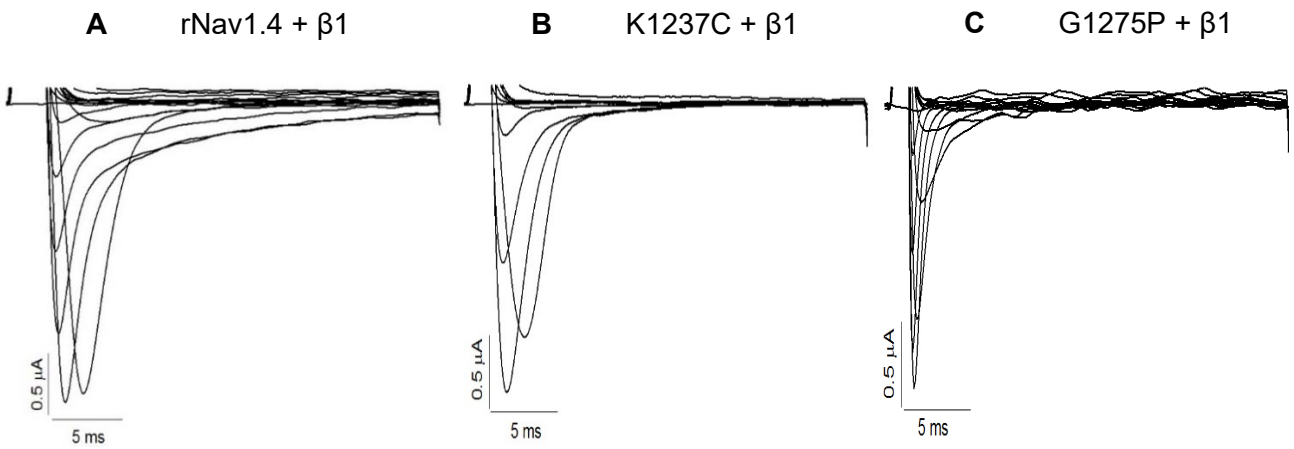


Figura 24: Efecto de las mutaciones en el dominio DIII sobre las corrientes de Na^+. Corrientes obtenidas a diferentes voltajes partiendo de un potencial de sostenimiento de –100 mV con pulsos despolarizantes cada 10 mV, hasta +50 mV. **A**) canal nativo $rNa_v1.4$+β1, **B**) mutante de lisina 1237 a cisteína con β1, en el anillo DEKA, y **C**) mutante de glicina 1275 a prolina con β1, en el segmento S6 del dominio DIII.

En las curvas de relación corriente–voltaje, las mutaciones realizadas en el anillo DEKA (Fig. 25A) muestran cambios observables en el potencial de inversión, similar a lo observado en la expresión de la subunidad α sin β1, sin embargo, a diferencia de la figura 17A, la corriente de salida no se observa de la misma manera en las mutantes que tienen carga, K1237R y K1237E. Tal pareciera que la presencia de β1 crea un tipo de tapón en el vestíbulo externo del canal, evitando la salida de iones. Observamos también que las mutaciones de lisina 1237 muestran un comportamiento más homogéneo con la subunidad β1, en cuanto a la activación, voltaje de corriente máxima y voltaje de inversión. Es evidente que hay un desplazamiento de 10 mV en las mutantes K1237, con respecto al canal nativo.

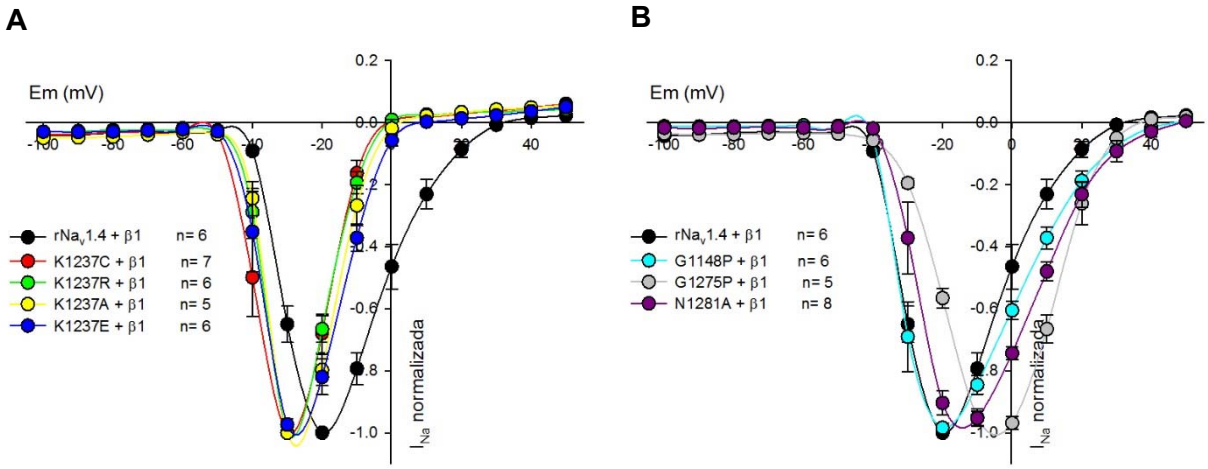


Figura 25: Relación Corriente – Voltaje del canal rNav1.4 y las diferentes mutantes obtenidas con la subunidad β1. **A**) Efecto de las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA, **B**) Efecto de las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6.

Las mutaciones realizadas en el asa intracelular S4–S5 y segmento S6 (Fig. 25B), no observamos cambios en la mutante G1148P, a diferencia de G1275P y N1281A que muestran un desplazamiento hacia potenciales despolarizantes. De manera interesante, G1275P muestra un desplazamiento de 20 mV con respecto al canal nativo, ya que tiene una corriente máxima a 0 mV. Por otro lado, no hay cambios en la activación ni potencial de inversión.

Con la finalidad de observar si los cambios en la activación, voltaje de corriente máxima así como el potencial de inversión afectaban la conductancia, construimos las curvas normalizadas de conductancia–voltaje (G–V, Fig. 26).

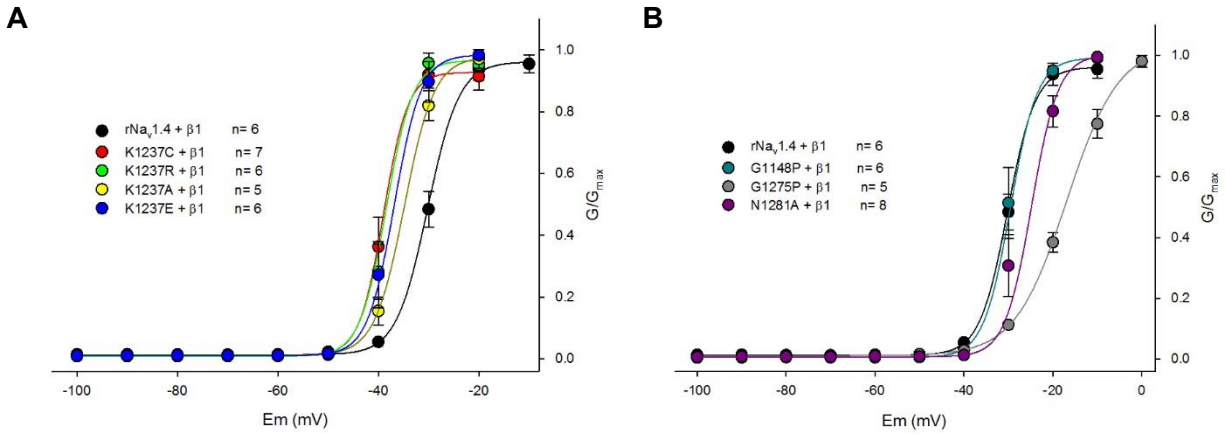


Figura 26: Relación Conductancia–Voltaje del canal rNav1.4 y las diferentes mutantes expresadas con la subunidad β1. **A**) Efecto de las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA, y **B**) Efecto de las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4–S5 y segmento S6. Las líneas continuas fueron obtenidas del ajuste de Boltzmann. Las barras muestran la media ± el error estándar.

Las mutaciones sobre lisina 1237 (Fig. 26A), muestran un desplazamiento hacia potenciales hiperpolarizantes con una conductancia máxima a –20 mV. Las mutaciones G1275P y N1281A (Fig. 26B) muestran desplazamientos hacia potenciales despolarizantes, el desplazamiento más evidente fue con la mutante G1275P, que muestra una conductancia máxima a 0 mV. Las $V_{1/2}$ obtenidas tras el ajuste de Boltzmann en la tabla 9, muestran cambios significativos en todas las mutantes de lisina al ser expresados con β1 ($p<0.001$), en la expresión de α, solo se había observado un cambio significativo en K1237C ($p<0.05$). Estos resultados muestran una posible interacción moduladora de β1 con las mutantes en la región del poro (asa P).

Por otro lado, las mutantes de G1275P y N1281A muestran cambios significativos ($p<0.001$) en la activación, semejantes a los observados cuando son expresados sin β1. La expresión de G1148P sin β1 había mostrado cambios significativos, cuando esta mutante es expresada con β1, el cambio en la $V_{1/2}$ que genera no es significativo.

Tabla 9: Voltajes medios de activación en canal nativo y mutantes con la subunidad β1.

Canal	$V_{1/2}$ Activación	Pendiente (k)	n
rNa$_v$1.4+ β1	-30.18±0.36	k= 3.12±0.14	6
K1237C+β1	-38.97±0.43***	k= 2.41±0.11**	7
K1237R+ β1	-38.44±0.65***	k= 2.62±0.20	6
K1237A +β1	-34.82±0.20***	k= 2.95±0.08	5
K1237E+β1	-36.84±0.47***	k= 2.67±0.12	6
G1148P+β1	-29.54±0.37	k= 3.00±0.10	6
G1275P+β1	-16.87±0.55***	k= 5.82±0.19***	5
N1281A+β1	-24.77±0.67***	k= 2.98±0.16	8

**p<0.01, ***p<0.001

7.3.2 Efecto de las mutantes con β1 sobre la inactivación

El primer parámetro a revisar eran las constantes de tiempo de inactivación. Para esto, realizamos el ajuste de la inactivación del canal en el voltaje de corriente máxima a una doble-exponencial. El gráfico 27A muestra los tiempos de inactivación rápida y lenta, el primer grupo de inactivación rápida muestra cambios significativos en todas las mutantes excepto para G1148P+β1. El tiempo de inactivación lenta fue significativo para todas las mutantes.

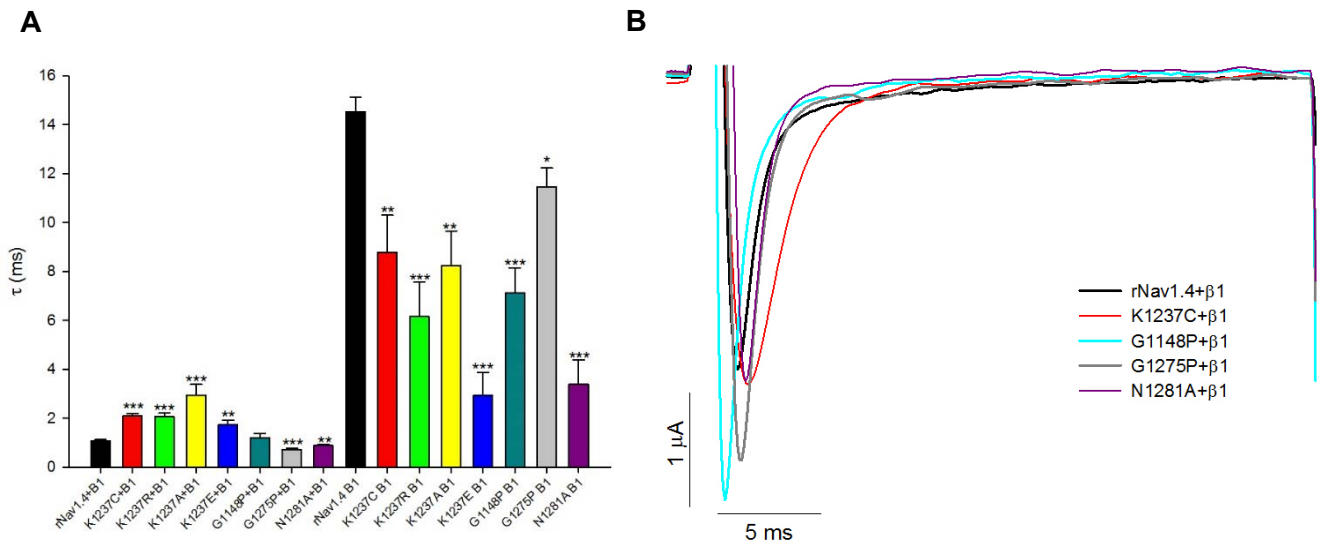


Figura 27: Constantes de tiempo de inactivación (τ). **A)** Grafica en barras de los tiempo obtenidos para cada mutante, las barras muestran la media ± el error estándar, y **B)** Trazos crudos representativos de algunas mutantes que muestra la aceleración en la inactivación. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

La tabla 10 muestra los promedios obtenidos de los ajustes de la inactivación del canal, así como se observó en la figura 27A, podemos observar un ligero pero significativo aumento en el tiempo de inactivación rápida en las mutantes de K1237, pero es más sorprendente el resultado en las mutantes G1275P y N1281A que muestran una aceleración en el tiempo de inactivación rápida. Del mismo modo, todas las mutaciones aceleraron de manera significativa el tiempo de inactivación lenta. La mutaciones que registraron el tiempo más corto fueron, K1237E+β1 con un tiempo de 2.950±0.92 ms y N1281A+ β1 con un tiempo de 3.40±0.99 ms en el tiempo de inactivación lenta, comparados con el canal nativo que mostro un tiempo de 14.51±0.61 ms.

Tabla 10: Constantes de tiempo de inactivación rápida y lenta en canal rNa$_v$1.4 y mutantes expresados con la subunidad β1.

Canal	Tiempo de inactivación rápida (ms)	Tiempo de inactivación lenta (ms)	n
rNa$_v$1.4+ β1	1.0818±0.045	14.5149±0.611	6
K1237C+β1	2.090±0.100***	8.771±1.526**	7
K1237R+ β1	2.057±0.150***	6.155±1.411***	6
K1237A +β1	2.940±0.437***	8.220±1.435**	5
K1237E+β1	1.726±0.203**	2.950±0.928***	6
G1148P+β1	1.208±0.171	7.120±1.024***	6
G1275P+β1	0.723±0.052***	11.460±0.756*	5
N1281A+β1	0.882±0.045**	3.400±0.991***	8

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

La relación de inactivación de estado estable (Fig. 28), muestra ligeros desplazamientos hacia potenciales hiperpolarizantes, K1237C muestra mayor desplazamiento que las demás mutantes de lisina (Fig. 28A), y N1281A muestra considerable desplazamiento que las mutantes de las regiones del asa S4–S5 y G1275P del segmento S6 (Fig. 28B).

Los $V_{1/2}$ de inactivación obtenidos tras el ajuste de Boltzmann, muestran significancia de p<0.001 en las mutantes K1237E, G1148P y N1281A expresados con la subunidad β1 (Tabla 11).

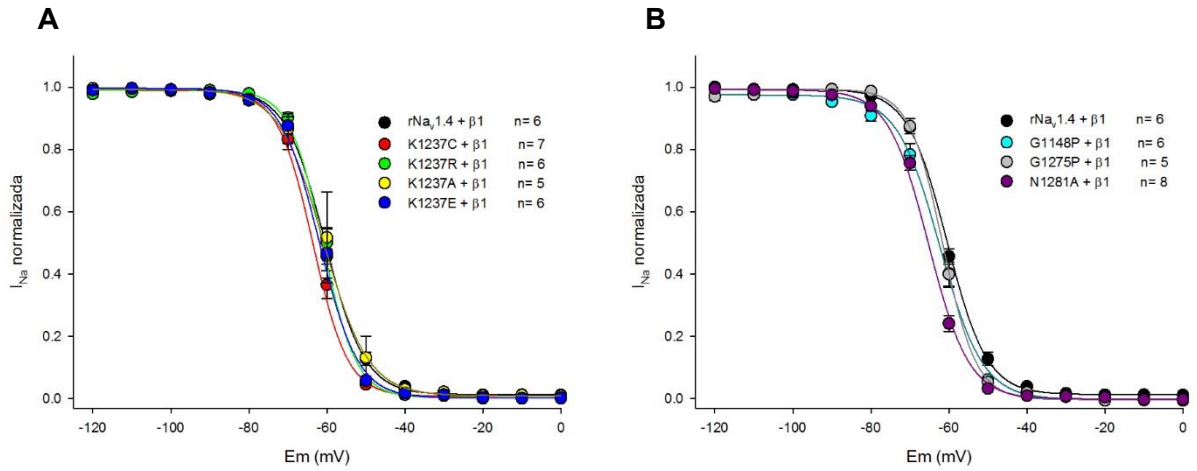


Figura 28: Inactivación de estado–estable del canal rNav1.4 y las diferentes mutantes expresadas con la subunidad β1. **A**) Efecto de las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA, y **B**) Efecto de las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6. Las líneas continuas fueron obtenidas del ajuste de Boltzmann. Las barras muestran la media ± el error estándar.

Tabla 11: Voltajes medios de inactivación de estado–estable en canal nativo y mutantes expresados con la subunidad β1.

Canal	$V_{1/2}$ Inactivación	Pendiente (k)	n
rNa_v1.4+ β1	-60.46±0.19	k= 5.06±0.11	6
K1237C+β1	-63.58±0.69***	k= 4.47±0.26	7
K1237R+ β1	-61.05±1.01	k= 4.26±0.33	6
K1237A +β1	-60.82±0.83	k= 5.69±0.28	5
K1237E+β1	-61.87±0.90,	k= 4.94±0.36	6
G1148P+β1	-62.27±0.35***	k= 5.45 ± 0.31	6
G1275P+β1	-61.57±1.00	k= 4.28±0.43	5
N1281A+β1	-65.21±0.87***	k= 5.15±0.36	8

***p<0.001

Las constantes de inactivación rápida mostraron aceleración y enlentecimiento en todas las mutantes, así como aceleración en el tiempo de inactivación lenta. El protocolo de recuperación de la inactivación nos proporcionaría respuestas sobre el efecto de estas mutaciones en presencia de la subunidad β1. Los gráficos de recuperación de la inactivación (Fig. 29) muestran en las mutaciones de K1237 (Fig. 29A), enlentecimiento en las recuperación para las mutantes a cisteína (K1237C), arginina (K1237R) y glutamato (K1237E) no así, para alanina (K1237A). Resulta interesante que la conservación de la carga (K1237R) sea el canal que recupera más lento que las demás mutantes de lisina. Considerando que arginina tiene mayor volumen que lisina, esto podría indicar la importancia no solo de la carga positiva sino el tamaño de este aminoácido para las interacciones involucradas en el poro.

Por otro lado, las mutaciones sobre los segmentos del asa S4–S5 y segmento S6 (Fig. 29B), muestran un marcado enlentecimiento en la recuperación de la inactivación, de manera puntual, el efecto observado en la mutación de glicina sobre el segmento S6 (G1275P) muestra el papel importante de esta glicina para el proceso de inactivación del canal. Habíamos observado que la expresión de esta mutante sin β1, afectaba de manera significativa la recuperación rápida pero no la recuperación lenta del canal. Cuando expresamos esta mutante con β1, el efecto parece ser sobre la recuperación rápida y lenta del canal.

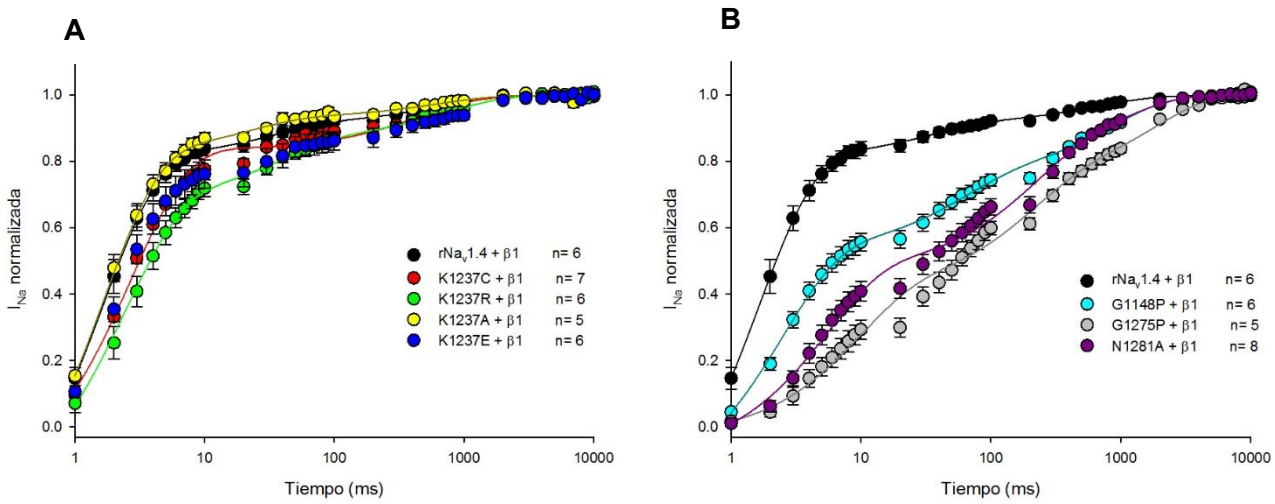


Figura 29: Curso temporal de la recuperación de la inactivación del canal rNav1.4 y las diferentes mutantes expresadas con la subunidad β1. **A**) Efecto de las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA, y **B**) Efecto de las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6. Las líneas continuas muestran el ajuste obtenido con una doble-exponencial. Las barras muestran la media ± el error estándar.

Los tiempos de recuperación de la inactivación rápida y lenta obtenidos con un ajuste doble–exponencial (Tabla 12), muestra cambios significativos en el tiempo de recuperación rápida para las mutantes de lisina K1237C y K1237R y en las mutantes del asa S4–S5 y segmento S6. Con respecto al tiempo de recuperación lenta solo la mutante de lisina K1237E mostró cambios significativos y de igual manera que en la inactivación rápida, las mutantes del asa S4–S5 y segmento S6 también mostraron cambios significativos en el tiempo de recuperación lenta. Estos resultados muestran que los segmentos del asa intracelular S4–S5 y segmento S6 juegan un papel relevante y coordinado con la subunidad β1, ya que la ausencia de estos aminoácidos afecta la interacción con el péptido de inactivación rápida IFM y el posible arreglo estructural de estos segmentos involucrados en la inactivación lenta.

Tabla 12: Tiempos de recuperación de la inactivación en canales expresados con la subunidad β1 obtenidos con un ajuste doble – exponencial.

Canal	Recuperación rápida (ms)	Recuperación lenta (ms)	n
rNa$_v$1.4+ β1	1.8525 ± 0.2006	236.4451 ± 50.3037	6
K1237C+β1	2.6610 ± 0.1161*	400.3603 ± 59.5457	7
K1237R+β1	3.2794 ± 0.3865**	343.1302 ± 44.8451	6
K1237A+β1	1.9355 ± 0.2532	178.9407 ± 54.4948	5
K1237E+β1	2.4690 ± 0.3152	632.7001 ± 28.9029***	6
G1148P+β1	3.7313 ± 0.2190***	472.3296 ± 20.1450***	6
G1275P+β1	21.2857 ± 4.7535***	742.6079 ± 64.5137***	5
N1281A+β1	6.2751 ± 0.9010***	411.5908 ± 19.0835**	8

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

El protocolo de dependencia de uso y frecuencia, mostraría la acumulación de canales inactivados dada por el enlentecimiento en la recuperación de ciertos canales mutados.

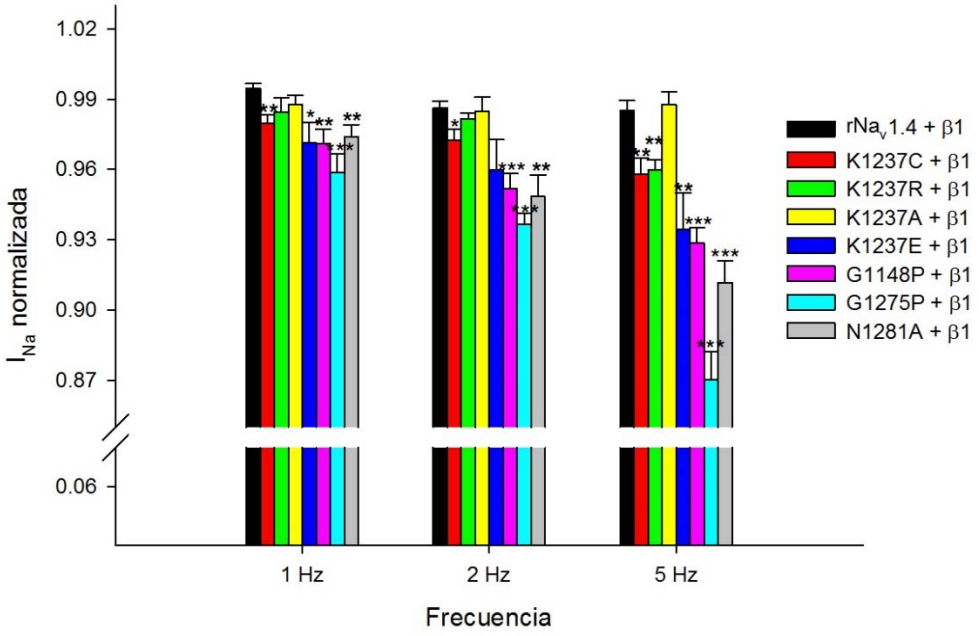


Figura 30: Dependencia de uso y frecuencia del canal rNav1.4, las mutaciones de lisina 1237 en el anillo DEKA y las mutaciones sobre el dominio DIII, en el asa intracelular S4 – S5 y segmento S6 expresados con la subunidad β1. Las barras muestran la media ± el error estándar. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Como habíamos observado en la recuperación de la inactivación, la mutante de G1275P+β1 mostraba mayor tiempo en la recuperación del canal. Los resultados obtenidos a 1, 2 y 5 Hz también muestran que esta mutante acumula canales inactivados de manera

significativa que el canal nativo. Este resultado muestra que la flexión del segmento S6 dada por glicina se ve afectada cuando tiene un aminoácido que da menos flexibilidad para llevar a cabo el arreglo estructural que conlleva a la completa inactivación del canal.

7.4 Deleción del péptido IFM

La deleción del péptido IFM (ΔIFM), no mostró cambios en la activación o potencial de inversión. La figura 31A muestra la relación corriente–voltaje y en la figura 31B se muestran los trazos crudos de corriente, se observa que no hay inactivación durante los 30 ms que dura el pulso despolarizante.

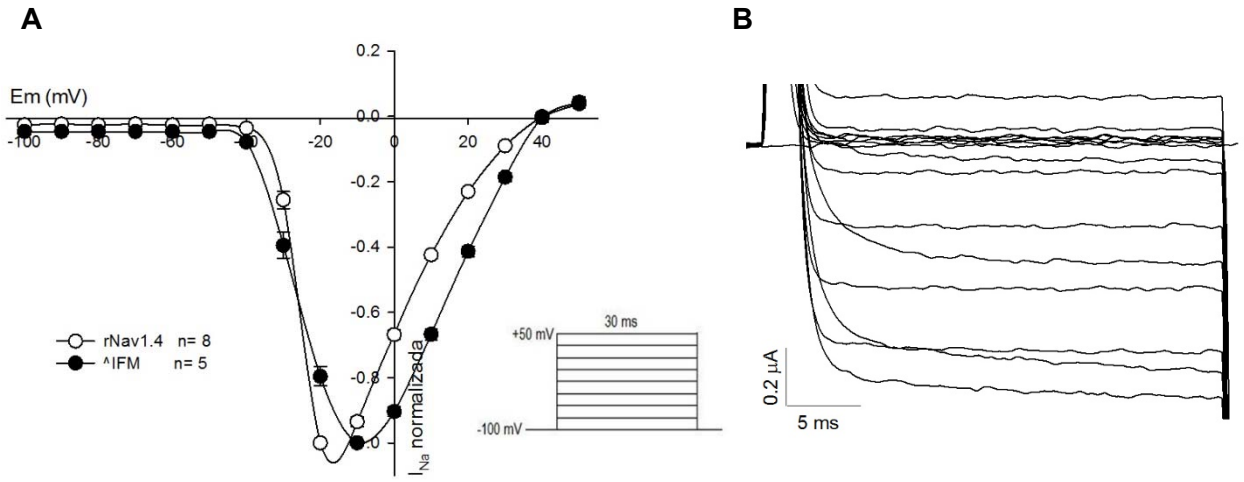


Figura 31: **A**) Relación Corriente – Voltaje del canal rNav1.4 y el canal sin péptido IFM. **B**) Trazo crudo de corriente obtenido del protocolo de activación, que se muestra entre las figuras.

En la digestión con pronasa (1mg/mL) hecha por Armstrong, Bezanilla y Rojas, 1973, y la mutagénesis de sitio del péptido IFM a glutaminas (IFM1303QQQ) hecha por Featherstone, Richmond y Ruben, 1996; no muestran cambios en la conductancia al Na^+, sin embargo, en ambos se observa la perdida de la inactivación rápida, ambos trabajos concluyen que la inactivación rápida se debe a un péptido citoplasmático de 3 aminoácidos (IFM) y la remoción por pronasa o mutación puntual, deja intacta la inactivación lenta en el canal de sodio. El modelo *in sillico* (figura 32), no muestra cambios de restructuración de las α–hélices que flanquean al péptido IFM.

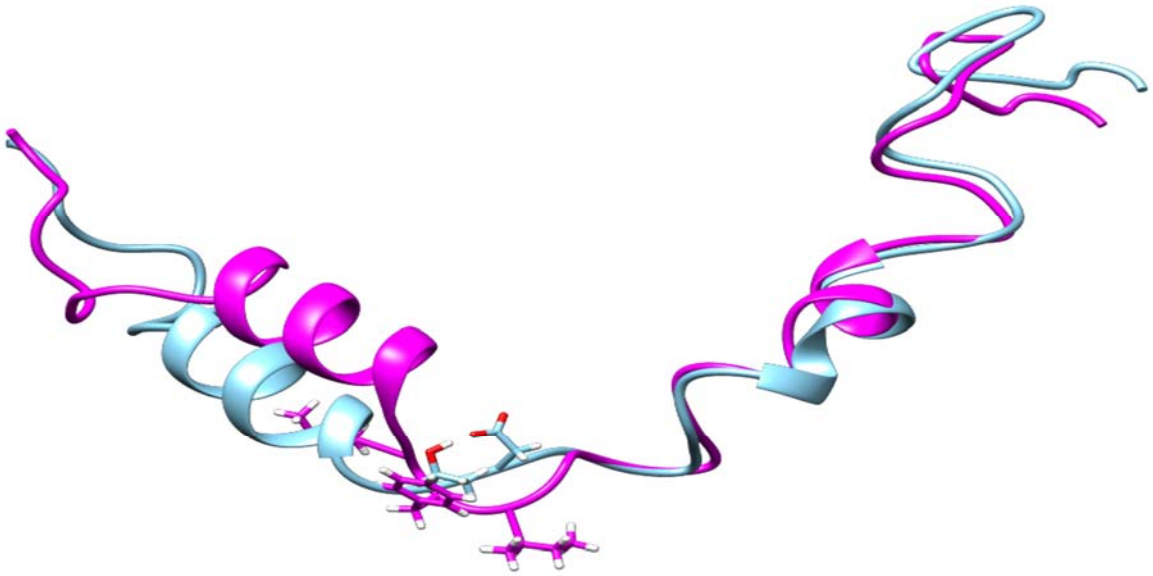


Figura 32: Modelo *in sillico* del alineamiento del péptido IFM en morado y la deleción virtual del péptido IFM en azul.

Al realizar los pulsos despolarizantes por tiempos de 1 y 5 segundos, se observó un proceso de inactivación en ausencia del péptido de inactivación rápida IFM. La figura 33A, muestra un estímulo de 40 ms donde podemos observar que no hay inactivación en 40 ms. Al incrementar el estímulo a 250 ms, no hay un proceso de inactivación. Sin embargo, cuando el estímulo se realizó por 1 segundo y 5 segundos (figura 33C, D), se observa un proceso de inactivación, principalmente en los 5 segundos de estímulo, la inactivación alcanzó aproximadamente el 80%. La figura 32E, muestra los trazos crudos de corriente comparando el canal nativo, el canal ΔIFM y el canal ΔIFM+ β 1. Estos resultados, muestran que el canal conserva las estructuras y el mecanismo de inactivación lenta.

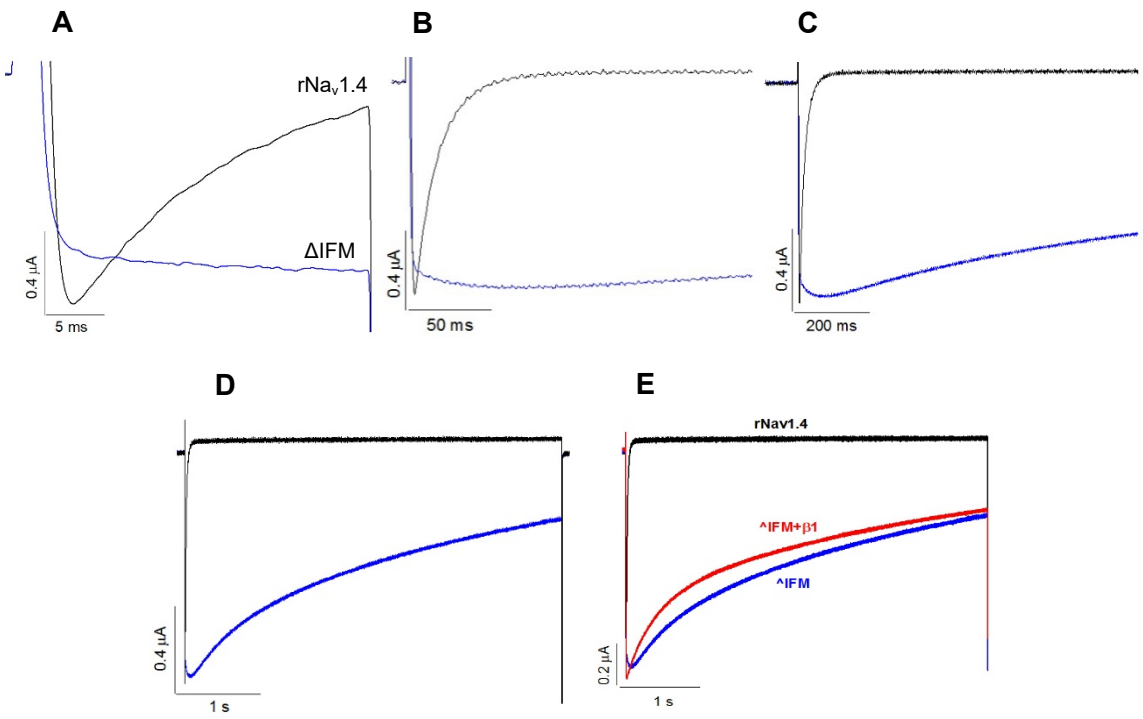


Figura 33: Trazos crudos representativos del canal nativo rNa$_v$1.4 y el canal sin el péptido de inactivación rápida IFM. Los incisos muestran trazos a diferentes tiempos de estimulación: **A)** 40 ms, **B)** 250 ms, **C)** 1 segundo y **D)** 5 segundos. Los trazos observados en negro corresponden al canal nativo rNav1.4 y en azul al canal sin péptido de inactivación rápida IFM.

8. Discusión

8.1 Efecto de las mutaciones del dominio III sobre la activación del canal rNa$_v$1.4

El DSV, conserva aminoácidos cargados positivamente en el segmento S4, cuando el campo eléctrico de la membrana es despolarizado, el segmento S4 se desplaza hacia el exterior durante la activación del canal. El segmento S4 esta acoplado a través del asa citoplasmática S4–S5 a la compuerta de activación para abrir el poro (Long, Tao et al. 2007, Payandeh, Scheuer et al. 2011). El modelo en la figura 34, muestra el alineamiento de las estructuras del canal nativo y la mutación in sillico del aminoácido G1148P.

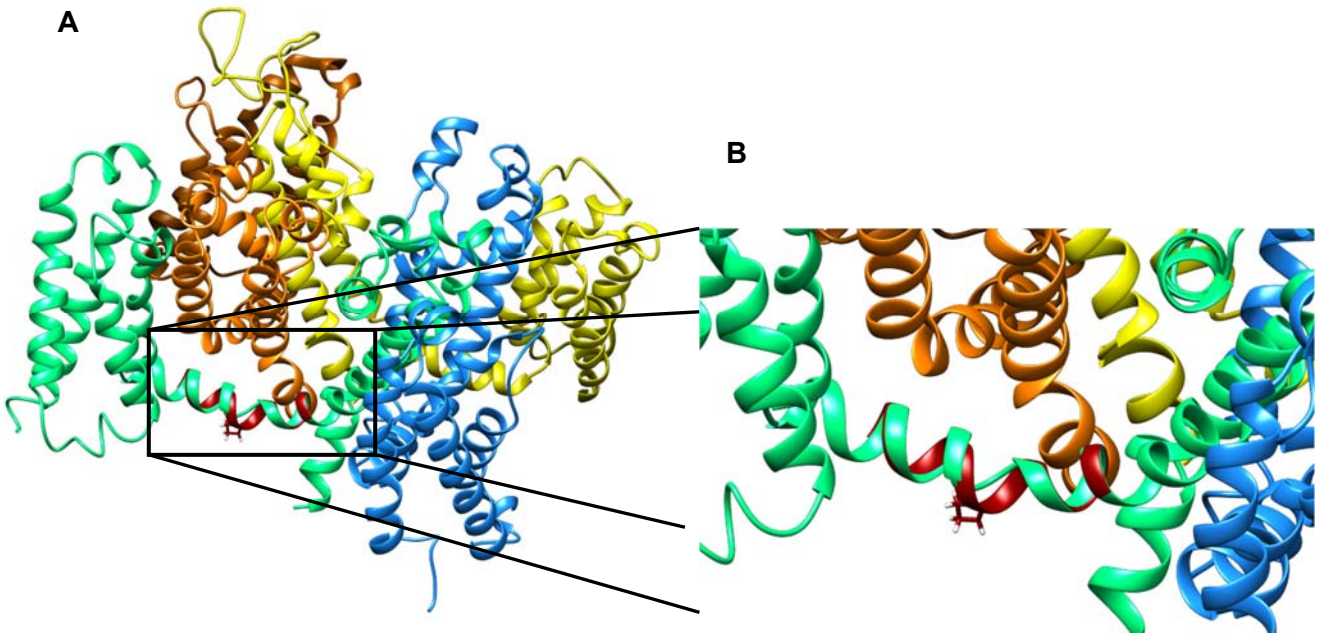


Figura 34: Modelo *in sillico* del canal nativo rNa$_v$1.4 y la mutante G1148P. **A)** El modelo del canal nativo del dominio III se muestra en verde y el modelo de la mutante G1148P se muestra en rojo. **B)** Amplificación del asa citoplasmática S4–S5 del dominio III. El aminoácido prolina se muestra en bastones.

En las proteínas los movimientos atómicos son aleatorios en general, aunque algunas veces pueden ser colectivos y causar que un grupo de átomos se muevan en una sola dirección. Las cadenas laterales pueden cambiar de una conformación a otra, algunas regiones de asas pueden no estar fijas en una sola conformación, las regiones de α–hélice se pueden deslizar una con otra y dominios enteros pueden cambiar sus interacciones y con esto abrir o cerrar la distancia entre ellos (Branden, 1999 #1169). El modelo *in sillico* de la mutante G1148P (figura 34), muestra que el cambio a prolina, genera una α–hélice continua en el segmento

citoplasmático S4–S5 que conecta el S4 con el segmento S5. Esto es congruente con una $V_{1/2}$ de –28.39 mV, es decir, 9 mV más que en canal nativo para desplazar una estructura que va desde el segmento S4 hasta el S5 en una sola α–hélice. Al mismo tiempo, esta diferencia significativa de 9 mV ($p<0.01$) genera un cambio en la pendiente de la curva de activación. Pero cuando esta mutante es expresada con la subunidad β1, su funcionamiento es similar al canal nativo con β1. En el canal de sodio bacterial de *Bacillus halodurans* los cambios conformacionales durante la activación están estrechamente acoplados al movimiento lateral del asa intracelular S4–S5, el cual puede inducir cambios estructurales sobre los segmentos S5 y S6 para abrir la compuerta del poro intracelular (Yarov-Yarovoy, DeCaen et al. 2012).

El grupo de Marban et al., mostraron que las asas P son estructuras flexibles, principalmente K1237, puede tener cambios estructurales en el poro (Benitah, Ranjan et al. 1997, Benitah, Chen et al. 1999). El modelo del anillo DEKA, que define el poro, se muestra en la figura 35A. Se observa como la carga positiva de lisina (K–DIII) se orienta hacia las cargas negativas del ácido aspártico (D–DI) y el ácido glutámico (E–DII). Cuando se muta lisina por alanina, (figura 35B, C), se pierde un elemento crítico para la selectividad del ión Na^+ y en consecuencia el tamaño del poro aumenta considerablemente. Todt et al. 1999, realizaron mutaciones sobre el anillo DEKA del canal de sodio rNav1.4 y observaron que K1237 afectaba de manera “dramática” el potencial de inversión desplazándolo hacia potenciales hiperpolarizantes, sugiriendo que lisina 1237 afectaba la selectividad y también estaba involucrada en la inactivación. Trabajos previos del laboratorio (Sánchez, 2011), se observó que al mutar lisina 1419 en la isoforma cardiaca $hNa_v1.5$, a cisteína, se alteró la selectividad del canal permitiendo el paso de iones K^+ (P_K/P_{Na}: 0.84 ± 0.04). Sun et al*.,* realizaron mutaciones a alanina en el anillo DEKA, concluyeron que lisina influye en la selectividad por Na^+, ya que el mutante DEAA es permeable a una amplia variedad de cationes monovalentes que normalmente no tienen paso a través del canal nativo, también concluyen que las cargas de los aminoácidos del anillo DEKA son determinantes estructurales del comportamiento de exclusión molecular del canal de sodio.

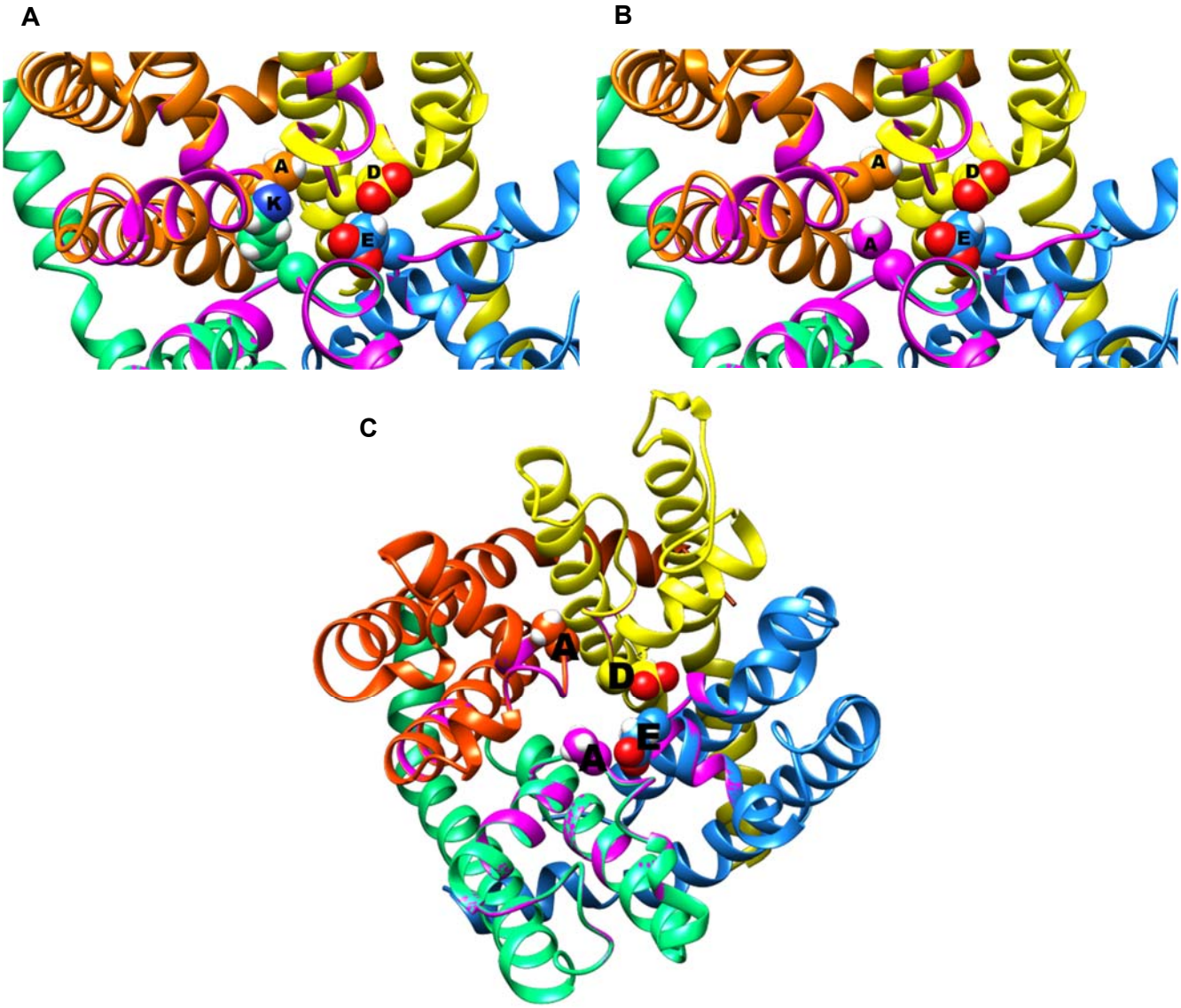


Figura 35: Modelo *in sillico* del alineamiento estructural del canal nativo rNa$_v$1.4 y la mutante K1237A. **A)** Modelo del anillo DEKA, el dominio I se muestra en amarillo, el dominio II en azul, el dominio III en verde y el dominio IV en naranja. El anillo DEKA es presentado en esferas. **B)** Modelo de la mutante K1237A, generando un anillo DEAA, la mutante K1237A se muestra en esferas moradas. **C)** Vista superior de la mutante K1237A, se muestra un aumento en el tamaño del poro.

Todas las mutantes de K1237, mostraron cambios significativos en el potencial de inversión, los modelos sugieren que el aumento en el tamaño del poro y la pérdida de la selectividad influyen en el paso de iones monovalentes y bivalentes presentes en el medio extracelular e intracelular del ovocito, llegando así a un equilibrio iónico prematuro. Todas las

mutantes de K1237, cambiaron el voltaje de activación así como el voltaje de corriente máxima. Sin embargo, solo la mutante K1237C mostró cambios significativos en la $V_{1/2}$ de activación.

La expresión de la subunidad β1 con las mutantes de K1237, desplazan las curvas de activación hacia potenciales hiperpolarizantes, los modelos sugieren un aumento en el tamaño del poro, perdida de la selectividad y las propiedades de los aminoácidos involucrados como: una coordinación por puentes de H^+ y el Na^+ del grupo SH de cisteína, atracción de iones Na^+ por el grupo carboxilo del ácido glutámico, la prevalencia de las cargas negativas del ácido aspártico y ácido glutámico cuando están 2 alaninas y aunque se restablece la carga positiva cuando se muta por arginina, no es suficiente para mantener las propiedades electrofisiológicas nativas del canal.

Barber et al., observaron 2 glicinas en el segmento S6 del canal bacterial *Bacillus halodurans* (NaChBac), que proporcionan cambios estructurales flexibles en las posiciones 219 y 229, sugiriendo un mecanismo donde el segmento del poro tiene transiciones en los cuales las glicinas actúan como bisagras, desacoplando las interacciones de los 3 segmentos restantes. El paso de un poro cerrado a un poro abierto, el ángulo de flexión cambia en un promedio de 10° a 20°. Realizaron simulaciones de dinámica molecular en 2 mutantes, G219P y G219A, con la finalidad de caracterizar el efecto de estas mutaciones sobre la flexión del segmento S6. El efecto más dramático fue en la mutante a prolina, en comparación con el canal nativo, ya que mostro un cambio significativo en el ángulo de flexión hacia valores mayores a 20° (Barber, Carnevale et al. 2012). La glicina equivalente a la observada en NaChBac se encuentra en la posición 1275. La mutación de G1275P, genero un desplazamiento en la curva de activación hacia potenciales despolarizantes. Los modelos *in sillico* (figura 36) indican que la presencia de glicina le permite libertad de movimiento en la flexión del segmento S6 y no hay interacción con el segmento citoplasmático S4–S5 del DII. Al colocar prolina en esta región generamos un segmento S6 rígido para su flexión y las figuras 36B y 36C, muestran interacciones con aminoácidos del segmento citoplasmático S4–S5 en el dominio DII, lo que sugiere mayor carga para la flexión de este segmento. Esto es congruente con una $V_{1/2}$ de –18.76 mV, es decir, 18.63 mV más que en canal nativo ($p<0.001$). El desplazamiento hacia potenciales despolarizantes genera un cambio significativo en la pendiente ($p<0.01$), consistente con las interacciones de P1275 en el segmento S6 y el asa citoplasmática del DII

conforme se despolariza la membrana del ovocito. El mismo comportamiento es observado cuando se expresa con la subunidad β1. Los resultados indican que el movimiento del segmento S6 son independientes del mecanismo modulador de la subunidad β1.

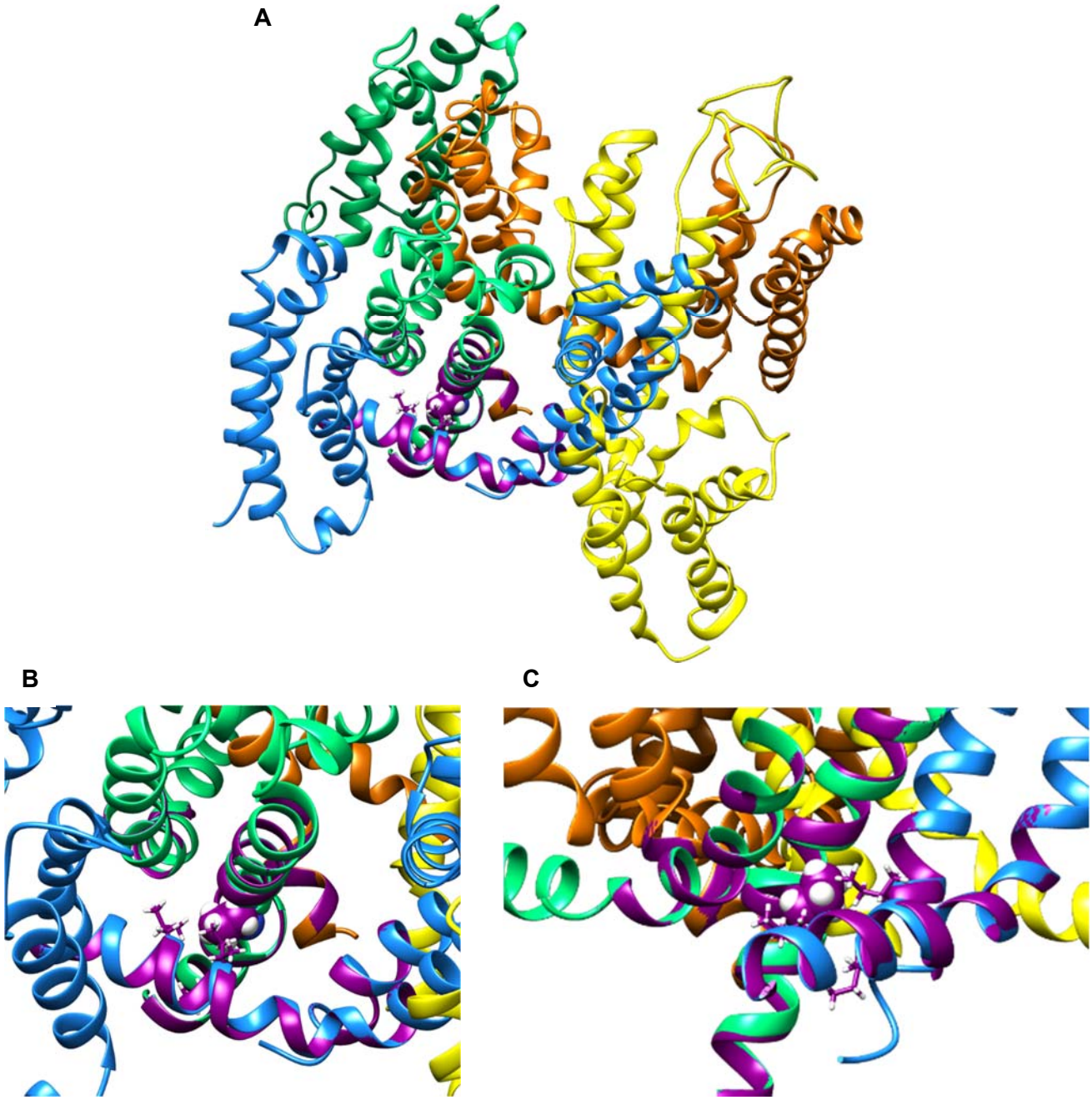


Figura 36: Modelo *in sillico* del alineamiento estructural del canal nativo rNa$_v$1.4 y la mutante G1275P, el dominio I se muestra en amarillo, el dominio II en azul, el dominio III en verde y el dominio IV en naranja. **A)** Vista superior del canal mutante, la mutación G1275P se muestra en esferas moradas. **B–C)** Amplificación de las posibles interacciones de la mutante P1275 con aminoácidos del segmento citoplasmático S4–S5 del dominio DII.

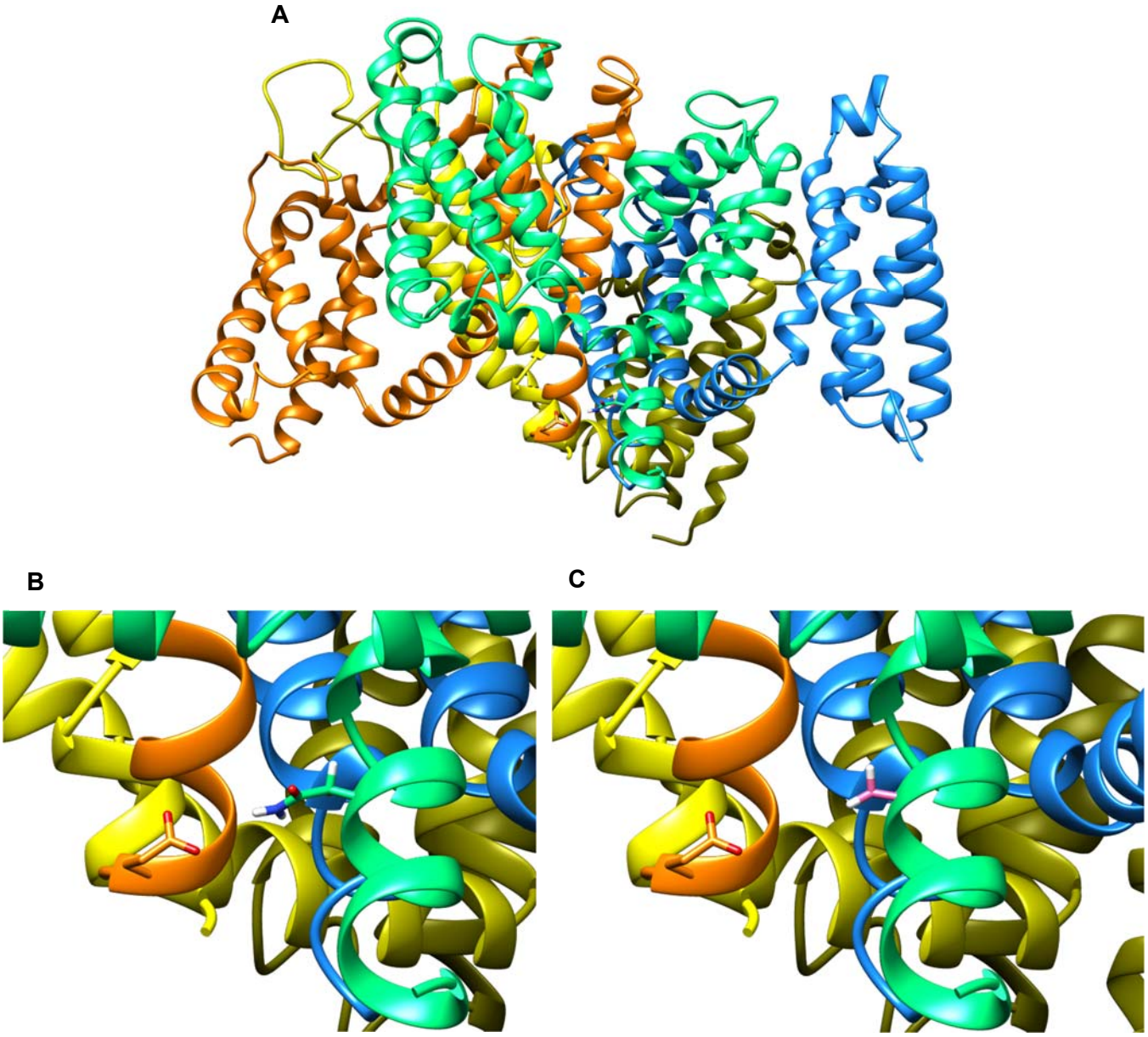


Figura 37: Modelo *in sillico* del alineamiento estructural del canal nativo rNa$_v$1.4 y la mutante N1281A. **A)** Vista lateral del canal mutante, la mutación N1281A se muestra en bastones verdes. El dominio I se muestra en amarillo, el dominio II en azul, el dominio III en verde y el dominio IV en naranja. **B)** Interacción de la asparagina nativa con un ácido glutámico del segmento S6–DIV. **C)** Disrupción de la interacción cuando asparagina es mutada por alanina.

Chen et al., realizaron mutaciones en las diferentes asparaginas presentes en los 4 segmentos S6 del canal de sodio neuronal Na$_v$1.2 (N418A, N976A, N1466A y N1976A). Observó cambios significativos en el $V_{1/2}$ de inactivación lenta y un enlentecimiento en la recuperación de la inactivación en solo 2 mutantes de los 4 segmentos, los dominios DI y DIII,

concluyendo que los segmentos del poro del dominio DI y DIII son estructuras con mayor flexibilidad que los dominios DII y DIV (Chen, Yu et al. 2006).

N1281A mostró efectos similares a la mutante de G1148P en la $V_{1/2}$ de activación, aunque a diferencia de la mutante G1148, no mostró cambios en la pendiente de la curva de activación. La mutante N1281A, tuvo una diferencia de 9.3 mV con respecto al canal nativo, es decir, la curva se desplazó hacia potenciales despolarizantes. La figura 36B, muestra una interacción entre N1281 y un ácido glutámico del segmento S6–DIV. Las interacciones entre el S6–DIII y S6–DIV, indican un proceso coordinado entre estos segmentos durante la activación del canal. Esta coordinación se ve abolida cuando asparagina es mutado por alanina, esto sugiere mayor carga para la activación del canal. Igual que en la mutante G1275P, el segmento S6 es independiente del mecanismo modulador de la subunidad β1.

8.2 Efecto de las mutaciones del dominio III sobre la inactivación lenta del canal rNa$_v$1.4

Los canales de sodio bacteriales comparten propiedades fisiológicas con sus más complejos descendientes en mamíferos, incluyendo una activación dependiente de voltaje, inactivación y sensibilidad farmacológica. Sin embargo, su simple estructura homotetramérica deja a los canales de sodio bacteriales sin el péptido de inactivación rápida encontrado en los canales de sodio de mamífero. Por otro lado, estos canales conservan un proceso de inactivación similar a la inactivación lenta (Pavlov, Bladen et al. 2005).

Todas las mutantes del dominio DIII mostraron una aceleración en la constante de tiempo de inactivación. Cuando expresamos con la subunidad β1, todas las mutantes mostraron cambios significativos en las constantes de tiempo de inactivación rápida y lenta, las mutantes G1275P y N1281A mostraron aceleración y el resto, excepto G1148P, mostraron un enlentecimiento en el tiempo de inactivación rápida. Por otro lado, todas las mutantes mostraron una aceleración en el tiempo de inactivación lenta.

La inactivación tipo C en canales de potasio, involucra un arreglo estructural para la apertura del poro y al mismo tiempo regresar a su estado de reposo generando un estado no conductor. Entonces, las descripciones obtenidas de los modelos *in sillico* tanto en la activación como en la inactivación lenta involucra arreglos durante la inactivación lenta del canal. Es decir,

G1148P muestra un segmento α–hélice que en el desplazamiento durante la activación como la transición al estado inactivado requieren de mayor carga para su arreglo estructural, esto es congruente con una $V_{1/2}$ de inactivación de –69.04 mV, es decir, –14.35 mV que el canal nativo. Si se observan las curvas de inactivación de estado estable (figura 21), todas las mutantes muestran un desplazamiento significativo hacia potenciales hiperpolarizantes. Estos desplazamientos proporcionan $V_{1/2}$ de inactivación significativos con respecto al canal nativo. Cuando expresamos las mutantes con la subunidad β1, solamente las mutantes K1237C, G1148P y N1281A, mostraron cambios significativos en la $V_{1/2}$ de inactivación de estado estable hacia potenciales hiperpolarizantes.

Los tiempos de recuperación de la inactivación, muestran una recuperación rápida en las mutantes de K1237C y K1237E, no así, las mutantes de G1148P, G1275P y N1281A, las cuales requieren mayor tiempo para la recuperación rápida del canal, como G1148P con 79.28 ms. Resulta relevante destacar que en la recuperación lenta del canal, todas las mutantes de K1237 mostraron una aceleración significativa con respecto al canal nativo ($p<0.001$). Estos resultados sugieren que el arreglo molecular en el poro es más rápido que las interacciones en los segmentos citoplasmáticos S4–S5 y S6. Por otro lado, cuando expresamos con la subunidad β1, todas las mutantes excepto K1237A y K1237E, mostraron un enlentecimiento significativo en el tiempo de recuperación rápida del canal, como G1275P con 21.28 ms. Del mismo modo, las mutantes K1237E, G1148P, G1275P y N1281A, mostraron un enlentecimiento en el tiempo de recuperación lenta del canal, nuevamente G1275P con 742.60 ms. Ahora los resultados indican que en la presencia de β1 los arreglos estructurales para la recuperación del canal le toman más tiempo que cuando no está presente β1.

Este mismo comportamiento fue observado en los gráficos de uso del canal, se observó que cuando no está β1, las mutantes acumulan menos canales inactivados y mayor disponibilidad de ellos, por el contrario, cuando esta presente la subunidad β1, las mutantes acumulan más canales inactivados y por ende menor disponibilidad de canales.

9. Conclusiones

- ✓ La mutación a prolina en el aminoácido G1148 generó un segmento rígido en el asa citoplasmática que conecta el S4 con el S5, el movimiento de este segmento requiere de mayor voltaje tanto para su activación como para su inactivación. También enlentece la recuperación de la inactivación del canal.

- ✓ Las mutaciones de K1237 en el poro, desplazaron los $V_{1/2}$ de inactivación hacia potenciales hiperpolarizantes, aceleran el tiempo de inactivación así como la recuperación de la inactivación del canal.

- ✓ La mutación a prolina en el aminoácido G1275 sobre el segmento S6–DIII, modifica la dependencia de voltaje en la activación e inactivación y enlentece la recuperación de la inactivación del canal.

- ✓ La mutación de N1281 por alanina en el segmento S6–DIII, altera la dependencia de voltaje en la activación e inactivación y enlentece la recuperación de la inactivación del canal.

- ✓ El canal ΔIFM no generó cambios en la dependencia de voltaje del canal y los pulsos despolarizantes de 5 segundos reflejan una participación alostérica de la subunidad β1 en la inactivación lenta del canal.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adelman, W. J., Jr. and Y. Palti (1969). "The influence of external potassium on the inactivation of sodium currents in the giant axon of the squid, Loligo pealei." J Gen Physiol **53**(6): 685-703.
- Agnew, W. S., A. C. Moore, S. R. Levinson and M. A. Raftery (1980). "Identification of a large molecular weight peptide associated with a tetrodotoxin binding protein from the electroplax of Electrophorus electricus." Biochem Biophys Res Commun **92**(3): 860-866.
- Amaral, C., V. Carnevale, M. L. Klein and W. Treptow (2012). "Exploring conformational states of the bacterial voltage-gated sodium channel NavAb via molecular dynamics simulations." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(52): 21336-21341.
- Armstrong, C. M. (1981). "Sodium channels and gating currents." Physiol Rev **61**(3): 644-683.
- Armstrong, C. M., F. Bezanilla and E. Rojas (1973). "Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase." J Gen Physiol **62**(4): 375-391.
- Armstrong, C. M. and B. Hille (1998). "Voltage-gated ion channels and electrical excitability." Neuron **20**(3): 371-380.
- Balser, J. R. (1999). "Structure and function of the cardiac sodium channels." Cardiovasc Res **42**(2): 327-338.
- Balser, J. R., H. B. Nuss, N. Chiamvimonvat, M. T. Perez-Garcia, E. Marban and G. F. Tomaselli (1996). "External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels." J Physiol **494 (Pt 2)**: 431-442.
- Barber, A. F., V. Carnevale, S. G. Raju, C. Amaral, W. Treptow and M. L. Klein (2012). "Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel." Biochim Biophys Acta **1818**(9): 2120-2125.
- Barchi, R. L. (1983). "Protein components of the purified sodium channel from rat skeletal muscle sarcolemma." J Neurochem **40**(5): 1377-1385.
- Beneski, D. A. and W. A. Catterall (1980). "Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 639-643.
- Benitah, J. P., Z. Chen, J. R. Balser, G. F. Tomaselli and E. Marban (1999). "Molecular dynamics of the sodium channel pore vary with gating: interactions between P-segment motions and inactivation." J Neurosci **19**(5): 1577-1585.
- Benitah, J. P., R. Ranjan, T. Yamagishi, M. Janecki, G. F. Tomaselli and E. Marban (1997). "Molecular motions within the pore of voltage-dependent sodium channels." Biophys J **73**(2): 603-613.
- Bennett, P. B., Jr., N. Makita and A. L. George, Jr. (1993). "A molecular basis for gating mode transitions in human skeletal muscle Na+ channels." FEBS Lett **326**(1-3): 21-24.
- Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1977). "Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments." J Gen Physiol **70**(5): 549-566.
- Brackenbury, W. J. and L. L. Isom (2008). "Voltage-gated Na+ channels: potential for beta subunits as therapeutic targets." Expert Opin Ther Targets **12**(9): 1191-1203.
- Carr, D. B., D. C. Cooper, S. L. Ulrich, N. Spruston and D. J. Surmeier (2002). "Serotonin receptor activation inhibits sodium current and dendritic excitability in prefrontal cortex via a protein kinase C-dependent mechanism." J Neurosci **22**(16): 6846-6855.

- Catterall, W. A. (1980). "Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **20**: 15-43.
- Catterall, W. A. (1984). "The molecular basis of neuronal excitability." Science **223**(4637): 653-661.
- Catterall, W. A. (1992). "Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels." Physiol Rev **72**(4 Suppl): S15-48.
- Catterall, W. A. (2000). "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels." Neuron **26**(1): 13-25.
- Catterall, W. A. (2001). "A 3D view of sodium channels." Nature **409**(6823): 988-989, 991.
- Catterall, W. A. (2001). "Physiology. A one-domain voltage-gated sodium channel in bacteria." Science **294**(5550): 2306-2308.
- Catterall, W. A., A. L. Goldin and S. G. Waxman (2005). "International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 397-409.
- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch and J. Striessnig (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 411-425.
- Clayton, G. M., S. Altieri, L. Heginbotham, V. M. Unger and J. H. Morais-Cabral (2008). "Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1511-1515.
- Cuello, L. G., D. M. Cortes and E. Perozo (2004). "Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K+ channel in a lipid bilayer." Science **306**(5695): 491-495.
- Cuello, L. G., V. Jogini, D. M. Cortes, A. C. Pan, D. G. Gagnon, O. Dalmas, J. F. Cordero-Morales, S. Chakrapani, B. Roux and E. Perozo (2010). "Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K(+) channels." Nature **466**(7303): 272-275.
- Cuello, L. G., V. Jogini, D. M. Cortes and E. Perozo (2010). "Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels." Nature **466**(7303): 203-208.
- Chahine, M., A. L. George, Jr., M. Zhou, S. Ji, W. Sun, R. L. Barchi and R. Horn (1994). "Sodium channel mutations in paramyotonia congenita uncouple inactivation from activation." Neuron **12**(2): 281-294.
- Chakrapani, S., P. Sompornpisut, P. Intharathep, B. Roux and E. Perozo (2010). "The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5435-5440.
- Chandler, W. K. and H. Meves (1970). "Slow changes in membrane permeability and long-lasting action potentials in axons perfused with fluoride solutions." J Physiol **211**(3): 707-728.
- Chen, C. and S. C. Cannon (1995). "Modulation of Na+ channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis." Pflugers Arch **431**(2): 186-195.
- Chen, J., J. S. Mitcheson, M. Lin and M. C. Sanguinetti (2000). "Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel." J Biol Chem **275**(46): 36465-36471.
- Chen, Y., F. H. Yu, D. J. Surmeier, T. Scheuer and W. A. Catterall (2006). "Neuromodulation of Na+ channel slow inactivation via cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C." Neuron **49**(3): 409-420.

- Chiamvimonvat, N., M. T. Perez-Garcia, R. Ranjan, E. Marban and G. F. Tomaselli (1996). "Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na+ channel revealed by cysteine mutagenesis." Neuron **16**(5): 1037-1047.
- Chopra, S. S., H. Watanabe, T. P. Zhong and D. M. Roden (2007). "Molecular cloning and analysis of zebrafish voltage-gated sodium channel beta subunit genes: implications for the evolution of electrical signaling in vertebrates." BMC Evol Biol **7**: 113.
- DeCaen, P. G., V. Yarov-Yarovoy, Y. Zhao, T. Scheuer and W. A. Catterall (2008). "Disulfide locking a sodium channel voltage sensor reveals ion pair formation during activation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15142-15147.
- Delemotte, L., M. L. Klein and M. Tarek (2012). "Molecular dynamics simulations of voltage-gated cation channels: insights on voltage-sensor domain function and modulation." Front Pharmacol **3**: 97.
- Delemotte, L., M. Tarek, M. L. Klein, C. Amaral and W. Treptow (2011). "Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(15): 6109-6114.
- Do, M. T. and B. P. Bean (2003). "Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation." Neuron **39**(1): 109-120.
- Du, Y., Y. Nomura, Z. Liu, Z. Y. Huang and K. Dong (2009). "Functional expression of an arachnid sodium channel reveals residues responsible for tetrodotoxin resistance in invertebrate sodium channels." J Biol Chem **284**(49): 33869-33875.
- Favre, I., E. Moczydlowski and L. Schild (1996). "On the structural basis for ionic selectivity among Na+, K+, and Ca2+ in the voltage-gated sodium channel." Biophys J **71**(6): 3110-3125.
- Featherstone, D. E., J. E. Richmond and P. C. Ruben (1996). "Interaction between fast and slow inactivation in Skm1 sodium channels." Biophys J **71**(6): 3098-3109.
- Feng, G., P. Deak, M. Chopra and L. M. Hall (1995). "Cloning and functional analysis of TipE, a novel membrane protein that enhances Drosophila para sodium channel function." Cell **82**(6): 1001-1011.
- Filatov, G. N., T. P. Nguyen, S. D. Kraner and R. L. Barchi (1998). "Inactivation and secondary structure in the D4/S4-5 region of the SkM1 sodium channel." J Gen Physiol **111**(6): 703-715.
- Fox, J. M. (1976). "Ultra-slow inactivation of the ionic currents through the membrane of myelinated nerve." Biochim Biophys Acta **426**(2): 232-244.
- Furman, R. E., J. C. Tanaka, P. Mueller and R. L. Barchi (1986). "Voltage-dependent activation in purified reconstituted sodium channels from rabbit T-tubular membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(2): 488-492.
- Gajewski, C., A. Dagcan, B. Roux and C. Deutsch (2011). "Biogenesis of the pore architecture of a voltage-gated potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(8): 3240-3245.
- Goldin, A. L. (2002). "Evolution of voltage-gated Na(+) channels." J Exp Biol **205**(Pt 5): 575-584.
- Groome, J. R., E. Fujimoto and P. C. Ruben (2003). "Negative charges in the DIII-DIV linker of human skeletal muscle Na+ channels regulate deactivation gating." J Physiol **548**(Pt 1): 85-96.

- Guy, H. R. and P. Seetharamulu (1986). "Molecular model of the action potential sodium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(2): 508-512.
- Hartshorne, R. P. and W. A. Catterall (1981). "Purification of the saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(7): 4620-4624.
- Hartshorne, R. P., B. U. Keller, J. A. Talvenheimo, W. A. Catterall and M. Montal (1985). "Functional reconstitution of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(1): 240-244.
- Hartshorne, R. P., D. J. Messner, J. C. Coppersmith and W. A. Catterall (1982). "The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits." J Biol Chem **257**(23): 13888-13891.
- Hayward, L. J., R. H. Brown, Jr. and S. C. Cannon (1997). "Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis." Biophys J **72**(3): 1204-1219.
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stuhmer, K. Imoto and S. Numa (1992). "Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations." Nature **356**(6368): 441-443.
- Hilber, K., W. Sandtner, O. Kudlacek, I. W. Glaaser, E. Weisz, J. W. Kyle, R. J. French, H. A. Fozzard, S. C. Dudley and H. Todt (2001). "The selectivity filter of the voltage-gated sodium channel is involved in channel activation." J Biol Chem **276**(30): 27831-27839.
- Hilber, K., W. Sandtner, T. Zarrabi, E. Zebedin, O. Kudlacek, H. A. Fozzard and H. Todt (2005). "Selectivity filter residues contribute unequally to pore stabilization in voltage-gated sodium channels." Biochemistry **44**(42): 13874-13882.
- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. Sunderland, Mass., Sinauer.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." J Physiol **117**(4): 500-544.
- Irie, K., K. Kitagawa, H. Nagura, T. Imai, T. Shimomura and Y. Fujiyoshi (2010). "Comparative study of the gating motif and C-type inactivation in prokaryotic voltage-gated sodium channels." J Biol Chem **285**(6): 3685-3694.
- Islas, A. A., A. Sanchez-Solano, T. Scior, L. Millan-PerezPena and E. M. Salinas-Stefanon (2013). "Identification of Navbeta1 residues involved in the modulation of the sodium channel Nav1.4." PLoS One **8**(12): e81995.
- Isom, L. L., K. S. De Jongh, D. E. Patton, B. F. Reber, J. Offord, H. Charbonneau, K. Walsh, A. L. Goldin and W. A. Catterall (1992). "Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel." Science **256**(5058): 839-842.
- Jensen, M. O., V. Jogini, M. P. Eastwood and D. E. Shaw (2013). "Atomic-level simulation of current-voltage relationships in single-file ion channels." J Gen Physiol **141**(5): 619-632.
- Kandel, E. R. (2013). Principles of neural science. New York, McGraw-Hill.
- Khodorov, B. I. (1981). "Sodium inactivation and drug-induced immobilization of the gating charge in nerve membrane." Prog Biophys Mol Biol **37**(2): 49-89.

- Khodorov, B. I., L. D. Shishkova and E. M. Peganov (1974). "Effect of procaine and calcium ions on slow sodium inactivation in the frog Ranvier node membrane." Bull Exp Biol Med **77**(3): 226-229.
- Kontis, K. J. and A. L. Goldin (1997). "Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges." J Gen Physiol **110**(4): 403-413.
- Kraner, S. D., J. C. Tanaka and R. L. Barchi (1985). "Purification and functional reconstitution of the voltage-sensitive sodium channel from rabbit T-tubular membranes." J Biol Chem **260**(10): 6341-6347.
- Lai, H. C. and L. Y. Jan (2006). "The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels." Nat Rev Neurosci **7**(7): 548-562.
- Li, H. L., A. Galue, L. Meadows and D. S. Ragsdale (1999). "A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel." Mol Pharmacol **55**(1): 134-141.
- Long, S. B., E. B. Campbell and R. Mackinnon (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K+ channel." Science **309**(5736): 897-903.
- Long, S. B., E. B. Campbell and R. Mackinnon (2005). "Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling." Science **309**(5736): 903-908.
- Long, S. B., X. Tao, E. B. Campbell and R. MacKinnon (2007). "Atomic structure of a voltage-dependent K+ channel in a lipid membrane-like environment." Nature **450**(7168): 376-382.
- Ma, Z., X. J. Lou and F. T. Horrigan (2006). "Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels." J Gen Physiol **127**(3): 309-328.
- Makita, N., P. B. Bennett and A. L. George, Jr. (1996). "Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na+ channels." J Neurosci **16**(22): 7117-7127.
- Makita, N., P. B. Bennett, Jr. and A. L. George, Jr. (1994). "Voltage-gated Na+ channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene." J Biol Chem **269**(10): 7571-7578.
- Marban, E., T. Yamagishi and G. F. Tomaselli (1998). "Structure and function of voltage-gated sodium channels." J Physiol **508 (Pt 3)**: 647-657.
- McCollum, I. J., Y. Y. Vilin, E. Spackman, E. Fujimoto and P. C. Ruben (2003). "Negatively charged residues adjacent to IFM motif in the DIII-DIV linker of hNa(V)1.4 differentially affect slow inactivation." FEBS Lett **552**(2-3): 163-169.
- McPhee, J. C., D. S. Ragsdale, T. Scheuer and W. A. Catterall (1995). "A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation." J Biol Chem **270**(20): 12025-12034.
- McPhee, J. C., D. S. Ragsdale, T. Scheuer and W. A. Catterall (1998). "A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation." J Biol Chem **273**(2): 1121-1129.
- Miller, J. A., W. S. Agnew and S. R. Levinson (1983). "Principal glycopeptide of the tetrodotoxin/saxitoxin binding protein from Electrophorus electricus: isolation and partial chemical and physical characterization." Biochemistry **22**(2): 462-470.
- Mitrovic, N., A. L. George, Jr., R. Heine, S. Wagner, U. Pika, U. Hartlaub, M. Zhou, H. Lerche, C. Fahlke and F. Lehmann-Horn (1994). "K(+)-aggravated myotonia:

destabilization of the inactivated state of the human muscle Na+ channel by the V1589M mutation." J Physiol **478 Pt 3**: 395-402.
- Mitrovic, N., A. L. George, Jr., H. Lerche, S. Wagner, C. Fahlke and F. Lehmann-Horn (1995). "Different effects on gating of three myotonia-causing mutations in the inactivation gate of the human muscle sodium channel." J Physiol **487 (Pt 1)**: 107-114.
- Moorman, J. R., G. E. Kirsch, A. M. Brown and R. H. Joho (1990). "Changes in sodium channel gating produced by point mutations in a cytoplasmic linker." Science **250**(4981): 688-691.
- Muroi, Y., M. Arcisio-Miranda, S. Chowdhury and B. Chanda (2010). "Molecular determinants of coupling between the domain III voltage sensor and pore of a sodium channel." Nat Struct Mol Biol **17**(2): 230-237.
- Noda, M., S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino and et al. (1984). "Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence." Nature **312**(5990): 121-127.
- Nuss, H. B., J. R. Balser, D. W. Orias, J. H. Lawrence, G. F. Tomaselli and E. Marban (1996). "Coupling between fast and slow inactivation revealed by analysis of a point mutation (F1304Q) in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels." J Physiol **494 (Pt 2)**: 411-429.
- O'Leary, M. E., L. Q. Chen, R. G. Kallen and R. Horn (1995). "A molecular link between activation and inactivation of sodium channels." J Gen Physiol **106**(4): 641-658.
- O'Reilly, A. O., E. Eberhardt, C. Weidner, C. Alzheimer, B. A. Wallace and A. Lampert (2012). "Bisphenol A binds to the local anesthetic receptor site to block the human cardiac sodium channel." PLoS One **7**(7): e41667.
- Papazian, D. M., X. M. Shao, S. A. Seoh, A. F. Mock, Y. Huang and D. H. Wainstock (1995). "Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K+ channel." Neuron **14**(6): 1293-1301.
- Patton, D. E., L. L. Isom, W. A. Catterall and A. L. Goldin (1994). "The adult rat brain beta 1 subunit modifies activation and inactivation gating of multiple sodium channel alpha subunits." J Biol Chem **269**(26): 17649-17655.
- Patton, D. E., J. W. West, W. A. Catterall and A. L. Goldin (1992). "Amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10905-10909.
- Patton, D. E., J. W. West, W. A. Catterall and A. L. Goldin (1993). "A peptide segment critical for sodium channel inactivation functions as an inactivation gate in a potassium channel." Neuron **11**(5): 967-974.
- Pavlov, E., C. Bladen, R. Winkfein, C. Diao, P. Dhaliwal and R. J. French (2005). "The pore, not cytoplasmic domains, underlies inactivation in a prokaryotic sodium channel." Biophys J **89**(1): 232-242.
- Payandeh, J., T. M. Gamal El-Din, T. Scheuer, N. Zheng and W. A. Catterall (2012). "Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states." Nature **486**(7401): 135-139.
- Payandeh, J., T. Scheuer, N. Zheng and W. A. Catterall (2011). "The crystal structure of a voltage-gated sodium channel." Nature **475**(7356): 353-358.
- Peters, C. H. and P. C. Ruben (2014). "Introduction to sodium channels." Handb Exp Pharmacol **221**: 1-6.

- Pless, S. A., J. D. Galpin, A. P. Niciforovic and C. A. Ahern (2011). "Contributions of counter-charge in a potassium channel voltage-sensor domain." Nat Chem Biol **7**(9): 617-623.
- Ritchie, J. M. and R. B. Rogart (1977). "The binding of labelled saxitoxin to the sodium channels in normal and denervated mammalian muscle, and in amphibian muscle." J Physiol **269**(2): 341-354.
- Rogers, J. C., Y. Qu, T. N. Tanada, T. Scheuer and W. A. Catterall (1996). "Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na+ channel alpha subunit." J Biol Chem **271**(27): 15950-15962.
- Rohl, C. A., F. A. Boeckman, C. Baker, T. Scheuer, W. A. Catterall and R. E. Klevit (1999). "Solution structure of the sodium channel inactivation gate." Biochemistry **38**(3): 855-861.
- Ruff, R. L. and S. C. Cannon (2000). "Defective slow inactivation of sodium channels contributes to familial periodic paralysis." Neurology **54**(11): 2190-2192.
- Sah, R. L., R. G. Tsushima and P. H. Backx (1998). "Effects of local anesthetics on Na+ channels containing the equine hyperkalemic periodic paralysis mutation." Am J Physiol **275**(2 Pt 1): C389-400.
- Salinas-Stefanon, E. M., E. Martinez-Morales, T. F. Scior and L. Millan-PerezPena (2011). "A residue W756 in the P-loop segment of the sodium channel is critical for primaquine binding." Eur J Pharmacol **663**(1-3): 1-8.
- Schlief, T., R. Schonherr, K. Imoto and S. H. Heinemann (1996). "Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain." Eur Biophys J **25**(2): 75-91.
- Seipel, K. and V. Schmid (2005). "Evolution of striated muscle: jellyfish and the origin of triploblasty." Dev Biol **282**(1): 14-26.
- Sheets, M. F., J. W. Kyle, R. G. Kallen and D. A. Hanck (1999). "The Na channel voltage sensor associated with inactivation is localized to the external charged residues of domain IV, S4." Biophys J **77**(2): 747-757.
- Smith, M. R. and A. L. Goldin (1997). "Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5." Biophys J **73**(4): 1885-1895.
- Sompornpisut, P., B. Roux and E. Perozo (2008). "Structural refinement of membrane proteins by restrained molecular dynamics and solvent accessibility data." Biophys J **95**(11): 5349-5361.
- Stuhmer, W. (1991). "Structure-function studies of voltage-gated ion channels." Annu Rev Biophys Biophys Chem **20**: 65-78.
- Stuhmer, W., F. Conti, H. Suzuki, X. D. Wang, M. Noda, N. Yahagi, H. Kubo and S. Numa (1989). "Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel." Nature **339**(6226): 597-603.
- Sun, Y. M., I. Favre, L. Schild and E. Moczydlowski (1997). "On the structural basis for size-selective permeation of organic cations through the voltage-gated sodium channel. Effect of alanine mutations at the DEKA locus on selectivity, inhibition by Ca2+ and H+, and molecular sieving." J Gen Physiol **110**(6): 693-715.
- Talvenheimo, J. A., M. M. Tamkun and W. A. Catterall (1982). "Reconstitution of neurotoxin-stimulated sodium transport by the voltage-sensitive sodium channel purified from rat brain." J Biol Chem **257**(20): 11868-11871.

- Tan, J., J. S. Choi and D. M. Soderlund (2011). "Coexpression with Auxiliary beta Subunits Modulates the Action of Tefluthrin on Rat Na(v)1.6 and Na(v)1.3 Sodium Channels." Pestic Biochem Physiol **101**(3): 256-264.
- Todt, H., S. C. Dudley, Jr., J. W. Kyle, R. J. French and H. A. Fozzard (1999). "Ultra-slow inactivation in mu1 Na+ channels is produced by a structural rearrangement of the outer vestibule." Biophys J **76**(3): 1335-1345.
- Townsend, C. and R. Horn (1997). "Effect of alkali metal cations on slow inactivation of cardiac Na+ channels." J Gen Physiol **110**(1): 23-33.
- Trimmer, J. S., S. S. Cooperman, S. A. Tomiko, J. Y. Zhou, S. M. Crean, M. B. Boyle, R. G. Kallen, Z. H. Sheng, R. L. Barchi, F. J. Sigworth and et al. (1989). "Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel." Neuron **3**(1): 33-49.
- Vargas, E., V. Yarov-Yarovoy, F. Khalili-Araghi, W. A. Catterall, M. L. Klein, M. Tarek, E. Lindahl, K. Schulten, E. Perozo, F. Bezanilla and B. Roux (2012). "An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations." J Gen Physiol **140**(6): 587-594.
- Vassilev, P. M., T. Scheuer and W. A. Catterall (1988). "Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation." Science **241**(4873): 1658-1661.
- Vedantham, V. and S. C. Cannon (1998). "Slow inactivation does not affect movement of the fast inactivation gate in voltage-gated Na+ channels." J Gen Physiol **111**(1): 83-93.
- Vilin, Y. Y., N. Makita, A. L. George, Jr. and P. C. Ruben (1999). "Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels." Biophys J **77**(3): 1384-1393.
- Vilin, Y. Y. and P. C. Ruben (2001). "Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies." Cell Biochem Biophys **35**(2): 171-190.
- Wang, D. W., N. Makita, A. Kitabatake, J. R. Balser and A. L. George, Jr. (2000). "Enhanced Na(+) channel intermediate inactivation in Brugada syndrome." Circ Res **87**(8): E37-43.
- Wang, S. Y. and G. K. Wang (1997). "A mutation in segment I-S6 alters slow inactivation of sodium channels." Biophys J **72**(4): 1633-1640.
- West, J. W., D. E. Patton, T. Scheuer, Y. Wang, A. L. Goldin and W. A. Catterall (1992). "A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10910-10914.
- West, J. W., T. Scheuer, L. Maechler and W. A. Catterall (1992). "Efficient expression of rat brain type IIA Na+ channel alpha subunits in a somatic cell line." Neuron **8**(1): 59-70.
- Xiong, W., R. A. Li, Y. Tian and G. F. Tomaselli (2003). "Molecular motions of the outer ring of charge of the sodium channel: do they couple to slow inactivation?" J Gen Physiol **122**(3): 323-332.
- Yarov-Yarovoy, V., D. Baker and W. A. Catterall (2006). "Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(19): 7292-7297.
- Yarov-Yarovoy, V., P. G. DeCaen, R. E. Westenbroek, C. Y. Pan, T. Scheuer, D. Baker and W. A. Catterall (2012). "Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(2): E93-102.

- Yu, F. H. and W. A. Catterall (2003). "Overview of the voltage-gated sodium channel family." Genome Biol **4**(3): 207.
- Yu, F. H., V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman and W. A. Catterall (2005). "Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily." Pharmacol Rev **57**(4): 387-395.
- Yue, L., B. Navarro, D. Ren, A. Ramos and D. E. Clapham (2002). "The cation selectivity filter of the bacterial sodium channel, NaChBac." J Gen Physiol **120**(6): 845-853.
- Zhang, X., W. Ren, P. DeCaen, C. Yan, X. Tao, L. Tang, J. Wang, K. Hasegawa, T. Kumasaka, J. He, J. Wang, D. E. Clapham and N. Yan (2012). "Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel." Nature **486**(7401): 130-134.
- Zhang, Z., Y. Xu, P. H. Dong, D. Sharma and N. Chiamvimonvat (2003). "A negatively charged residue in the outer mouth of rat sodium channel determines the gating kinetics of the channel." Am J Physiol Cell Physiol **284**(5): C1247-1254.
- Zhao, Y., T. Scheuer and W. A. Catterall (2004). "Reversed voltage-dependent gating of a bacterial sodium channel with proline substitutions in the S6 transmembrane segment." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(51): 17873-17878.