



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE FÍSICA Y MATEMÁTICAS

Dependencia con el voltaje del canal iónico de cloruro ClC-2

Tesis para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en el área de Física

Presenta:

Juan Antonio Contreras Vite

Asesor: Dr. José Antonio De Santiago Castillo

MORELIA MICHOACÁN AGOSTO DEL 2011

Dedicatoria

Para mi madre Angelina Vite Salinas por apoyarme en todo lo que emprendo, por todo su amor y comprensión.

A mis hermanos Efreñ y Bernardo, a mis sobrinos Allison, Mariana y Miguel y a mi cuñada Karla, gracias por todo su cariño.

Agradecimientos

Al Dr. José Antonio De Santiago por la dirección, el apoyo, paciencia y que me brindó para la realización de este trabajo de tesis.

A los Profesores del Instituto de Física y Matemáticas de Morelia por la gran calidad profesional y humana que me brindaron durante mis cursos de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

A mis compañeros y amigos José Juan De Jesús Pérez, Jorge Ibarra Montes y Fidel Angiaano Rodríguez por sus comentarios y sugerencias hechos a esta tesis.

Al laboratorio del Dr. Jorge Arreola Gómez del Instituto de Física de la UASLP por facilitarnos los datos experimentales necesarios para la elaboración de este trabajo.

Contenido

Contenido	IV
Resumen	VI
1 Canales Iónicos	1
1.1 Introducción	1
1.2 Activación	1
1.3 Canales activados por voltaje.	5
1.4 Mecanismo de Activación.	7
1.4.1 Modelo de dos estados.....	7
1.4.2 Modelo de n estados	10
2 Canal iónico de cloruro CIC-2	11
2.1 Introducción	11
2.2 Estructura de los canales de cloruro CIC.	12
2.3 Activación del canal iónico CIC-2 por voltaje.....	14
2.4 Activación e inhibición por cambios en la concentración de protones.....	17
2.5 Activación por cambios en la concentración de cloruro.	20
3 Planteamiento del problema y objetivos.	22
4 Resultados	23
4.1 Modelo para la inhibición	24
4.2 Apertura del canal CIC-2 por el protón.	25
4.2.1 Modelo de dos estados.....	25
4.2.2 Modelo de tres estados (C-C _H -O _H).	27
4.2.3 Modelo de tres estados (C-O _{1H} -O _{2H}).	28
4.2.4 Modelo de Niemeyer.	30

4.3	Estabilización del estado abierto por el protón.....	31
4.3.1	Modelo de tres estados (C-O-O _H).....	31
4.3.2	Modelo de cuatro estados (C-O)-(C-O) _H	34
4.4	Activación del canal ClC-2 por cloruro y protones (Modelo I).....	37
4.5	Activación del canal ClC-2 por cloruro y protones (Modelo II).	42
4.6	Acoplamiento del mecanismo de apertura y la permeación en el canal ClC-2. 46	
4.7	Discusión	48
4.8	Trabajo a futuro	49
	Referencias	50

Resumen

La apertura y cierre del canal iónico de cloruro CIC-2 es afectada por cambios en el voltaje de la membrana celular (V_m), la concentración de protones del medio extracelular ($[H^+]_e$) y la concentración de cloruro del medio intracelular ($[Cl^-]_i$). Se piensa que la sensibilidad con el voltaje en el canal CIC-2 es conferida por la unión de un protón o por el movimiento del cloruro dentro del canal, sin embargo, la contribución de estos es aún desconocida. En este trabajo estudiamos el origen de la dependencia con el voltaje del canal CIC-2. Para determinar la contribución del protón y el cloruro a la dependencia con el voltaje, se realizó un análisis cinético global, tomando como referencia registros experimentales obtenidos a diferentes valores de voltaje, concentraciones de cloruro intracelular y pH extracelular. Se encontró que la dependencia con el voltaje es conferida principalmente por el movimiento del cloruro dentro del canal y que el efecto del protón es el de estabilizar el estado abierto. Se obtuvo un esquema cinético con dependencias de V_m , $[Cl^-]_i$ y $[H^+]_e$, el modelo propuesto es único en su tipo, dado que incluye el acoplamiento de la apertura y cierre del canal con la permeación de los iones cloruro, procesos que generalmente son tratados de manera independiente.

1 Canales Iónicos

1.1 Introducción

Los canales iónicos son proteínas que se encuentran en la membrana celular y forman un poro que permite el flujo de iones a través de él. Una propiedad importante de los canales iónicos es la capacidad de seleccionar los iones que pasan a través de ellos (selectividad iónica), mediante esta característica se pueden clasificar en canales de cloruro, sodio, potasio, calcio, etc. Además de su selectividad, los canales iónicos también poseen la capacidad de cerrarse para impedir el paso de iones, por lo que los canales actúan como compuertas que se abren o se cierran en función de estímulos externos. Así, los canales iónicos también se pueden clasificar en función del tipo de estímulo que modifica su apertura o cierre en: canales activados por voltaje, canales activados por ligandos y canales mecanosensibles. En los canales activados por voltaje su apertura es modulada por cambios de voltaje de la membrana celular, en los canales activados por ligandos (activación a causa de la adhesión de alguna sustancia al canal), la apertura y cierre es controlada por la “unión” de alguna molécula, mientras que en los canales mecanosensibles su apertura y cierre es afectada por cambios en la presión que ejerce la membrana sobre ellos. Como parte de la célula, la función de los canales iónicos es la de permitir el intercambio de iones entre el interior y el exterior de la membrana celular. El flujo de iones a través de la membrana celular juega un rol preponderante en la generación y transmisión de señales eléctricas en las células excitables ¹. La transmisión de señales eléctricas es un mecanismo por el cual las células inician y regulan importantes funciones tales como la secreción de hormonas, la contracción muscular, los latidos del corazón y la comunicación entre neuronas.

1.2 Activación.

El mecanismo de apertura y cierre de los canales iónicos es conocido como “*gating*”. Una manera de estudiar la apertura (activación) y cierre de los canales iónicos, es mediante el análisis de las corrientes que pasan a través de ellos. La corriente de los canales iónicos se puede registrar mediante la técnica de “Patch-Clamp” ². Ésta técnica tiene dos modalidades:

fijación de voltaje y fijación de la corriente. En la modalidad fijación de voltaje, se mantiene constante la diferencia de potencial eléctrico en la membrana de la célula y se registra la corriente que pasa por ésta. Existen varias configuraciones de esta modalidad, incluyendo célula completa y micro áreas de membranas. La configuración de célula completa permite el registro de la corriente que fluye a través de miles de canales, mientras que el uso de micro áreas de membranas permite registrar la corriente de un sólo canal.

En la Figura 1.1 se muestra la simulación de la corriente de un canal activado por voltaje sujeto a diferentes estímulos. Como se puede apreciar en la figura, existen dos niveles de conducción en cada caso. Para el estímulo de voltaje de -30mV el canal permanece periodos de tiempo largos en el estado cerrado, en contraste, para estímulos de voltaje de -200mV el canal permanece largos periodos de tiempo en el estado abierto. Los tiempos que el canal permanece en cada uno de sus estados son aleatorios. Esto se debe a que el canal es una molécula que tiene muchas configuraciones o estados físicos y la transición de un estado a otro está relacionada con el movimiento térmico molecular, esto en sí, es un fenómeno aleatorio. Es importante mencionar que muchos de los estados de la molécula no tienen ningún impacto en la apertura o cierre del canal.

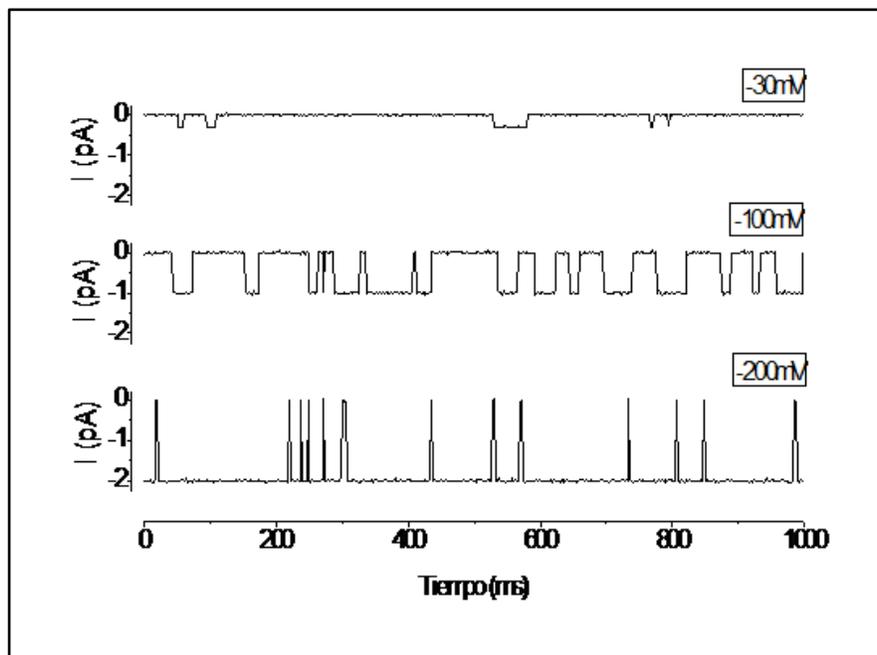


Figura 1.1. Simulación de la corriente de canal único para diferentes estímulos de voltaje sobre la membrana celular. Para este canal, la probabilidad de apertura es favorecida por voltajes negativos.

Los tiempos de permanencia en uno u otro estado dependen de la barrera de energía que se requiere superar para pasar de un estado a otro. Las barreras de energía asociadas a los cambios de estado provienen de diversos factores, por ejemplo, impedimentos estéricos entre grupos dentro de la molécula o interacciones entre cargas eléctricas. En la Figura 1.2 se muestra un esquema de barreras de energía para un canal con dos estados.

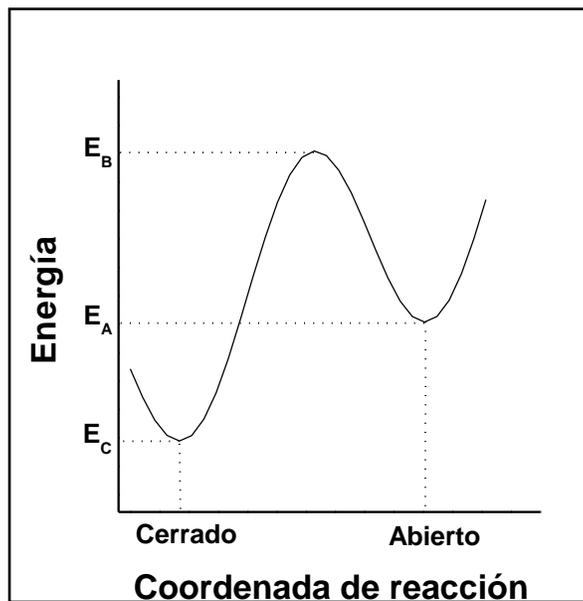


Figura 1.2. La probabilidad de pasar de un estado a otro dependerá del tamaño de la barrera de energía que separa los estados, la probabilidad de ocupación de cada uno de los estados depende del valor relativo de su energía, en este caso, el estado con mayor probabilidad es el estado cerrado.

La probabilidad de apertura (P_A) es una propiedad fundamental para entender el mecanismo de activación de los canales iónicos, esta probabilidad se puede obtener mediante registros de corrientes de canal único y corrientes macroscópicas. Para registros de corriente de canal único, la probabilidad de apertura es igual a la fracción de tiempo que el canal permanece abierto. De manera análoga se puede determinar la probabilidad de que el canal este en el estado cerrado (P_C). En la Figura 1.3 se muestra la probabilidad de apertura en función del voltaje obtenida usando corrientes de canal único como los mostrados en la Figura 1.1. En este caso, la probabilidad de apertura del canal es favorecida por voltajes negativos, mientras que voltajes positivos tienden a mantener al canal en su estado cerrado.

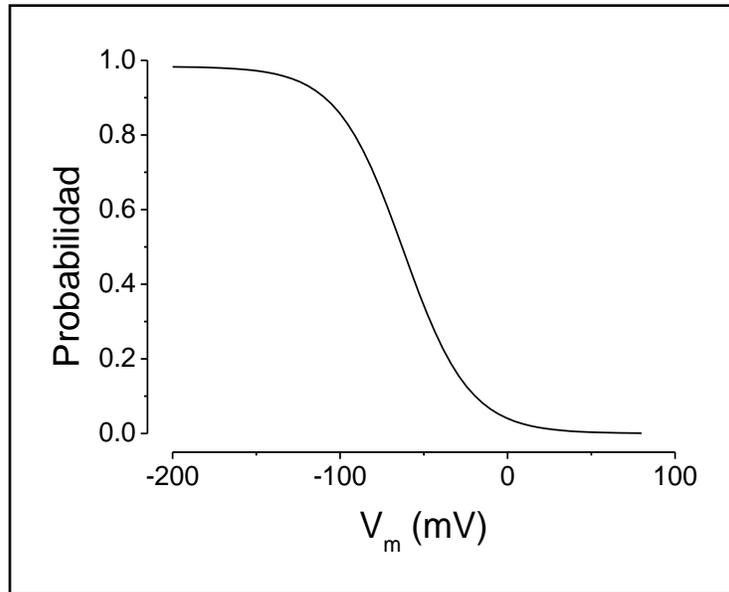


Figura 1.3. Probabilidad de apertura en función del voltaje de membrana.

Una forma alternativa de estudiar la activación de los canales iónicos es mediante el registro de la corriente que pasa por todos los canales que se encuentran sobre la membrana de una célula, a esta corriente se le denomina corriente macroscópica. La corriente macroscópica a diferencia de la corriente de canal único tiene un comportamiento suave cuando el número de canales es grande. En la Figura 1.4 se ilustra la transición de la corriente de canal único a la corriente macroscópica, como se puede apreciar, la corriente es ruidosa cuando el número de canales es pequeño, a medida que el número de canales incrementa, la corriente tiende a cambiar de manera suave.

En la mayoría de los canales iónicos en condiciones fisiológicas, la corriente de canal único tiene un comportamiento óhmico, mientras que la corriente macroscópica depende de la probabilidad de apertura del canal y del número de canales:

$$I = N * g * V_m * P_A \quad (1.1)$$

En esta ecuación N es el número de canales, g es la conductancia de canal único y V_m es el voltaje de la membrana.

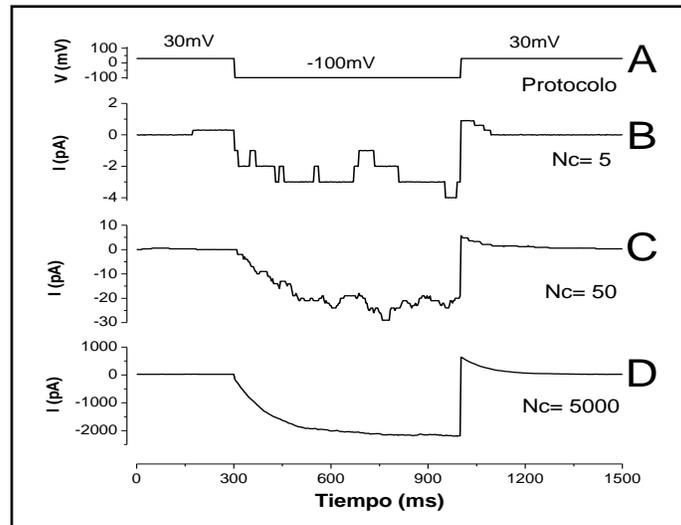


Figura 1.4. Transición de la corriente de canal único a la corriente macroscópica. En A se muestra el protocolo de voltajes aplicado, B y C muestran cómo cambia la corriente en relación al número de canales y finalmente en D se observa la corriente registrada para un gran número de canales

1.3 Canales activados por voltaje.

En la mayoría de los canales iónicos activados por voltaje, la sensibilidad con el potencial de membrana proviene de aminoácidos cargados dentro de la proteína. En la Figura 1.5 se muestra una caricatura de un canal activado por voltaje. Este canal tiene dos cargas positivas, el movimiento de estas cargas puede favorecer un cambio de conformación de la proteína que lleve al canal a su estado cerrado o abierto, esto depende de la dirección en que estas cargas se muevan. El movimiento de estas cargas es afectado por la dirección del campo eléctrico aplicado. Para este canal, cuando la diferencia de potencial en el interior de la célula es negativa (respecto al exterior de la célula), la carga de la proteína tenderá a favorecer el estado cerrado del canal, mientras que en una diferencia de potencial positiva, la carga favorecerá el estado abierto.

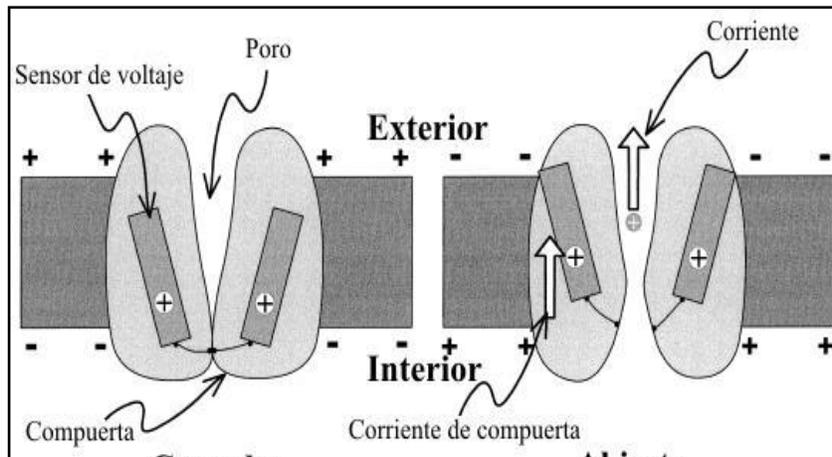


Figura 1.5. Los canales iónicos dependientes del voltaje tienen cargas que responden a la diferencia de potencial en la membrana (V_m). En el primer caso se muestra un canal cerrado debido a la diferencia de potencial eléctrico negativa. En el segundo se muestra el canal abierto para un potencial positivo.

Sin embargo, existen canales iónicos activados por voltaje, cuya sensibilidad se la confieren ligandos cargados que se unen a partes internas del canal, en este caso la unión del ligando se ve favorecida o reprimida por el voltaje de membrana (Figura 1.6). Se piensa que en los canales iónicos CIC, la sensibilidad con el voltaje proviene de la unión del protón con el canal y/o del movimiento de los iones cloruro dentro del canal.

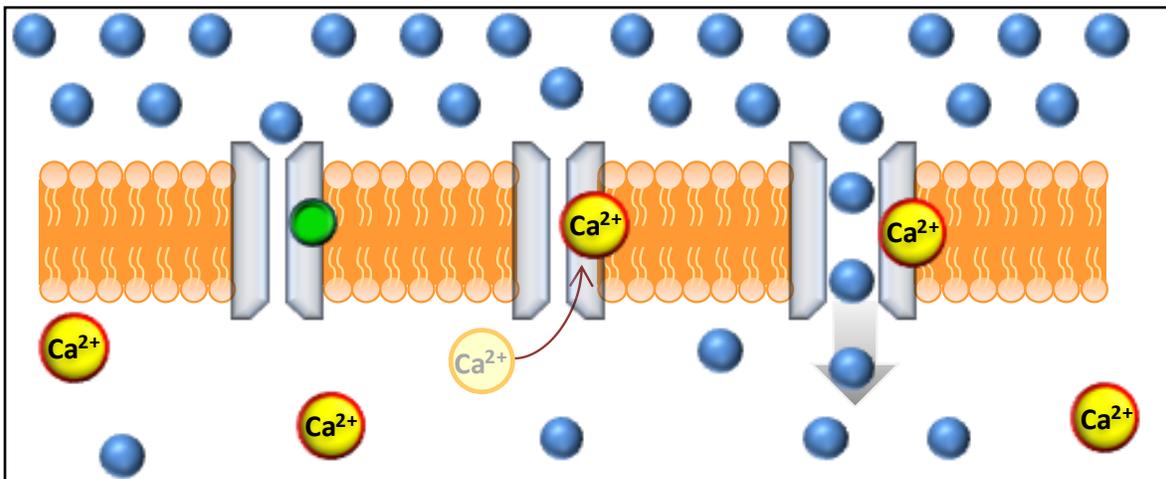


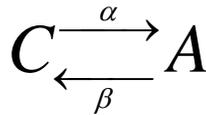
Figura 1.6. Ilustración de un canal iónico activado por Ca^{2+} . Para este canal, el sitio de unión del calcio se encuentra en la parte interna del canal, por lo que la probabilidad de ocupación del sitio depende del voltaje de membrana.

1.4 Mecanismo de Activación.

El estudio de los diferentes cambios conformacionales que ocurren en el canal y sus transiciones se conoce como mecanismo de activación, el mecanismo de apertura se puede estudiar al analizar las corrientes que pasan por el canal iónico y compararlas con las predicciones de modelos cinéticos.

1.4.1 Modelo de dos estados

El modelo cinético más simple que puede describir la corriente de un canal iónico con una compuerta, es un modelo de dos estados (abierto y cerrado). Este modelo se puede representar mediante el siguiente esquema:



Esquema 1

Donde A representa el estado abierto, C representa el estado cerrado, α y β representan las frecuencias de transición (también denominadas constantes de velocidad) del estado cerrado al abierto y del estado abierto al estado cerrado, respectivamente.

A partir del esquema cinético mostrado arriba y de la definición de constantes de velocidad, es posible encontrar las probabilidades de que el canal se encuentre en el estado cerrado o abierto en función del tiempo. El cambio en la probabilidad de apertura (P_A) y la probabilidad de cierre (P_C) se pueden escribir como:

$$\frac{dP_A}{dt} = -\beta * P_A + \alpha * P_C \quad (1.2)$$

$$\frac{dP_C}{dt} = \beta * P_A - \alpha * P_C \quad (1.3)$$

Las constantes de velocidad pueden ser función del voltaje y/o ligandos, cuando el voltaje y/o ligandos se mantienen fijos, α y β son constantes y se encuentra que:

$$P_A(t) = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} - \left[\frac{\alpha}{\alpha + \beta} - P_A(0) \right] * \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1.4)$$

Donde τ es la constante de tiempo dada por:

$$\tau = \frac{1}{\alpha + \beta} \quad (1.5)$$

De acuerdo a la ecuación (1.4) cuando el tiempo (t) tiende a infinito se obtiene:

$$P_{A\infty} = \frac{\alpha}{\alpha + \beta} \quad (1.6)$$

Esta expresión representa el comportamiento de la probabilidad de apertura en el estado estacionario.

La frecuencia con la que el canal transita de un estado al otro depende de la barrera de energía entre tales estados (Figura 1.2), por ejemplo, si la barrera energética entre los dos estados es pequeña las frecuencia de las transiciones (o constante de velocidad) entre los estados será grande, por el contrario, si la barrera energética es grande la frecuencia será pequeña. Las constantes de velocidad también dependen de la energía que la molécula tiene disponible para saltar la barrera, es decir, la temperatura. Cuantitativamente lo anterior se describe mediante la ecuación de *Arrhenius*.

$$\alpha = \mu * \exp\left(-\frac{(E_B - E_C)}{kT}\right) \quad (1.7)$$

$$\beta = \mu * \exp\left(-\frac{(E_B - E_A)}{kT}\right) \quad (1.8)$$

Donde k es la constante de *Boltzmann*, T es la temperatura, μ es un factor constante, $(E_B - E_C)$ y $(E_B - E_A)$ es el tamaño de las barreras de energía (Figura 1.3).

En los canales voltaje-dependientes la velocidad de transición entre estados depende del voltaje de membrana y la carga del sensor de voltaje. El voltaje modifica las barreras de energía y por consecuencia las constantes de velocidad. La contribución del voltaje de membrana en las velocidades de transición está dada de la siguiente manera:

$$\alpha(V) = \mu^* \exp \left[- \left(E_B - E_C + q \frac{\Delta x_C}{l_m} V_m \right) / kT \right] \quad (1.9)$$

donde x_C es la distancia desde el mínimo en la posición de cerrado y el máximo de energía, mientras que l_m es el ancho de la membrana y q es la carga de la compuerta.

Si llamamos $\alpha_0 = \mu^* \exp[-(E_B - E_C)/kT]$, $z_C e = q \frac{\Delta x_C}{l_m}$ y $\frac{e}{kT} = \frac{F}{RT}$ entonces:

$$\alpha(V) = \alpha_0^* \exp \left(- z_C \frac{FV_m}{RT} \right) \quad (1.10)$$

Donde e es la carga del electrón y F la constante de *Faraday*.

De la misma manera:

$$\beta(V) = \beta_0^* \exp \left(z_A \frac{FV_m}{RT} \right) \quad (1.11)$$

De esta forma si z_A es positiva, un potencial positivo disminuye α y aumenta β .

1.4.2 Modelo de n estados

En general, los canales iónicos poseen más de dos estados conformacionales. Para un canal que puede transitar entre n estados, el curso temporal de la probabilidad de ocupación de cada uno de los estados es descrita por un sistema de n ecuaciones diferenciales acopladas:

$$\frac{dP(t)}{dt} = P(t) * Q(t) \quad (1.12)$$

Donde $P(t)$ es un vector renglón de dimensión $1 \times n$ y $Q(t)$ es una matriz de dimensión $n \times n$. El elemento q_{ij} de esta matriz representa la constante de velocidad asociada con la transición del estado i al estado j . Los elementos de la diagonal se obtienen mediante la siguiente ecuación:

$$\lambda_{ii} = \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^n q_{ij} \quad (1.13)$$

2 Canal iónico de cloruro CIC-2

2.1 Introducción

El canal iónico de cloruro CIC-2 pertenece a la familia de las proteínas CIC. Las proteínas CIC, son un grupo constituido por canales iónicos e intercambiadores. A pesar de que ambas proteínas permiten el cruce de iones cloruro a través de la membrana celular, funcionan de formas muy diferentes ³. El proceso de migración de los iones en los canales iónicos es por electrodifusión, y dicho proceso es regulado por un mecanismo de apertura y cierre (*gating*). Por otra parte, en los intercambiadores la migración de iones es a través de cambios conformacionales de la proteína y no debido a un proceso electrodifusivo.

Los canales iónicos de cloruro (canales CIC) están formados por las proteínas CIC-0, CIC-1, CIC-2, CIC-K₁ y CIC-K₂. El primer canal que se identificó de este grupo fue el CIC-0. Este canal se expresa en células del órgano eléctrico del pez torpeda ⁴. Posterior al descubrimiento del CIC-0, se pudieron identificar en mamíferos a los canales CIC-1, CIC-2, CIC-K₁ y CIC-K₂. En los seres humanos estas proteínas se encuentran en diversos órganos y tejidos, por ejemplo, el canal CIC-1 se encuentra en células musculo-esqueléticas ⁵, mientras que el CIC-2 se encuentra en células del cerebro, corazón, pulmones y páncreas ⁶. Los canales CIC-K₁ y CIC-K₂ se expresan en los riñones ⁷. Las proteínas CIC desempeñan numerosas funciones fisiológicas. Por ejemplo, el CIC-1 controla el potencial de reposo en las células músculo esqueléticas ⁸. El CIC-2 es fundamental para mantener un gradiente de concentraciones de cloruro en las neuronas, así como para la secreción de fluidos en el tracto gastrointestinal ⁹. Los canales CIC-K₁ y CIC-K₂ son importantes en el transporte epitelial de cloruro.

Un aspecto importante en el estudio de los canales iónicos tiene que ver con las canalopatías (enfermedades asociadas con los canales iónicos). Se ha demostrado que mutaciones de los genes que codifican a los canales iónicos están asociadas a algunas enfermedades ¹⁰. Por ejemplo, la miotonía humana (la miotonía es una enfermedad que se caracteriza por la dificultad de relajar los músculos después de una contracción) es causada por mutaciones en los genes que codifican para el CIC-1.

2.2 Estructura de los canales de cloruro CIC.

Los canales más estudiados electrofisiológicamente de esta familia son el CIC-0 y el CIC-1. De registros de corriente de canal único y corriente macroscópica se ha concluido que estos canales tienen dos tipos de compuertas. Estas son la compuerta del poro y la compuerta común ¹¹. Cada poro tiene una compuerta de poro que por su cinética también se conoce como compuerta rápida, estas compuertas impiden o permiten el paso de los iones en cada uno de los poros. Además de éstas, el canal cuenta con una compuerta común o compuerta lenta que tiene la capacidad de abrir o cerrar los dos poros simultáneamente. Una caricatura del modelo propuesto para los canales de la familia CIC se muestra en la Figura 2.1.

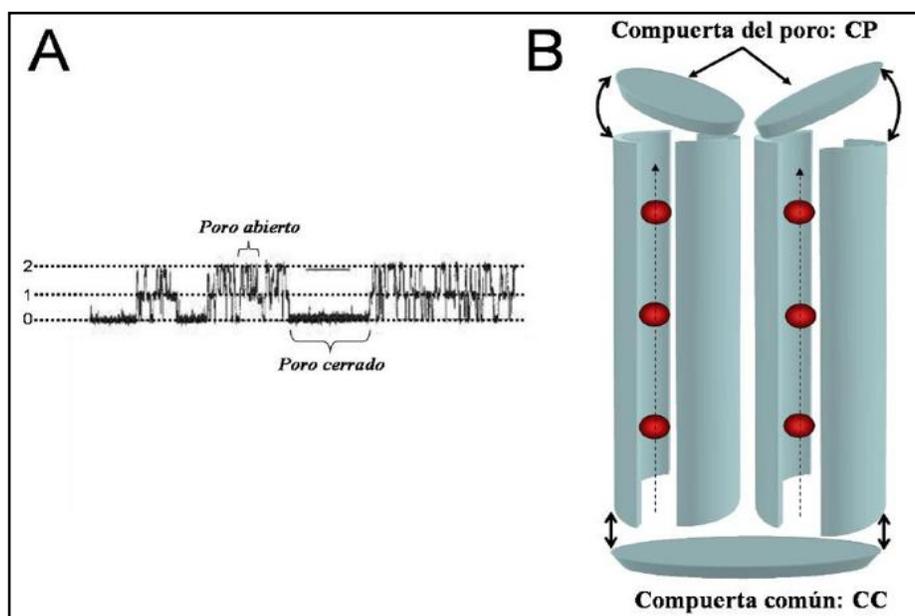


Figura 2.1. En A se muestra un registro de corriente de canal único del CIC-0, este registro está formado por tres niveles de conducción 0,1 y 2. En la parte B se ilustran los dos tipos de compuertas del canal CIC-0.

Un hecho fundamental para entender el mecanismo de activación de los canales de cloruro CIC, fue la obtención de la estructura cristalográfica del intercambiador CIC de la bacteria *Escherichia coli* (EcCIC) a una resolución de 3.5 \AA ¹², ver Figura 2.2. El EcCIC es un contra-transportador cloruro-protón con una estequiometría $2Cl/1H^+$ ¹³. La estructura cristalina de la EcCIC, corroboró la idea del modelo de doble barril propuesto por Miller varios años atrás ¹⁴. En la estructura cristalográfica se observó que la proteína EcCIC está formada por dos sub-unidades idénticas localizadas en la *membrana plasmática*. Cada sub-

unidad contiene 18 α -hélices las cuales forman una estructura de poro. Dentro de la región del poro existen tres sitios a los cuales el ion cloruro puede unirse ¹⁵. Estos sitios de unión se denominan S_{int} , S_{cen} y S_{ext} (Figura 2.3-A). El sitio S_{int} se encuentra situado sobre la superficie que limita el poro del canal con el *medio intracelular*, mientras que el sitio S_{ext} está ubicado muy cerca al medio extracelular. En el intercambiador silvestre EcCIC (*wt*-EcCIC) de la Figura 2.3-A se observa que la cadena lateral del ácido glutámico, en la posición 148 (E148), ocupa el sitio S_{ext} bloqueando la trayectoria de permeación del Cl^- . Al mutar el E148 con una glutamina (E148Q) y posteriormente al resolver la estructura atómica se observó que la cadena lateral de Q gira de tal manera que permite que un ion Cl^- pueda unirse al sitio S_{ext} (estructura E148Q-EcCIC de la Figura 2.3-A). De este dato estructural se origina la hipótesis de que la apertura del poro del canal se debe a un giro de la cadena lateral del ácido glutámico formando la compuerta del poro.

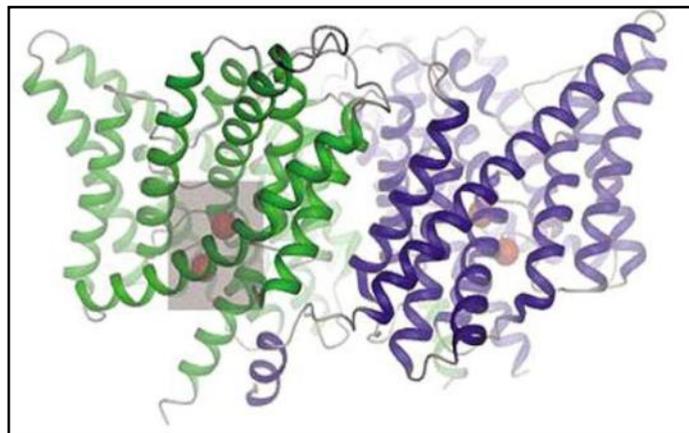


Figura 2.2. Estructura molecular del intercambiador Cl^-/H^+ EcCIC basada en datos de difracción de rayos X: un modelo para la estructura de los canales CIC. La proteína funcional es un homo-dímero (verde y azul) con un poro en cada sub-unidad. Los iones que pasan por cada poro, dos en este caso, están representados por esferas rojas. Tomada de *Dutzler, 2002*.

A pesar que la estructura cristalográfica obtenida por *Dutzler* y sus colegas corresponde a la de un contra-transportador Cl^-/H^+ , el cristal EcCIC es un buen modelo para canales CIC. *Dutzler* y sus colegas compararon la secuencia de la estructura secundaria del EcCIC alineándola con el resto de las secuencias de los miembros de la familia CIC. Encontraron que la región que codifica el poro (16 aminoácidos, incluyendo el ácido glutámico) para cada uno de los miembros de la familia de canales CIC se conservaba con una homología del 87.5%, lo que hace pensar que esta estructura tridimensional se conserva

en el resto de los canales tipo CIC. A partir del hecho de que la región que forma la ruta de permeación del ion Cl^- se conserva en los demás miembros de la familia de los CIC, se sugirió que esta estructura es un buen modelo para el poro de los canales tipo CIC, incluyendo el CIC-2 como lo propuso recientemente *Niemeyer* y sus colegas (2009).

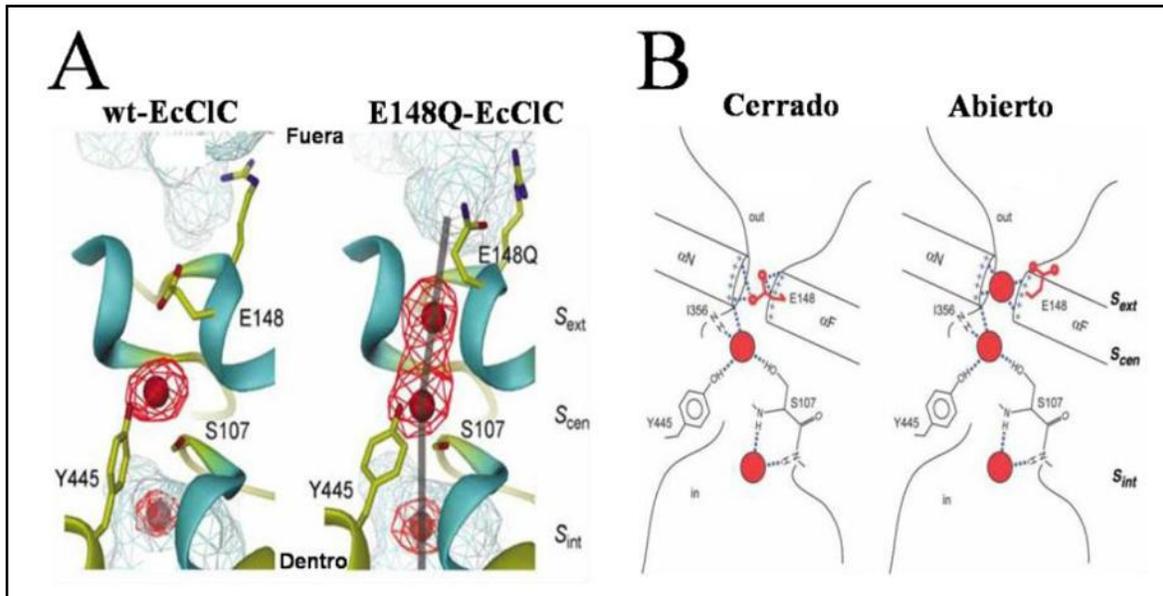


Figura 2.3. Modelo para la apertura del poro de los canales de cloruro CIC. A: estructura del poro del EcCIC silvestre en el estado cerrado (lado izquierdo). Nótese que el grupo COO⁻ de E148 está posicionado en la ruta de conducción. La estructura de la mutante E148Q se muestra a lado derecho y representa el estado abierto del poro. Se indica la localización de los sitios de unión del ion Cl⁻ (S_{int} , S_{cen} y S_{ext}). Para este caso, la cadena lateral de Q está casi alineada con la pared del poro muy cerca del agua extracelular y ha dejado la ruta de conducción libre, además que un Cl⁻ ocupa el sitio S_{ext} donde se encontraba el grupo COO⁻ de E148. **B:** Representación esquemática de los estados cerrados y abiertos del canal, modelados a partir de los datos cristalográficos mostrados en A. Tomadas de *Dutzler*, 2003.

2.3 Activación del canal iónico CIC-2 por voltaje.

En la Figura 2.4-B, se grafica la corriente del canal CIC-2 cuando se aplican los escalones de voltaje mostrados en la Figura 2.4-A. En este estímulo, la membrana de la célula se mantiene a un potencial de 30mV, después se aplica un escalón a 80mV y finalmente se pone a un potencial de 60mV. Como se puede ver, no se obtiene corriente a través de la membrana. Esto podría deberse a que la probabilidad de apertura de estos canales a los potenciales 30, 80 y 60mV es cero o que la conductancia de los canales abiertos es muy pequeña para esos potenciales. En la Figura 2.4-C, se muestran escalones de potencial. La respuesta de la célula a estos escalones se muestra en la Figura 2.4-D. En este caso, se observa un aumento gradual en la magnitud de la corriente cuando se fija el voltaje a -

140mV. Este aumento termina cuando se llega a su estado estacionario cerca de los 400ms después de aplicar este escalón de voltaje. El signo negativo de la corriente implica que el Cl^- está saliendo de la célula. Debido a que la corriente es diferente de cero para éste voltaje. El curso temporal de la corriente se debe a un incremento en la probabilidad de apertura de los canales en función del tiempo. Cuando el potencial se cambia a +60mV se observa una corriente de polaridad opuesta que disminuye con el tiempo. En este caso, el signo positivo de la corriente implica que el Cl^- está entrando a la célula. De estos datos se concluye que el canal deja pasar a los iones de cloruro en ambas direcciones y que la ausencia de corriente a potenciales positivos se debe a que la probabilidad de apertura es muy pequeña.

En la Figura 2.5 se muestra el comportamiento de este canal en un rango de potenciales más amplio. En la Figura 2.5-B se muestran las corrientes obtenidas al aplicar el protocolo mostrado en la Figura 2.5-A. Como se puede apreciar de la Figura 2.6, la corriente que pasa a través de los canales CIC-2 es apreciable sólo para voltajes menores que -40mV.

En la Figura 2.6-A, se grafica la corriente normalizada en función del voltaje. Esta corriente se obtuvo justo antes de terminar el primer escalón del protocolo, ver Figura 2.6-B (599ms). A potenciales positivos no se obtiene corriente tal como se ve de la Figura 2.6. Sin embargo, a medida que la membrana se va hiperpolarizando, la magnitud de la corriente incrementa casi de manera lineal. Debido a este comportamiento, se dice que el canal CIC-2 es un rectificador entrante. En la Figura 2.6, se muestra la probabilidad de apertura aparente obtenida al inicio del escalón a 60mV (601ms). De esta figura, se puede ver que la probabilidad de apertura es cero para potenciales positivos y que alcanza su valor máximo a potenciales muy negativos cercanos a los -200mV. Con línea continua se muestra un ajuste utilizando la ecuación de *Boltzmann*.

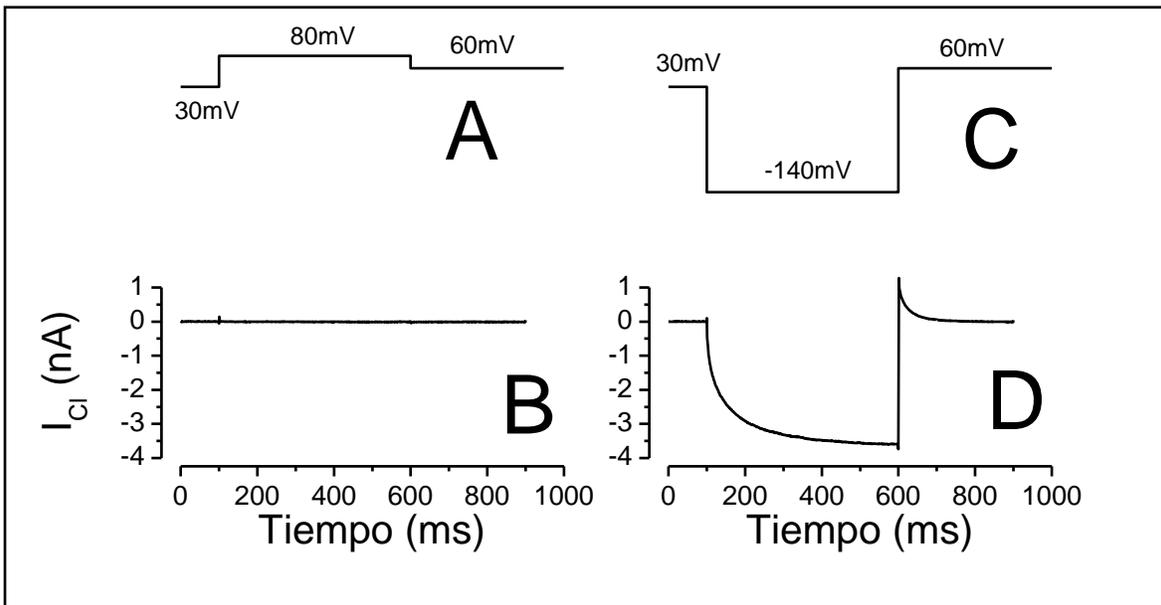


Figura 2.4. Protocolos de estimulación y corrientes resultantes para el canal CIC-2. A y C ilustran dos protocolos de estímulos para generar la corrientes correspondientes que se ilustran en B y D respectivamente. En el primer caso el voltaje se cambió desde un potencial de mantenimiento de +30mV hasta +80mV y luego se regresó a +60mV. El registro respectivo muestra la ausencia de actividad eléctrica ante este pulso. Sin embargo, cambiando el potencial a -140, se observa un incremento gradual en la corriente misma que alcanza un valor estacionario al final del pulso (600ms). Esto se debe a que ahora los canales se han abierto y dejan pasar el Cl⁻. La corriente negativa representa la salida del Cl⁻ de la célula. Al final del pulso de -140mV los canales todavía están abiertos, por tal razón al cambiar rápidamente el potencial a +60mV cambiamos la polaridad de la fuerza impulsora para el Cl⁻, lo que resulta ahora en entrada de Cl⁻, misma que se observa como corriente positiva. Sin embargo, la corriente no es sostenida, ésta decae a cero. Esto se debe a que a este potencial la probabilidad de apertura de los canales es cero.

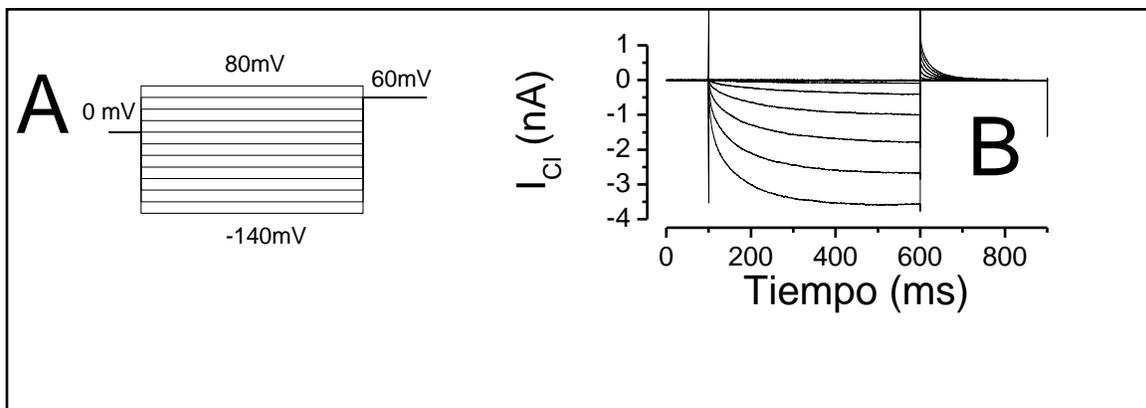


Figura 2.5. Corriente macroscópica a través de los canales CIC-2. En A se muestra el protocolo usado para obtener los registros de corriente graficados en B. En todos los casos la célula se mantuvo a 0mV y después se aplicaron escalones de potencial desde -140 hasta 80mV con incrementos de 20mV, seguido de un escalón a 60mV.

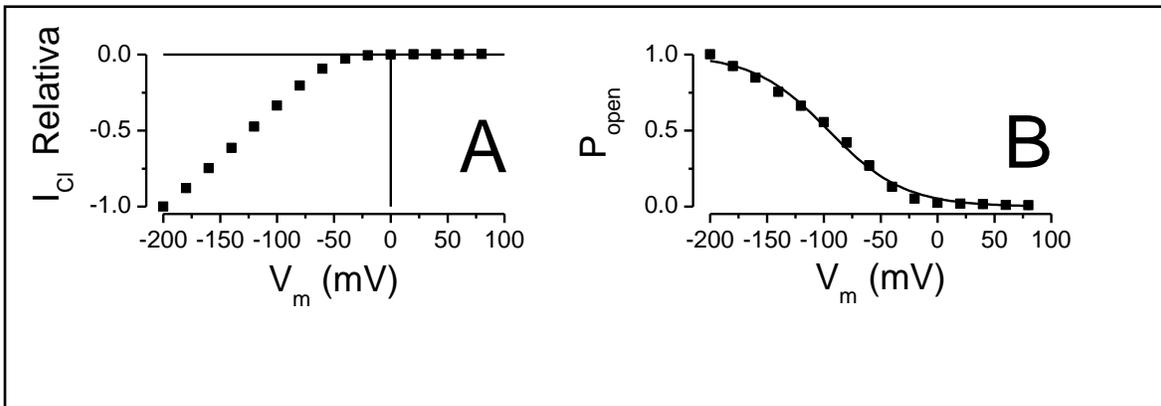


Figura 2.6. Dependencia con el voltaje del canal CIC-2. En A se muestra la curva I vs V_m . La corriente obtenida al final de los escalones de potencial (599ms) mostrados fue normalizada utilizando la corriente registrada a -200mV. En B se grafica la probabilidad de apertura aparente (símbolos) y el ajuste usando la Boltzmann.

2.4 Activación e inhibición por cambios en la concentración de protones.

Varios experimentos han sido hechos para estudiar la dependencia que tiene el mecanismo de apertura de este canal por efecto de cambios en las concentraciones de protones del medio intracelular y extracelular ^{16,17}. Los resultados más notables se obtienen cuando se modifican las concentraciones de protones del medio extracelular ($[H^+]_e$), mientras que los cambios en las concentraciones del medio intracelular ($[H^+]_i$) no han mostrado efectos fuertes en el mecanismo de apertura. En la Figura 2.7-B se muestra la corriente obtenida para diferentes concentraciones de protones y en la Figura 2.7-A se grafica la conductancia. Como se puede apreciar el valor máximo de apertura se obtiene cuando el pH es 6.4, mientras que para valores más grandes (pH=10) y para valores pequeños (pH=5.5) la conductancia tiende a disminuir. Esta observación se aprecia de manera más clara cuando se grafica la conductancia normalizada en función del pH. En la Figura 2.8 se puede ver que para cualquier voltaje, la conductancia incrementa cuando el pH se reduce de 10 a 6.4, pero disminuye cuando el pH se reduce de 6.4 a 4.8. Esos resultados son compatibles con la existencia de dos sitios de unión para el protón: S_1 y S_2 ¹⁶. El sitio S_1 corresponde al ácido glutámico E213, el cual forma la compuerta del poro, mientras que el sitio S_2 recientemente fue identificado como la histidina H538 que se localiza en el vestíbulo extracelular de la proteína ¹⁷. La protonación del sitio S_2 produce una disminución en la conductancia conocida como inhibición, mientras que la protonación del sitio S_1 favorece la apertura del canal (Figura 2.9).

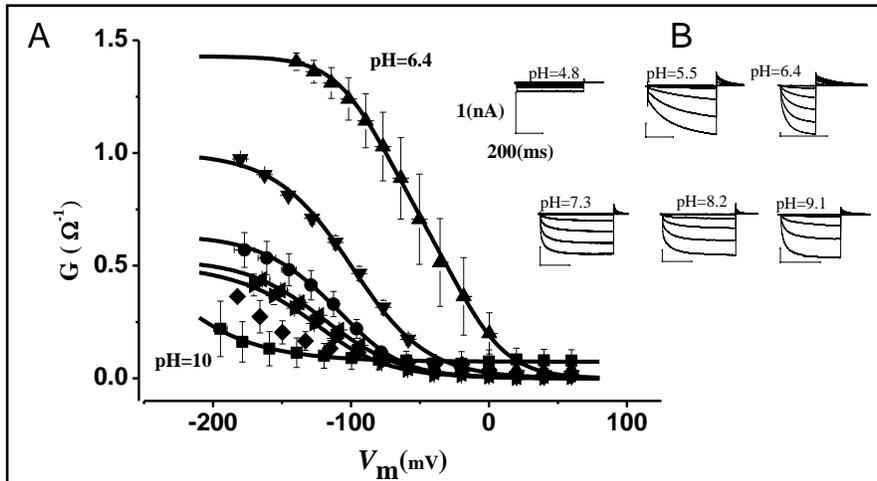


Figura 2.7. Efecto del pH externo sobre la conductancia del canal de cloruro ClC-2. En A: Curvas de G vs V_m para los diferentes pH externos. En B se muestran trazos representativos de corriente iónica expuesta al pH que se indica en la parte superior de cada registro. Las corrientes fueron registradas utilizando el protocolo de voltaje que se muestra en figura 2.2A. En todos los casos: $pH_i=7.3$ y $[Cl^-]_i=[Cl^-]_e=140mM$.

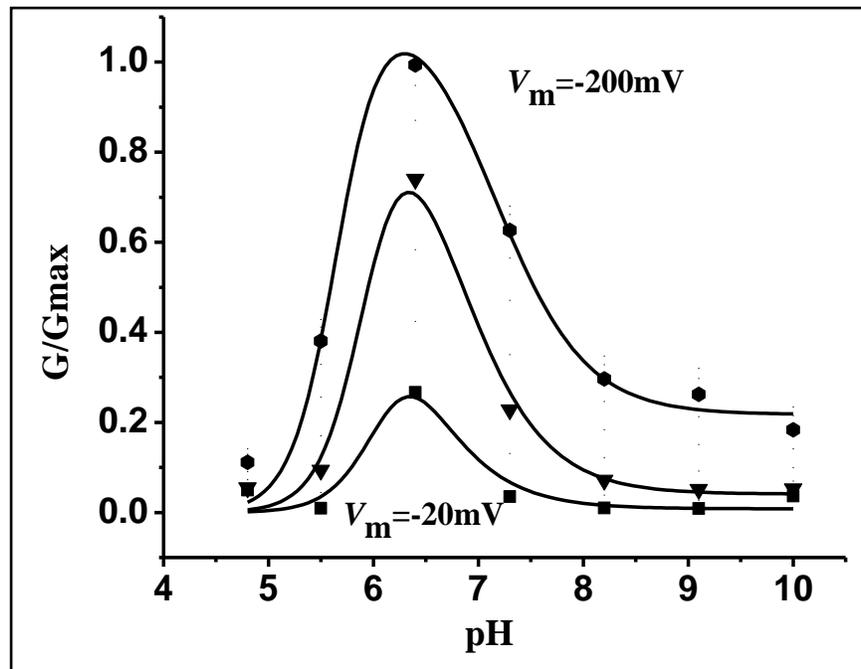


Figura 2.8. Conductancia en función del pH extracelular. Cuando la concentración de protones se incrementa (se disminuye el pH) la conductancia aumenta hasta alcanzar un máximo alrededor de 6.4, a partir de ahí la conductancia disminuye.

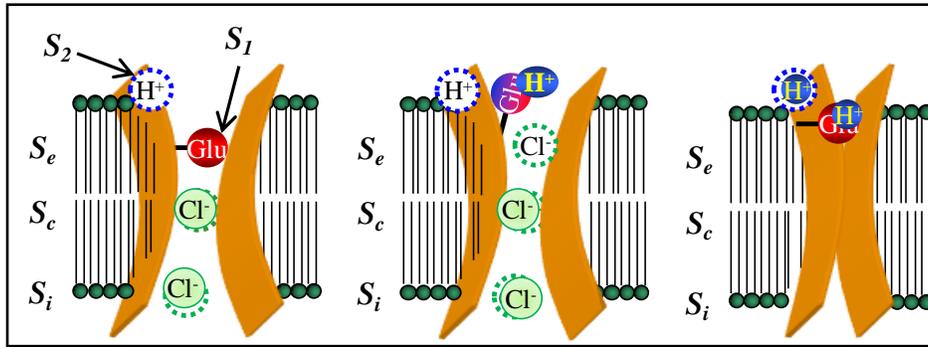


Figura 2.9. Efecto de la protonación de los dos sitios en la apertura del canal. A) Cuando el sitio S_1 está desocupado el canal está cerrado. B) Cuando el sitio S_1 está ocupado y el sitio S_2 está desocupado el canal está abierto. C) Cuando el sitio S_2 está ocupado el canal esta inhibido.

Además de los cambios en la conductancia en el estado estacionario, los cambios en el pH también modifican de manera importante la velocidad con la que los canales iónicos se cierran, este efecto se muestra en la Figura 2.10, donde se grafica la conductancia normalizada para diferentes valores de pH, se aprecia el tiempo necesario para que el canal se cierre y es aumentado cuando se disminuye el pH, esto se observa en la Figura 2.10-B, donde se grafican las constantes de tiempo en función del pH.

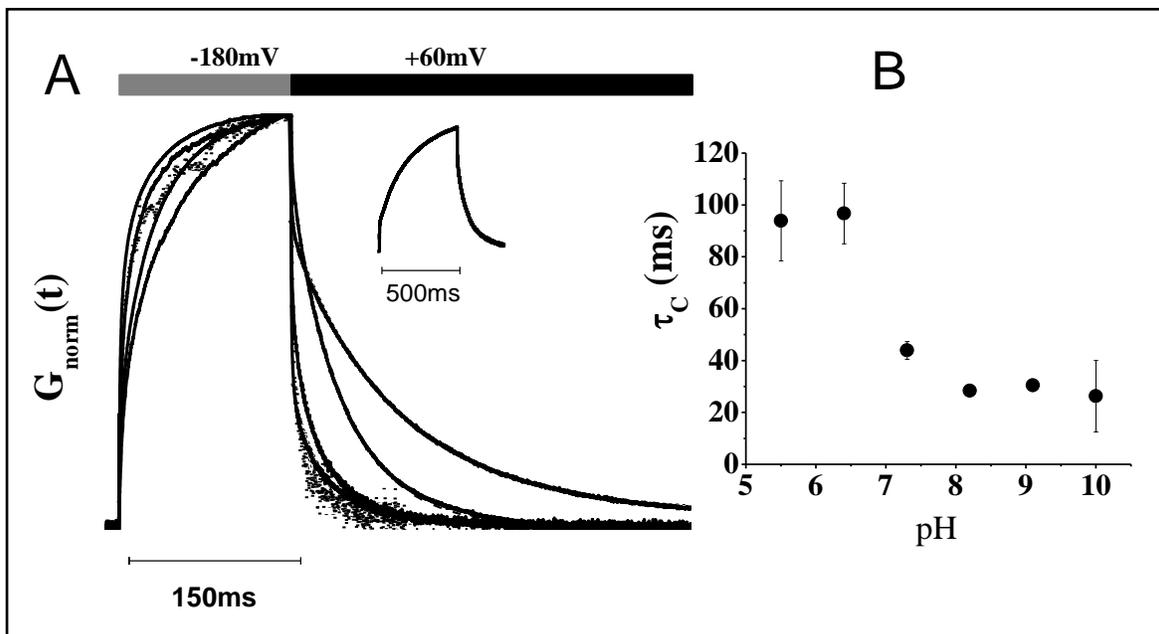


Figura 2.10. Efectos cinéticos que produce la variación de pH externo sobre la apertura y cierre del CIC-2. En A, curso temporal de la conductancia normalizada para los valores de pH. B, constantes de tiempo del cierre del canal en función del pH.

2.5 Activación por cambios en la concentración de cloruro.

La apertura del canal CIC-2 depende del voltaje, del pH y de la concentración de cloruro intracelular ($[Cl^-]_i$). En la Figura 2.11 se grafica la conductancia normalizada para distintas concentraciones de cloruro intracelular que van desde 10mM hasta 140mM. Como se puede observar, la disminución de la concentración de cloruro intracelular provoca un corrimiento de la curva de conductancia hacia voltajes negativos.

El aumento en la concentración de cloruro intracelular también modifica la cinética del canal CIC-2, en la Figura 2.12-A se grafica la conductancia normalizada para diferentes concentraciones de cloruro, así observamos que el incremento en la concentración de cloruro intracelular disminuye la velocidad con la que el canal se cierra, este efecto es similar al observado al disminuir el pH (Figura 2.10-B).

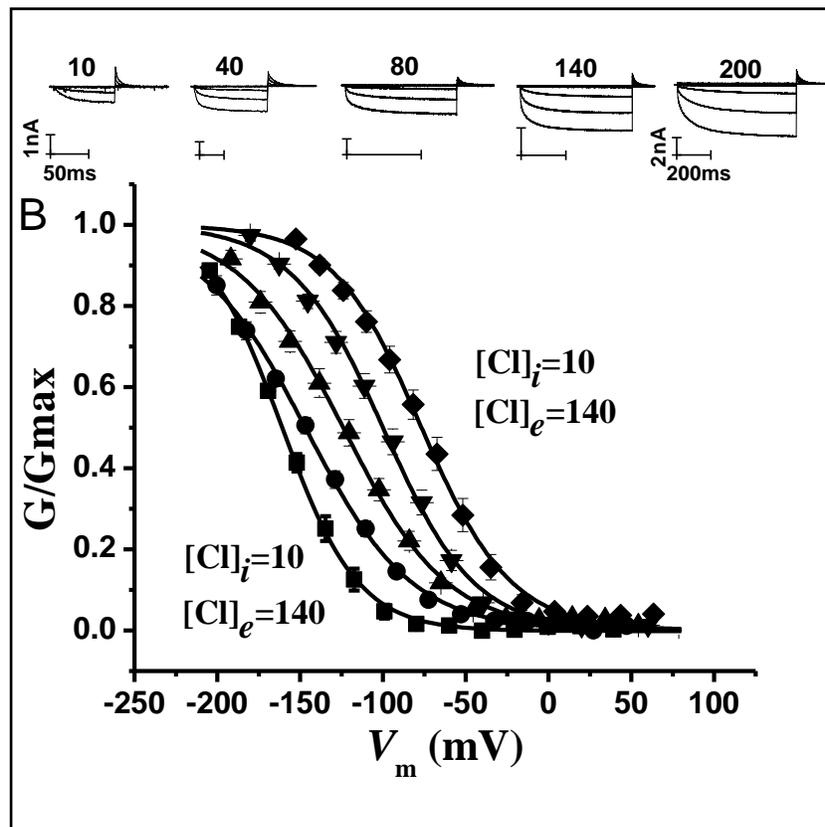


Figura 2.11. Dependencia del canal CIC-2 con la concentración de cloruro. Esta gráfica muestra la conductancia normalizada para varias concentraciones de cloruro intracelular que van desde 10mM a 200mM. La concentración de cloruro extracelular en todos los casos fue de 140mM. Como se puede observar, la disminución de la concentración de cloruro intracelular provoca un corrimiento de la curva de conductancia hacia voltajes negativos.

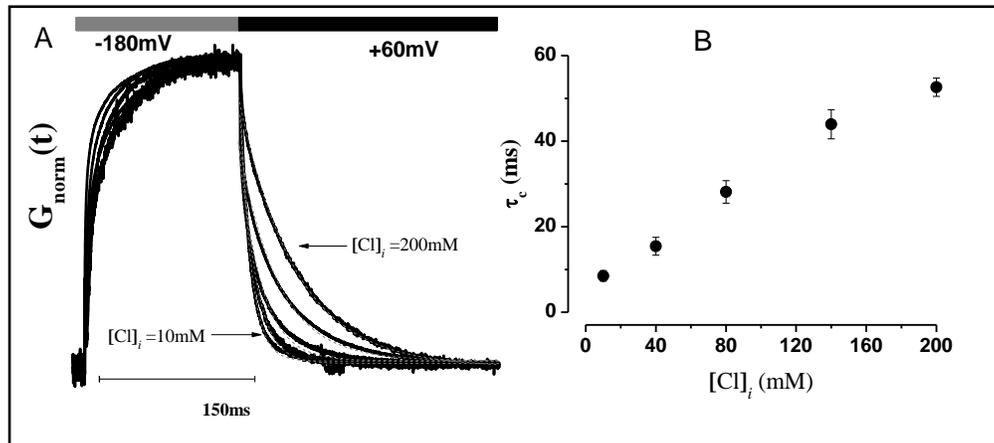


Figura 2.12. Efectos cinéticos que produce la variación de $[Cl^-]_i$ sobre la apertura y cierre del CIC-2. A, Curso temporal de la conductancia normalizada para los valores de $[Cl^-]_i$ indicados. B, Constantes de tiempo del cierre del canal en función de $[Cl^-]_i$

3 Planteamiento del problema y objetivos.

Los canales iónicos CIC son activados por el voltaje de la membrana, sin embargo, la dependencia con el voltaje de estos canales es un tema controversial, debido a que en ellos no se ha logrado encontrar un sensor de voltaje intrínseco similar al de otros canales activados por voltaje y a que su activación está fuertemente acoplada a la concentración de cloruro y al pH. Por este motivo, se piensa que la dependencia con el voltaje proviene del movimiento de Cl^- y/o de H^+ dentro del canal. Para el canal CIC-2 se han propuesto diversas ideas que intentan explicar su dependencia con el voltaje, dentro de las cuales están aquellas que señalan que la apertura del canal requiere la unión de un protón y que esta unión depende del voltaje, también se propone que la dependencia con el voltaje proviene tanto de la unión del protón como del movimiento de los iones de cloruro dentro del poro. Aunque ambos planteamientos pueden explicar algunas de las características del mecanismo de activación del canal, aún no queda clara la contribución del Cl^- y del H^+ a la dependencia con el voltaje y su participación en la activación.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Estudiar la contribución del Cl^- y del H^+ a la dependencia con el voltaje del canal CIC-2.
- Proponer un mecanismo de activación del canal CIC-2 que tome en cuenta la dependencia con el voltaje, la concentración de cloruro y el pH.

4 Resultados

El mecanismo de apertura del canal CIC-2 depende del voltaje, del pH extracelular y de la concentración de cloruro intracelular. Se ha propuesto que la dependencia con el voltaje de los canales CIC-2 proviene principalmente del movimiento del protón dentro del canal. Como se mencionó anteriormente, el canal CIC-2 tiene dos sitios de unión para el protón, S_1 y S_2 (Figura 2.9). El sitio S_1 corresponde al ácido glutámico E213, el cual forma la compuerta del poro, mientras que el sitio S_2 corresponde a la histidina H538 que se localiza en el vestíbulo extracelular de la proteína¹⁷. La protonación del sitio S_2 produce una inhibición, mientras que la protonación del sitio S_1 favorece la apertura del canal (Figura 2.8). La conductancia se puede escribir como:

$$G = N * g * P_{act} (1 - P_{S_2}) = G_{max} P_{act} (1 - P_{S_2}) \quad (4.1)$$

donde $G_{max}(=N*g)$ es la conductancia máxima, P_{act} representa la probabilidad de activación y P_{S_2} es la probabilidad de ocupación del sitio S_2 . Si la ocupación del sitio S_1 activa al canal, entonces $P_{act}=P_{S_1}$, donde P_{S_1} la probabilidad de ocupación del sitio S_1 .

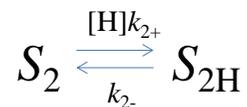
La ocupación del sitio S_1 incrementa la probabilidad de apertura del canal CIC-2 (Figura 2.7), el incremento puede explicarse de dos maneras:

- A) Apertura del CIC-2 por el protón.** En este caso la ocupación del sitio S_1 ocurre cuando el canal está cerrado y esta ocupación origina un aumento en la probabilidad de que el canal pase del estado cerrado al estado abierto, por lo tanto, un incremento en la concentración de protones produce un aumento en la probabilidad de apertura.
- B) Estabilización del estado abierto por el protón.** En este caso la ocupación del sitio S_1 ocurre cuando el canal está abierto y la ocupación del sitio disminuye la probabilidad de que el canal pase del estado abierto al estado cerrado y como consecuencia, el incremento en la concentración de protones generara un aumento en la probabilidad de apertura.

Los modelos cinéticos utilizados para estudiar la dependencia con el voltaje de este canal se dividirán en las categorías previamente mencionadas.

4.1 Modelo para la inhibición

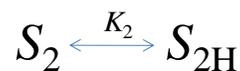
Para simplificar el análisis de la dependencia con el voltaje, usaremos un modelo de dos estados para la inhibición (en este contexto el término *inhibición* se refiera al proceso contrario a la activación). Como el sitio S_2 responsable de la inhibición se encuentra en la parte externa del canal ¹⁷, la inhibición es independiente del voltaje y por lo tanto esperamos que la elección de un modelo tan simple para la inhibición no tenga efecto en el estudio de dicha dependencia. El modelo para la inhibición lo representamos mediante el siguiente esquema cinético:



Esquema 2

Donde $[H]k_{2+}$ y k_{2-} son constantes de velocidad; S_2 y S_{2H} representan el sitio ocupado y sitio desocupado, respectivamente.

Una forma alternativa de escribir el Esquema 2 es del siguiente modo:



Donde $K_2(=k_{2-}/k_{2+})$ es la constante de disociación del sitio S_2 .

La probabilidad de que el sitio S_2 se encuentre ocupado está dada por la expresión:

$$P_{S_2} = \frac{1}{1 + (K_2/[H])^{n_2}} \quad (4.2)$$

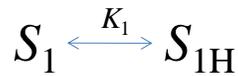
Donde n_2 está relacionado con el número de protones que podría unírsele al sitio.

4.2 Apertura del canal CIC-2 por el protón.

En este apartado trabajaremos con modelos cinéticos en los cuales la ocupación del sitio S_1 favorece la apertura del canal.

4.2.1 Modelo de dos estados.

El primer modelo que se usó para describir la activación es un modelo de dos estados, en este modelo, el estado activado corresponde al sitio S_1 ocupado. (de igual forma que para el sitio S_2):



Esquema 3

En este esquema cinético, el sitio S_1 ocupado se representa por S_{1H} y el sitio desocupado por S_1 . La probabilidad de activación (protonación del sitio S_1) está dada por:

$$P_{act} = \frac{1}{1 + K_1/[H]} \quad (4.3)$$

Aquí $K_1(=k_+/k_-)$ es la constante de disociación del sitio S_1 .

Mediante las ecuaciones 4.1, 4.2 y 4.3 la conductancia se puede escribir como

$$G = G_{\max} \left(\frac{1}{1 + K_1/[H]} \right) * \left(\frac{1}{1 + ([H]/K_2)^{n_2}} \right) \quad (4.4)$$

Los parámetros de este modelo fueron obtenidos utilizando dos ajustes independientes. En el primer caso los parámetros de la ecuación 4.4 (n_2 , $pK_{act} = -\log(K_1)$ y $pK_{inh} = -\log(K_2)$) fueron obtenidos al ajustar las curvas de conductancias en función del pH con la ecuación 4.4. En la Figura 4.1 (izquierda) se muestran los ajustes (líneas continuas con forma de campana) y los datos experimentales (puntos) para $[Cl^-]_i = [Cl^-]_e = 140\text{mM}$. En el segundo caso la forma de obtener los parámetros fue a través de la parte que corresponde

solo a la activación del canal y que únicamente estaría representada por el primer término de la ecuación 4.4 (es decir, G_{max} multiplicada por la ecuación 4.3). En la misma Figura 4.3 (panel derecho) también se muestra el ajuste (líneas) a los datos experimentales para este caso.

Un aspecto importante del modelo de dos estados es que predice que la protonación es dependiente del voltaje. Este hecho ha sido ya reportado por otros investigadores ¹⁷. Sin embargo, la conclusión de la dependencia con el voltaje de la activación por protonación presenta fallas, pues el modelo por sí mismo al ser construido de ese modo supone dicha dependencia, y la razón de esto reside en que en las constantes de velocidad de este modelo se asume de entrada la dependencia con el voltaje de la activación por protonación. La Figura 4.2 muestra el comportamiento del pK de activación en función del voltaje.

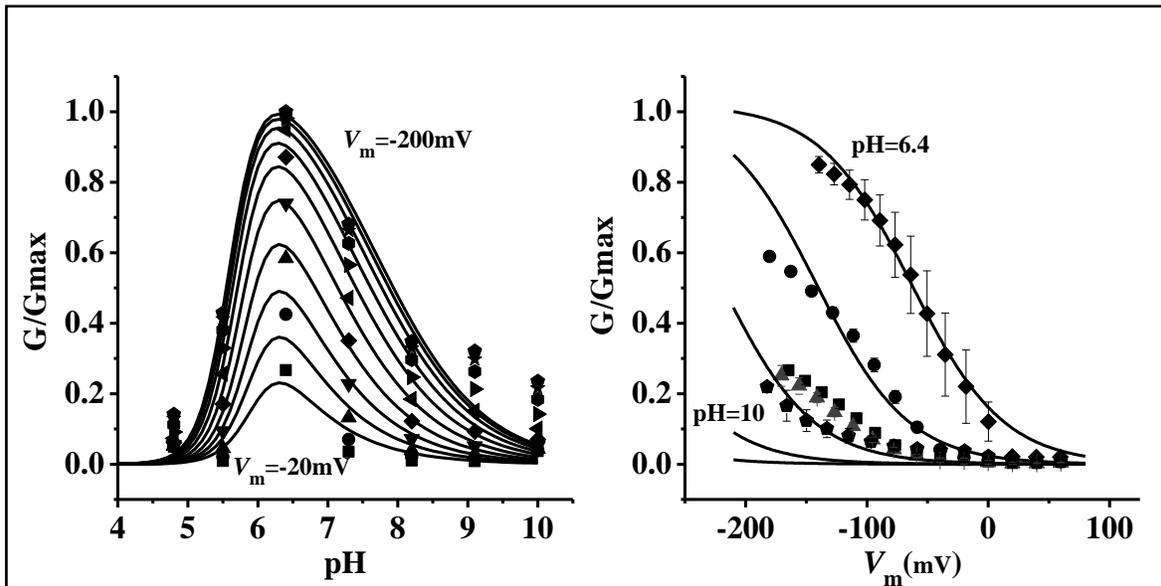


Figura 4.1. Ajustes a los datos experimentales usando la expresión para la conductancia obtenida a partir del modelo de dos estados para la condición de $[Cl^-]_i = [Cl^-]_e = 140\text{mM}$. Cada una de las curvas de campana en el panel izquierdo representan el ajuste hecho para distintos valores de voltaje de membrana que van desde -20mV hasta -200mV con pasos de -20mV . La parte que corresponde solo a la activación del canal es mostrada en el panel derecho y los ajustes a los datos son hechos para valores de pH entre 10 y 6.4.

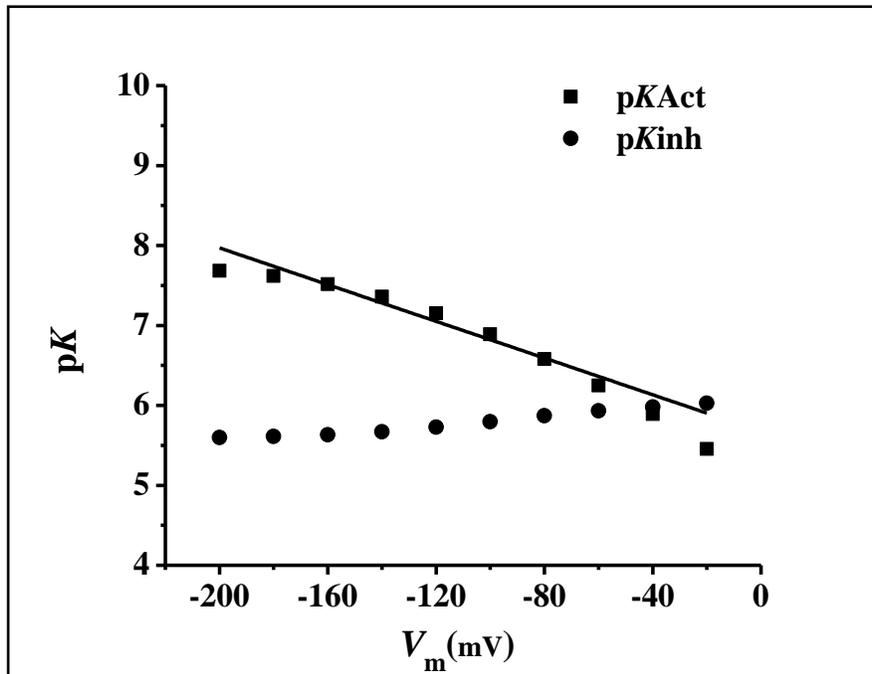


Figura 4.2. Comportamiento del pK en función del voltaje de membrana. El modelo de dos estados predice una dependencia con el voltaje del pK de activación (pKAct). Los cuadros son los valores obtenidos para el pKAct a través de las curvas con forma de campana y la línea continua representa los valores que se obtuvieron a través de la parte que comprende solo la activación. Por otro lado, el pK de inhibición (pKInh) es prácticamente constante ante cambios de voltaje.

Otra de las fallas del modelo se encuentra en la predicción sobre el tiempo de cierre del canal bajo efectos de cambios en pH. El modelo de dos estado predice que la constante de tiempo de cierre del canal está dada por:

$$\tau_c = 1/k_{-1} \quad (4.5)$$

Como se puede ver la constante de tiempo no muestra una dependencia con la concentración de protones y esto no está de acuerdo con lo que se observa experimentalmente.

4.2.2 Modelo de tres estados (C-C_H-O_H).

A pesar de las fallas que presenta el modelo de dos estados, no se puede descartar definitivamente en esta etapa que la protonación del sitio S₁ sea el primer paso para la

apertura del canal CIC-2, esto nos conduce a proponer una extensión de dicho modelo la cual es presentada en el siguiente esquema cinético:



Esquema 4

En este modelo, el protón se une al canal (estado C_H) y eso favorece la transición hacia un estado abierto (O_H). La probabilidad de activación para este modelo está dada por la ecuación:

$$P_{act} = \frac{1}{1 + \beta/\alpha + (\beta/\alpha)(K_C/[H])} \quad (4.6)$$

Con α , β constantes de velocidad, $K_C(=k_+/k_-)$ la constante de disociación para (C) y $[H]$ representa la concentración de protones del medio extracelular.

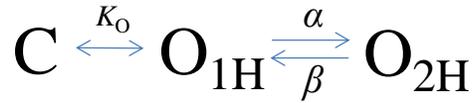
La constante de tiempo de cierre del canal queda determinada por:

$$\tau_C \approx \frac{1}{\beta_{eff}} = \frac{1}{\beta} \quad (4.7)$$

Al igual que en el caso del modelo anterior, la constante de tiempo no muestra dependencia con la concentración de protones y esto es un indicador que ayuda a descartar el modelo para el resto del análisis.

4.2.3 Modelo de tres estados (C-O_{1H}-O_{2H}).

Otra variante del modelo de dos estados, está representado por el siguiente esquema cinético:



Esquema 5

En este modelo, el canal pasa del estado cerrado (C), al estado abierto (O_{1H}) por efecto de protonación, la protonación del canal favorece la transición hacia el segundo estado abierto (O_{2H}).

La probabilidad de apertura (activación) para este modelo es la suma de la probabilidad de los estados O_{1H} y O_{2H} . Tanto la probabilidad de apertura P_{act} y las dos constantes de tiempo τ_{c1} y τ_{c2} de este modelo, se pueden encontrar resolviendo la ecuación (1.12)

$$P_{act} = \frac{(\alpha + \beta)}{(\alpha + \beta) + \beta * k_- / [H]k_+} \quad (4.8)$$

$$\tau_{c1} = 2 / ([H]k_+ + \alpha + k_- + \beta + \sqrt{([H]k_+ + \alpha + k_- + \beta)^2 - 4(k_- * \beta + [H]k_+ * (\alpha + \beta))}) \quad (4.9)$$

$$\tau_{c2} = 2 / ([H]k_+ + \alpha + k_- + \beta - \sqrt{([H]k_+ + \alpha + k_- + \beta)^2 - 4(k_- * \beta + [H]k_+ * (\alpha + \beta))}) \quad (4.10)$$

Para que el canal se cierre se debe cumplir que $\beta * k_- \gg [H]k_+ * (\alpha + \beta)$ obtenida de la ecuación (4.8) y si k_- es mucho mayor que $[H]k_+$, α , β se puede llegar a qué:

$$\tau_{c1} \approx 2 / (k_- + \sqrt{(k_-)^2 - 4(k_- * \beta)}) \quad (4.11)$$

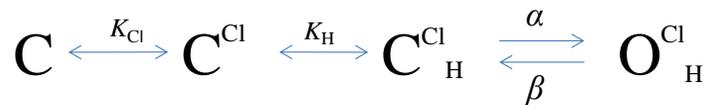
$$\tau_{c2} \approx 2 / (k_- - \sqrt{(k_-)^2 - 4(k_- * \beta)}) \quad (4.12)$$

Una vez más, la constante de tiempo de cierre no presenta dependencia con la concentración de protones, por lo tanto las predicciones que puedan resultar de la aplicación de este modelo no estarán de acuerdo con lo que se obtiene a partir de la información experimental, al menos no respecto al comportamiento de la constante de tiempo de cierre.

4.2.4 Modelo de Niemeyer.

Finalmente, en el marco de modelos en los cuales el canal requiere de la protonación como primer factor para activarse se presenta un modelo un poco más complejo, en él se incorpora el efecto de los iones de cloruro en el mecanismo de apertura del canal.

Este modelo asume que a partir de un estado cerrado (C), el canal podría pasar a otra configuración cerrada pero con un ión de cloruro adherido (C^{Cl}). En esta configuración el canal puede acceder a un estado cerrado protonado (C^{Cl}_H), y eventualmente pasar al estado abierto (O^{Cl}_H) como lo indica el Esquema 6.



Esquema 6

Para este modelo la probabilidad de activación y la constante de tiempo de cierre son:

$$P_{act} = \frac{1}{1 + (\beta / \beta + \alpha)(K_H^{Cl} / [H])(1 + K_{Cl} / [Cl^-]_i)} \quad (4.13)$$

$$\tau_c = \frac{1}{\beta_{eff}} = \frac{1}{\beta} \quad (4.14)$$

Donde α , β , son constantes de velocidad, K_H^{Cl} , K_{Cl} constantes de disociación, $[Cl^-]_i$ y $[H]$ son las concentraciones de cloruro intracelular y protones del medio extracelular, respectivamente.

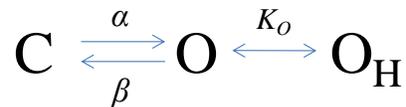
En resumen, construir modelos en los que la ruta de activación del canal requiera como primer factor el efecto de protonación no proporcionará información correcta sobre el comportamiento de parámetros importantes asociados al mecanismo de apertura del canal.

4.3 Estabilización del estado abierto por el protón.

Tomando en cuenta lo anterior, hemos propuesto que la función del protón en el proceso de activación del canal es la de un modulador, es decir, una vez que el canal se encuentre en el estado abierto, la protonación del sitio S_1 favorecerá dicha configuración. Teniendo como base lo anterior se construyeron algunos modelos que se presentan a continuación.

4.3.1 Modelo de tres estados (C-O-O_H).

Supongamos que el canal se encuentra en su estado cerrado (C) y que pasa directamente a un estado abierto (O), cuando se le une un protón puede acceder a un nuevo estado abierto (O_H), véase el Esquema 7.



Esquema 7

La probabilidad de activación para este caso será igual a:

$$P_{act} = \frac{1 + [H]/K_o}{1 + \beta/\alpha + [H]/K_o} \quad (4.15)$$

La constante de tiempo τ_c está dada por:

$$\tau_c \approx \frac{1}{\beta_{eff}} = \frac{1 + [H]/K_o}{\beta} \quad (4.16)$$

Siendo α , β , constantes de velocidad, K_O constante de disociación y $[H]$ la concentración de protones del medio extracelular, respectivamente.

A diferencia de los modelos anteriores éste modelo predice que la constante de tiempo depende de la protonación lo cual está de acuerdo con lo que se observa experimentalmente. La Figura 4.3 (panel izquierdo) muestra los ajustes de la conductancia usando este modelo, asimismo, en dicha figura (panel derecho) se puede ver los ajustes obtenidos de la parte que solo corresponde a la activación. En contraste al modelo de dos estados, el pK de activación no muestra gran cambio con el voltaje, lo cual se muestra en la Figura 4.4 (izquierda). Además, otra de las predicciones importantes es que el comportamiento de las constantes de velocidad depende del voltaje y tiene un comportamiento exponencial (panel derecho de la Figura 4.4).

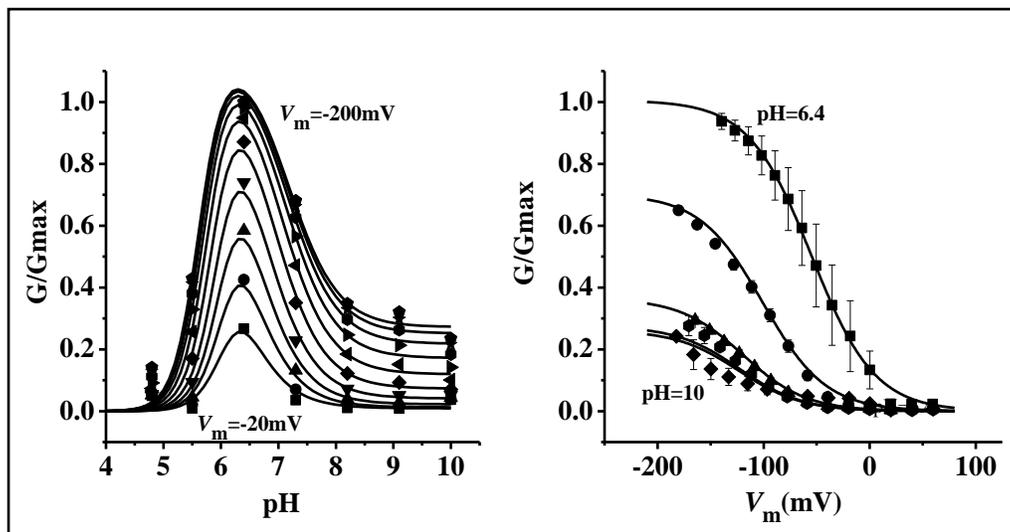


Figura 4.3. Ajustes a los datos experimentales usando la expresión para la conductancia obtenida a partir del modelo de tres estados C-O-O_H para la condición de $[Cl]_i=[Cl]_e=140mM$. Cada una de las líneas en el panel izquierdo representa el ajuste hecho para distintos valores de voltaje de membrana que van desde -20mV hasta -200mV con pasos de -20mV. La parte que corresponde solo a la activación del canal es mostrada en el panel derecho y los ajustes a los datos comprenden un rango de pH entre 6.4 y 10.

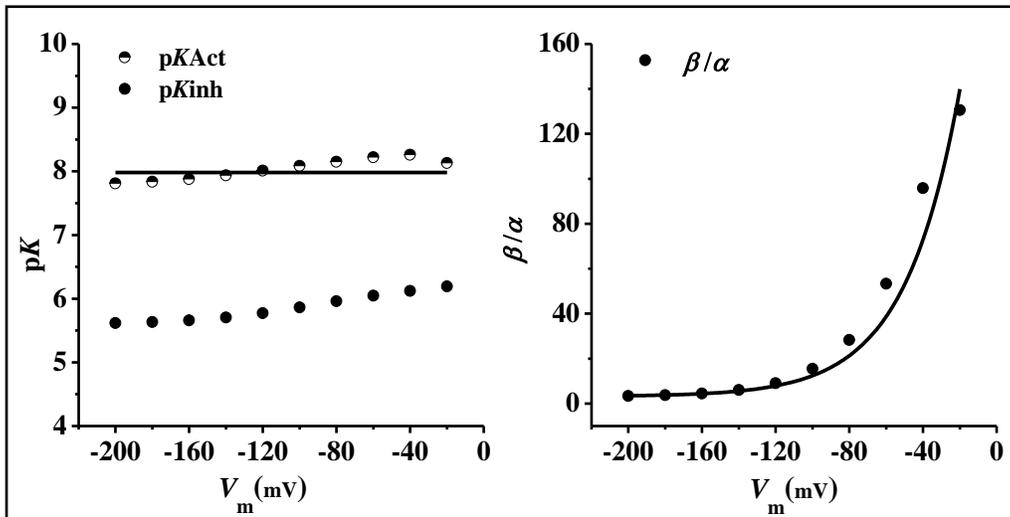


Figura 4.4. Valores de los parámetros obtenidos al usar el modelo de tres estado C-O-O_H. El comportamiento para el pK de activación (pKAct) obtenido con base a las curvas en forma de campana no muestra grandes cambios con el voltaje (círculos semillenos) de acuerdo a este modelo. Más aún, dicho comportamiento es constante acorde a lo derivado de la parte que solo contempla la activación. En el panel derecho se grafican los valores de la razón de las constantes de velocidad para los dos ajustes realizados independientemente.

Del curso temporal de la conductancia se puede determinar los valores de la constante de tiempo de cierre del canal. En la Figura 4.5 se grafican dichos valores (puntos) junto con la curva que resulta de la expresión para la constante de tiempo de cierre que predice el modelo.

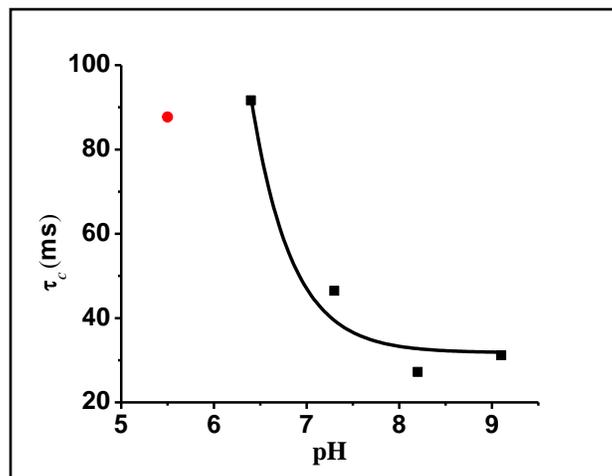
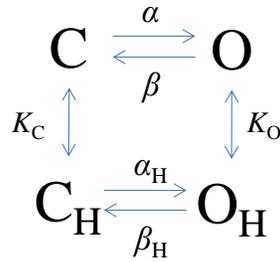


Figura 4.5. Valores de la constante de tiempo de cierre en función del pH. El modelo de tres estados solo es capaz de reproducir la tendencia de los valores de la constante de tiempo de cierre para un rango de pH mayor a 6.4.

4.3.2 Modelo de cuatro estados (C-O)-(C-O)_H.

Otro modelo que se puede construir bajo el margen de ideas considerado en esta sección es uno en el cual se propone que el canal podría acceder a cuatro estados. En el Esquema 8 se muestra el arreglo de estados. El canal podría activarse por dos rutas: la primera de ellas es pasar directamente de un estado cerrado (C) al estado abierto (O) y estando en este estado abierto puede transitar a un estado abierto protonado (O_H). La segunda ruta de activación es pasar a una configuración cerrada protonada (C_H) partiendo de un modo cerrado (C) y eventualmente alcanzar el estado abierto (O_H).



Esquema 8

La probabilidad de apertura en este caso es:

$$P_{act} = \frac{(1 + [H]/K_O)}{(1 + [H]/K_O)(\beta/\alpha)(1 + [H]/K_C)} \quad (4.17)$$

Con α , β constantes de velocidad, K_O , K_C constantes de disociación y $[H]$ la concentración de protones del medio extracelular.

La conductancia G para esta situación adopta la siguiente forma:

$$G = G_{max} \left(\frac{1 + [H]/K_O}{(1 + [H]/K_O) + (\beta/\alpha)(1 + [H]/K_C)} \right) \left(\frac{1}{1 + ([H]/K_2)^{n_2}} \right) \quad (4.18)$$

En la Figura 4.6 (panel izquierdo) se muestran los ajustes al usar las expresiones obtenidas de este modelo y las predicciones sobre el pK de activación (panel izquierdo) y el comportamiento de las constantes de velocidad (panel derecho) se muestra en la Figura 4.7.

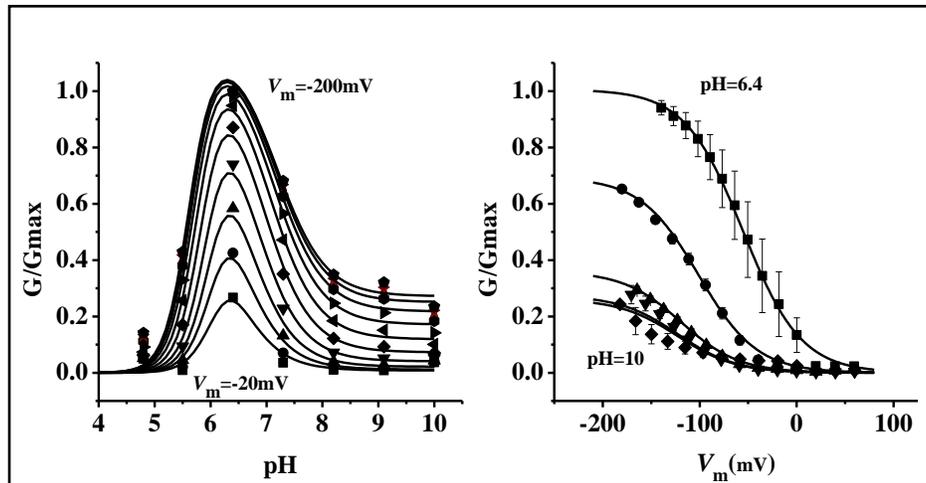


Figura 4.6. Ajustes a los datos experimentales usando la expresión para la conductancia obtenida a partir del modelo de cuatro estados $(C-O)-(C-O)_H$ para la condición de $[Cl]_i=[Cl]_e =140mM$. Cada una de las líneas en el panel izquierdo representa el ajuste hecho para distintos valores de voltaje de membrana que van desde $-20mV$ hasta $-200mV$ con pasos de $-20mV$. La parte que corresponde solo a la activación del canal es mostrada en el panel derecho y los ajustes a los datos.

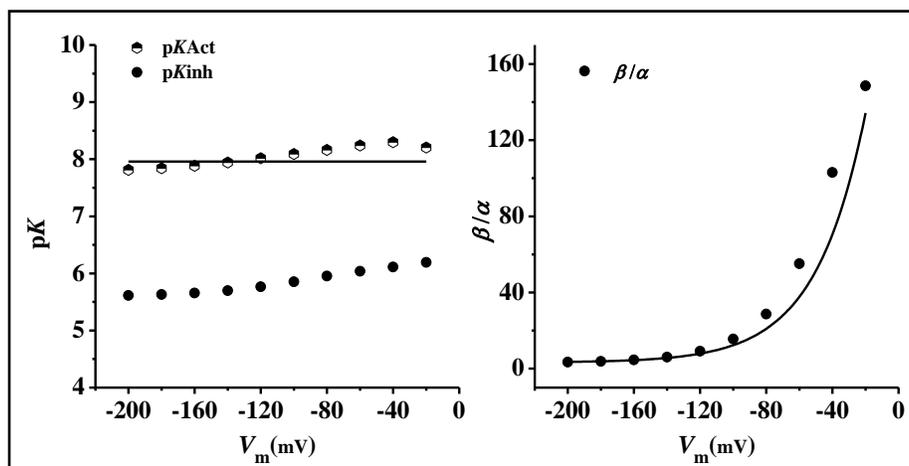


Figura 4.7. Las constantes de velocidad presentan un comportamiento voltaje-dependiente de carácter exponencial (panel izquierdo). Predicciones de los modelos de tres estados $C-O-O_H$ (línea punteada) y el modelo de cuatro estados $(C-O)-(C-O)_H$ (línea continua) son mostrados en el panel derecho.

En términos de los ajustes y las predicciones sobre el comportamiento de las constantes de velocidad y el pK , este último modelo sería muy parecido al modelo de tres estados previamente presentado, pero las predicciones sobre el comportamiento de la constante de

tiempo de cierre son mejores en términos de este modelo con cuatro estados como lo muestra la Figura 4.8.

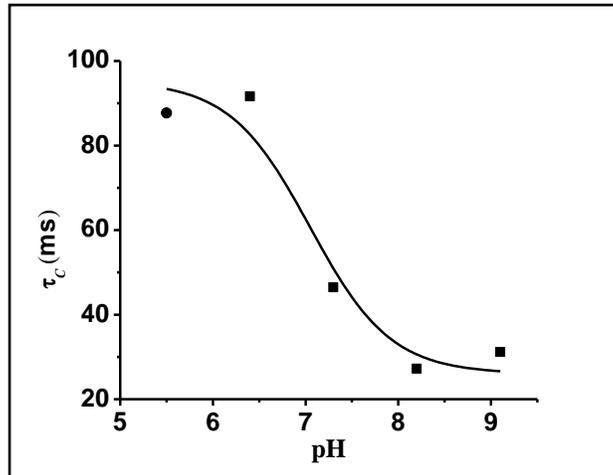


Figura 4.8. Valores de la constante de tiempo de cierre en función del pH. El modelo de cuatro estados es capaz de reproducir la tendencia de los valores de la constante de tiempo de cierre.

Para propósitos de una comparación más clara en la Figura 4.9 se presentan los valores calculados para la constante de tiempo de cierre y los ajustes que predicen los modelos de tres estados $C-O-O_H$ y cuatro estados $(C-O)-(C-O)_H$.

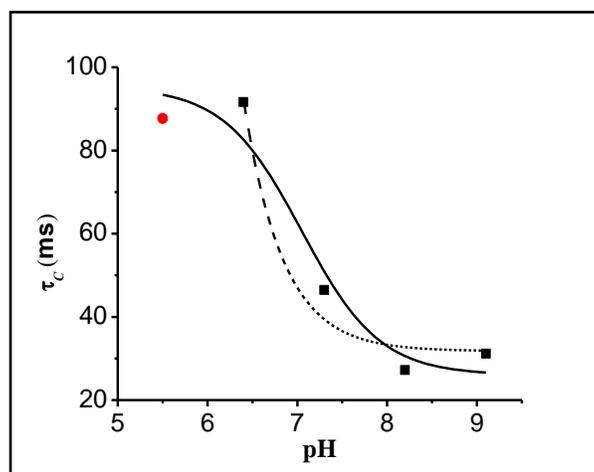
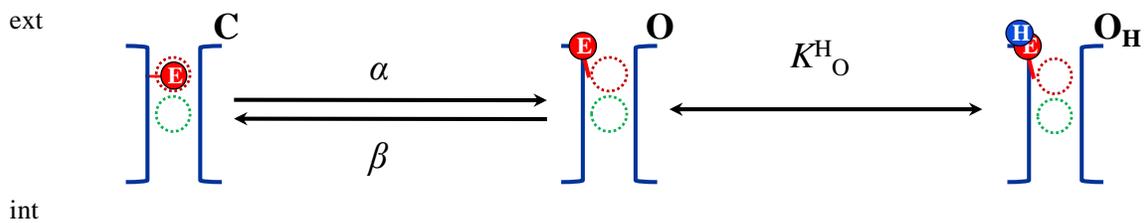


Figura 4.9. Comparación entre las predicciones del modelo de tres estado $C-O-O_H$ (línea punteada) y el modelo de cuatro estados $(C-O)-(C-O)_H$ (línea continua) respecto al comportamiento de la constante de tiempo de cierre del canal CIC-2.

4.4 Activación del canal ClC-2 por cloruro y protones (Modelo I).

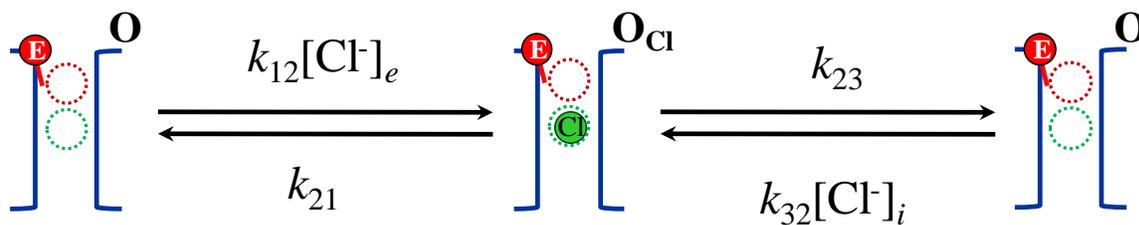
A pesar de que el flujo de iones que atraviesa la membrana celular representa un proceso electrodifusivo, los iones no se difunden libremente a través del poro. En vez de ello, los iones se detienen en ciertos puntos o sitios del canal y su presencia en él tiene considerables efectos en el paso de otros iones. Como se mencionó en el Capítulo 2, en el intercambiador de la *Escherichia coli* (EcClC) se ha mostrado que existen tres sitios de unión de iones que forman la ruta de conducción, así que al considerar la hipótesis de que también en el canal ClC-2 existen los sitios de unión en la ruta de conducción para los iones es posible construir algunos modelos que describen la activación del canal ClC-2. Teniendo esto en cuenta se construyó un modelo que considera los sitios de unión de los iones de cloruro (círculos vacíos, Esquema 9) y la propuesta preliminar es que la ruta de activación comprende tres estados, cerrado (C), abierto (O) y abierto protonado (O_H). Con esta configuración inicial se construye un modelo un poco más complejo al suponer que los iones de cloruro podrían unirse o separarse al sitio disponible, este hecho origina que existan entonces otros posibles estados de transición.



Esquema 9

En el esquema α , β representan como antes a las constantes de velocidad y K^H_O es la razón de disociación de la configuración abierta.

Supongamos que el canal se encuentra en el estado cerrado (O), existe la posibilidad de que un ión de cloruro que se mueve desde la parte interna de la célula (int) se pueda unir a un sitio disponible y así el canal transite a un nuevo estado abierto con cloruro (O_{Cl}) como se ilustra en el Esquema 10.

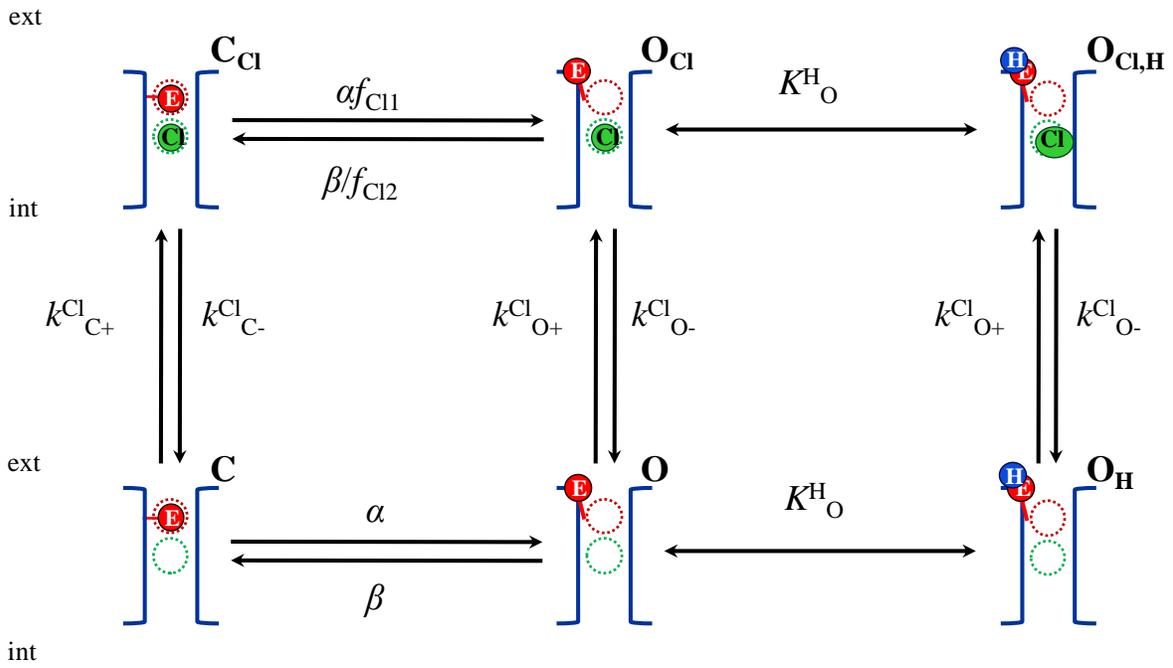


Esquema 10

Aquí k_{12} , k_{21} , k_{23} , k_{32} son las constantes de velocidad.

Pero no solo para el estado cerrado (O) puede ocurrir lo antes descrito, sino que también cabe la posibilidad de que los estados cerrado (C) y abierto protonado (O_H) transiten a estados con cloruro. De hecho también puede ocurrir que iones de cloruro que provengan del medio extracelular pueden acceder o competir por los sitios de unión. Ambos efectos son considerados en el modelo vía las constantes de velocidad como se puede apreciar en el esquema anterior.

Bajo el margen de las ideas expuestas y que son reflejadas en los Esquemas 9 y 10 se puede llegar a una configuración que toma en cuenta todas las posibilidades de transición permitidas por las suposiciones hechas. El Esquema 11 representa la configuración final del modelo que contempla activación por efectos de protonación y cloruro.



Esquema 11

Aquí α , β , K^H_O , k^Cl_{C+} , k^Cl_{C-} son las constantes de velocidad y f_{Cl1} , f_{Cl2} son factores de interacción y además se tiene que:

$$k^Cl_{O+} = k_{12}[Cl^-]_o + k_{32}[Cl^-]_i \quad (4.19)$$

$$k^Cl_{C+} = k_{32}[Cl^-]_i / f_{Cl1} \quad (4.20)$$

$$k^Cl_{C-} = k_{23}f_{Cl2} \quad (4.21)$$

$$k^Cl_{O-} = k_{21} + k_{23} \quad (4.22)$$

Para conocer las predicciones que se obtienen del modelo, la manera de proceder para esta situación será diferente. Al incorporar directamente el esquema cinético (Esquema 11) en el programa *IChMASCOT*¹⁸ se calculan los valores de las constantes cinéticas necesarias para simular el comportamiento de la corriente macroscópica, las constantes de tiempo de cierre, etc. La Tabla 1 contiene los valores estimados por el programa *IChMASCOT* para las constantes que aparecen en el modelo representado en el Esquema 11.

Por otro lado, la Figura 4.10, Figura 4.11 y Figura 4.12 muestran las simulaciones de la corriente macroscópica, los cambios de la conductancia por efectos de variación del pH extracelular, concentración de cloruro intracelular y los cambios de la constante de tiempo de cierre por efectos de pH extracelular y cambios en $[Cl^-]_i$, respectivamente.

Parámetro	Valor o expresión	Parámetro	Valor o expresión
k_{12}	$v * e^{\frac{-p_1 + Vd_1F}{2RT}}$	pK	8
k_{21}	$v * e^{\frac{-(p_1 - S_1) - Vd_1F}{2RT}}$	α	0.11 s ⁻¹
k_{23}	$v * e^{\frac{-(p_2 - S_1) + V(1 - d_1)F}{2RT}}$	β	475.8s ⁻¹
k_{32}	$v * e^{\frac{-p_2 - V(1 - d_1)F}{2RT}}$	f_{C11}	126
p_1	10 RT	f_{C12}	12
p_2	5 RT		
s_1	-5 RT		
d_1	0.2		

Tabla 1. Valores estimados de las constantes cinéticas correspondientes al modelo 1 representado por el Esquema 11.

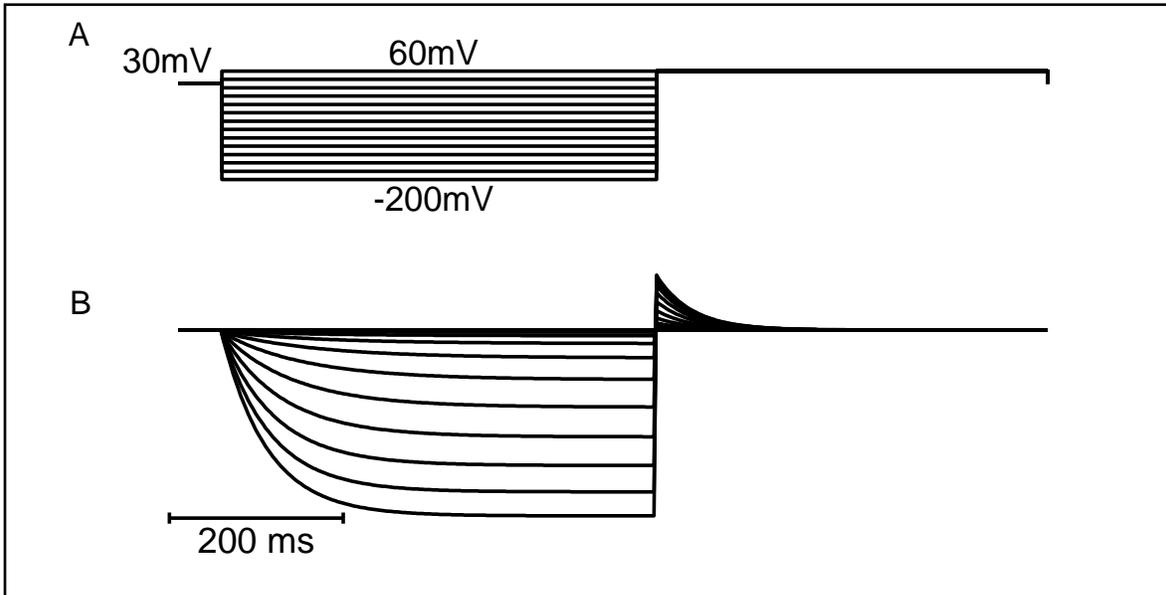


Figura 4.10. Simulación de la corriente macroscópica al incorporar el modelo I en el programa *IchMASCOT*. En B se observa el comportamiento de la corriente macroscópica del canal CIC-2 para el protocolo de estímulos de voltajes que se muestra en A.

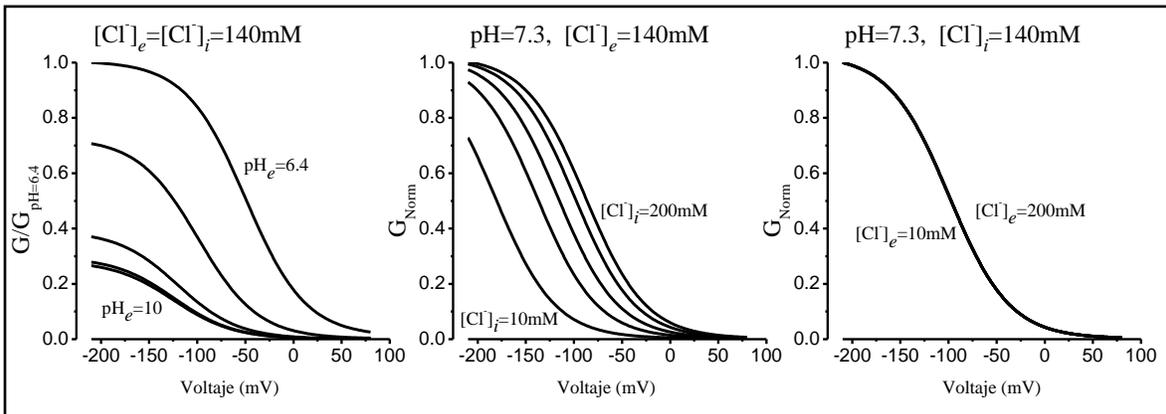


Figura 4.11. Activación del canal CIC-2 por efectos de pH extracelular y $[Cl^-]_i$. En el panel izquierdo de esta figura se muestran las simulaciones del comportamiento de la conductancia por efectos de cambios en el pH externo que predice el modelo I, mientras que en el panel central son mostradas las simulaciones del comportamiento de la conductancia por efectos de variaciones en la concentración de $[Cl^-]_i$. En el panel derecho se muestran las simulaciones del comportamiento de la conductancia por efectos de cambios en $[Cl^-]_e$ que predice el modelo. Como se puede ver, el modelo es capaz de reproducir correctamente las tendencias del comportamiento de la conductancia.

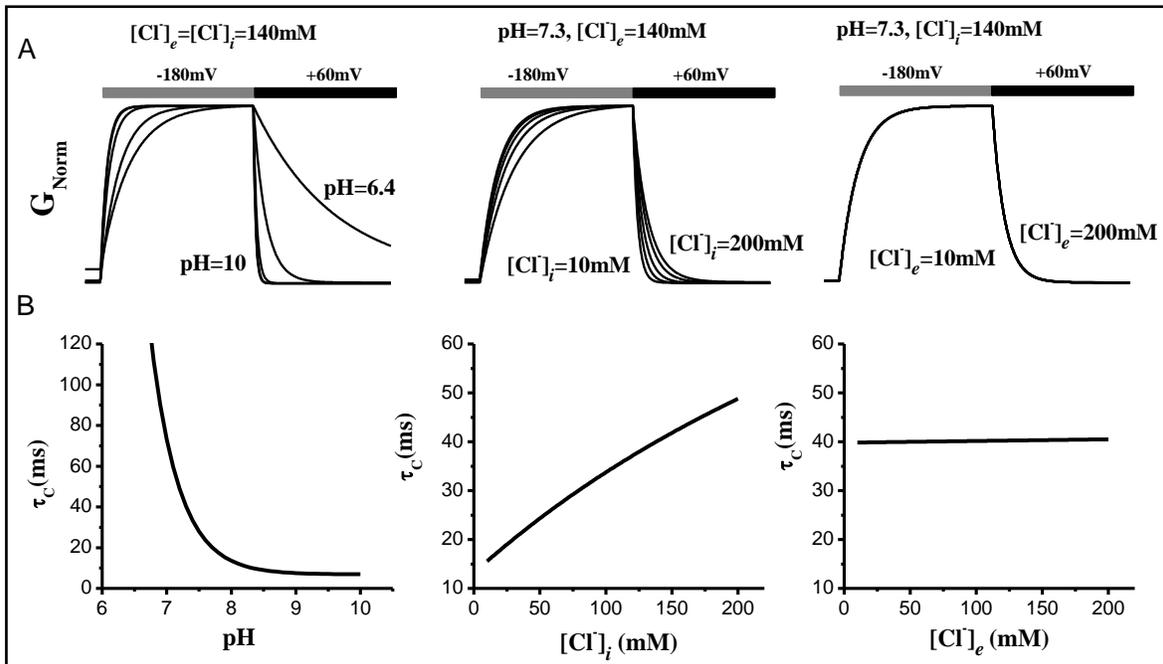
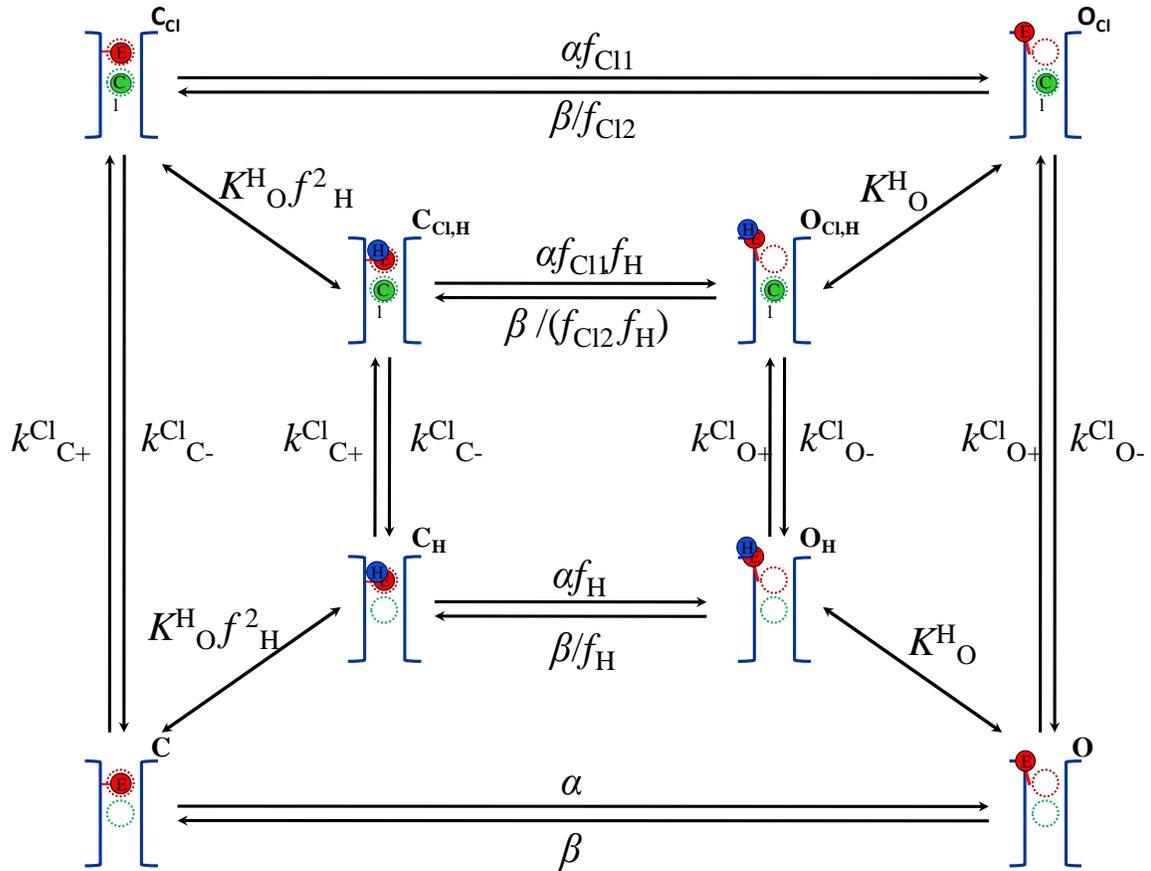


Figura 4.12. Predicciones del modelo I respecto al comportamiento del curso temporal de la conductancia y la constante de tiempo de cierre. En A se puede observar los cambios en el curso temporal de la conductancia al variar la concentración de protones del medio extracelular, $[Cl]_i$ y $[Cl]_e$, respectivamente. Por otro lado, en B se muestra la tendencia de la constante de tiempo de cierre por efecto de modificar las concentraciones de protones, $[Cl]_i$ y $[Cl]_e$.

4.5 Activación del canal ClC-2 por cloruro y protones (Modelo II).

El modelo presentado arriba muestra buenos resultados en el sentido de que reproduce la tendencia de la corriente macroscópica y el comportamiento de la conductancia ante efectos de pH extracelular y variaciones en $[Cl]_i$ y $[Cl]_e$. En lo que respecta a la constante de tiempo de cierre, vemos que el modelo reproduce parcialmente su comportamiento, esto es, para rangos de pH por arriba de 6.4 el modelo está de acuerdo con los datos experimentales, mientras que para valores de pH menores el modelo muestra incongruencias con la información obtenida de manera experimental. Para resolver la situación se consideró que el canal podía acceder a un estado más, dicho estado corresponde a la configuración cerrada del canal pero protonada (C_H). Al incluir el arreglo cerrado protonado (C_H) implica también incluir su correspondiente configuración que contiene un cloruro ($C_{Cl,H}$). El modelo final queda como se muestra en el Esquema 12.



Esquema 12

Donde α , β , $k^{\text{Cl}}_{\text{C}+}$, $k^{\text{Cl}}_{\text{C}-}$ son constantes de velocidad y K^{H}_{O} , K^{H}_{C} son las razones de disociación de la configuración abierta y cerrada, respectivamente.

En términos generales este modelo mejora el comportamiento de la cinética de activación del canal ClC-2 y la muestra más evidente de dicha mejoría está relacionada con el comportamiento de la constante de tiempo de cierre del canal. La Tabla 2 muestra el valor de las constantes cinéticas estimadas por el programa *IChMASCOT*. Las predicciones que se obtiene del modelo de cuatro estados (C-O)-(C-O)_H con cloruro se presentan en el conjunto de figuras mostradas abajo.

Parámetro	Valor o expresión	Parámetro	Valor o expresión
k_{12}	$v * e^{\frac{-p_1 + Vd_1 F}{2RT}}$	pK	7.9
k_{21}	$v * e^{\frac{-(p_1 - S_1) - Vd_1 F}{2RT}}$	α	$0.06s^{-1}$
k_{23}	$v * e^{\frac{-(p_2 - S_1) + V(1-d_1)F}{2RT}}$	β	$229s^{-1}$
k_{32}	$v * e^{\frac{-p_2 - V(1-d_1)F}{2RT}}$	f_{C11}	151.6
p_1	10 RT	f_{C12}	8.4
p_2	5 RT	f_H	8.46
s_1	-5 RT		
d_1	0.2		

Tabla 2. Valores estimados de las constantes cinéticas correspondientes al modelo II con cloruro representado por el Esquema 12.

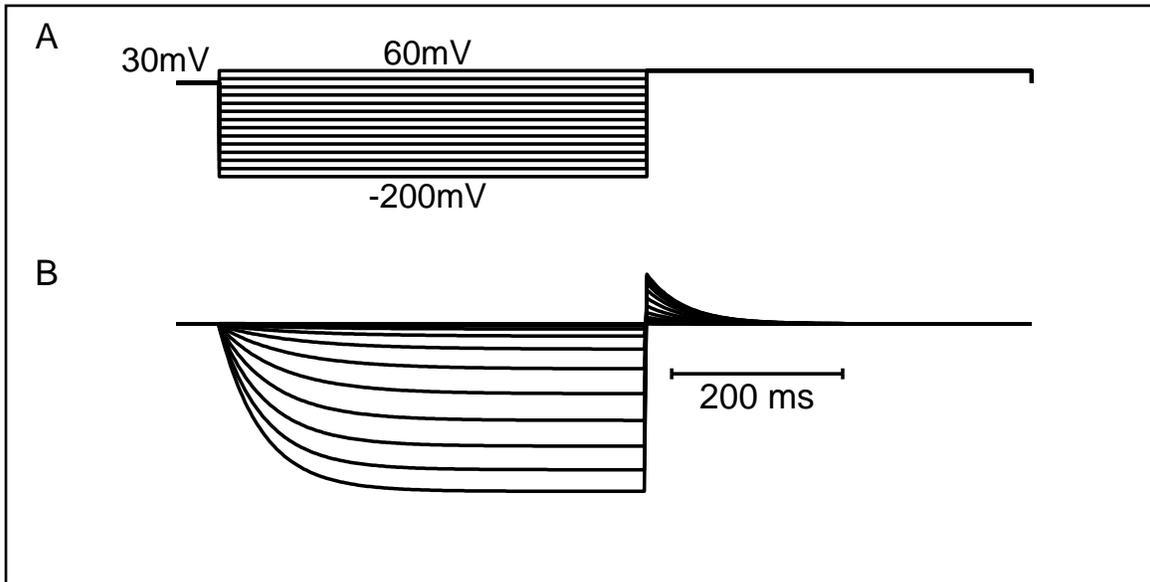


Figura 4.13. Simulación de la corriente macroscópica al incorporar el modelo II en el programa *ICMASCOT*. En B se observa el comportamiento de la corriente macroscópica del canal C1C1-2 para el protocolo de estímulos de voltajes que se muestra en A.

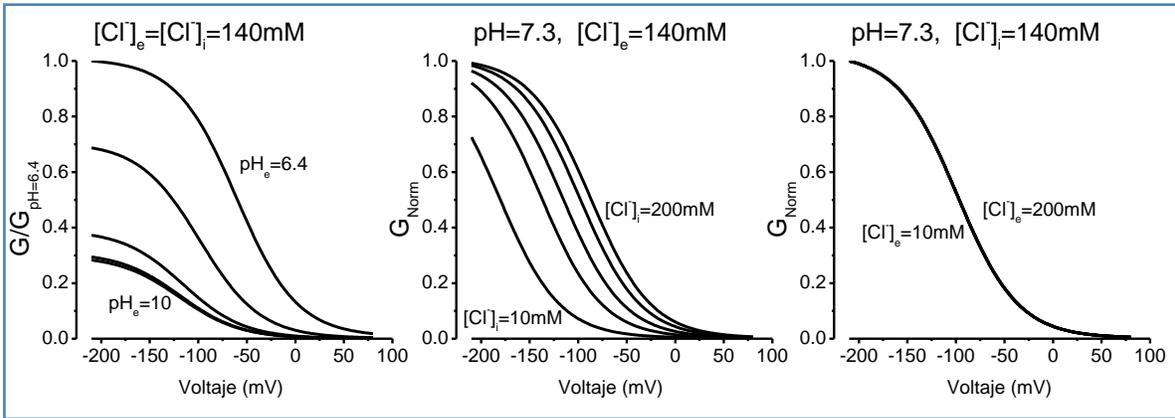


Figura 4.14. Activación del canal CIC-2 por efectos de pH extracelular y $[Cl^-]_i$. En el panel izquierdo de esta figura se muestran las simulaciones del comportamiento de la conductancia por efectos de cambios en el pH externo que predice el modelo II, mientras que en el panel central son mostradas las simulaciones del comportamiento de la conductancia por efectos de variaciones en la concentración de $[Cl^-]_i$. En el panel derecho se muestran las simulaciones del comportamiento de la conductancia por efectos de cambios en $[Cl^-]_e$ que predice el modelo.

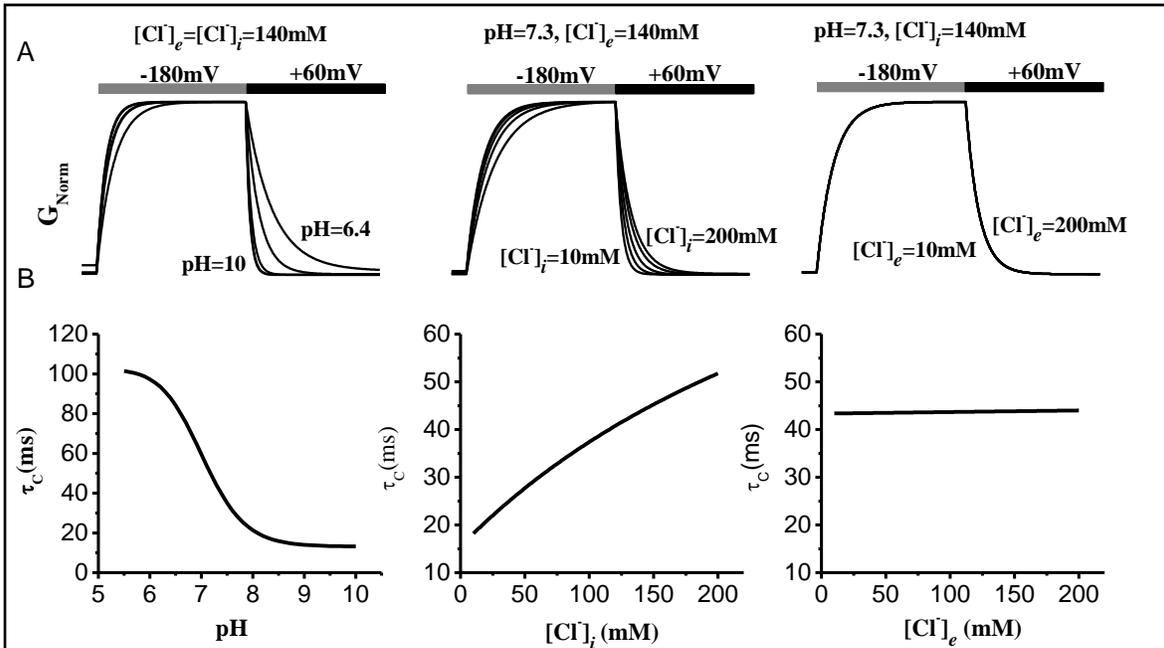


Figura 4.15. Predicciones del modelo II en relación al comportamiento del curso temporal de la conductancia y la constante de tiempo de cierre. En A se puede observar los cambios en el curso temporal de la conductancia al variar la concentración de protones del medio extracelular, $[Cl^-]_i$ y $[Cl^-]_e$, respectivamente. En B se muestra la constante de tiempo de cierre en función de las concentraciones de protones, $[Cl^-]_i$ y $[Cl^-]_e$.

4.6 Acoplamiento del mecanismo de apertura y la permeación en el canal CIC-2.

En el modelo cinético que se propone para describir la activación del canal CIC-2 (esquema 12), la apertura del canal es favorecida por la protonación del sitio S_1 y por la ocupación de un sitio interno del canal (sitio S) por el cloruro. Debido a que el sitio S forma parte de la ruta de conducción, entonces la apertura del canal CIC-2 esta acoplada con la permeación. Esta propiedad contrasta con la descripción clásica de los canales iónicos, en la cual, el mecanismo de apertura y permeación se consideran como propiedades independientes. La permeación de los iones cloruro se puede describir mediante las barreras de energía que deben superar los iones para atravesar el canal iónico. En la Figura 4.16-A se muestran las barreras de energía utilizadas en el esquema cinético 12 cuando el voltaje de membrana es 100mV, 0mV y -100mV. Como se puede apreciar, el sitio S se encuentra cerca de la parte extracelular, por lo que, los cambios en el voltaje tienen un impacto mayor en la barrera de energía intracelular. En la Figura 4.16-B se muestra la probabilidad de ocupación del sitio S en función del voltaje para diferentes concentraciones de cloruro. Los cambios en la concentración de cloruro intracelular modifican de manera importante la ocupación del sitio S (panel izquierdo), en contraste, los cambios en la concentración de cloruro extracelular tienen poco impacto (panel derecho).

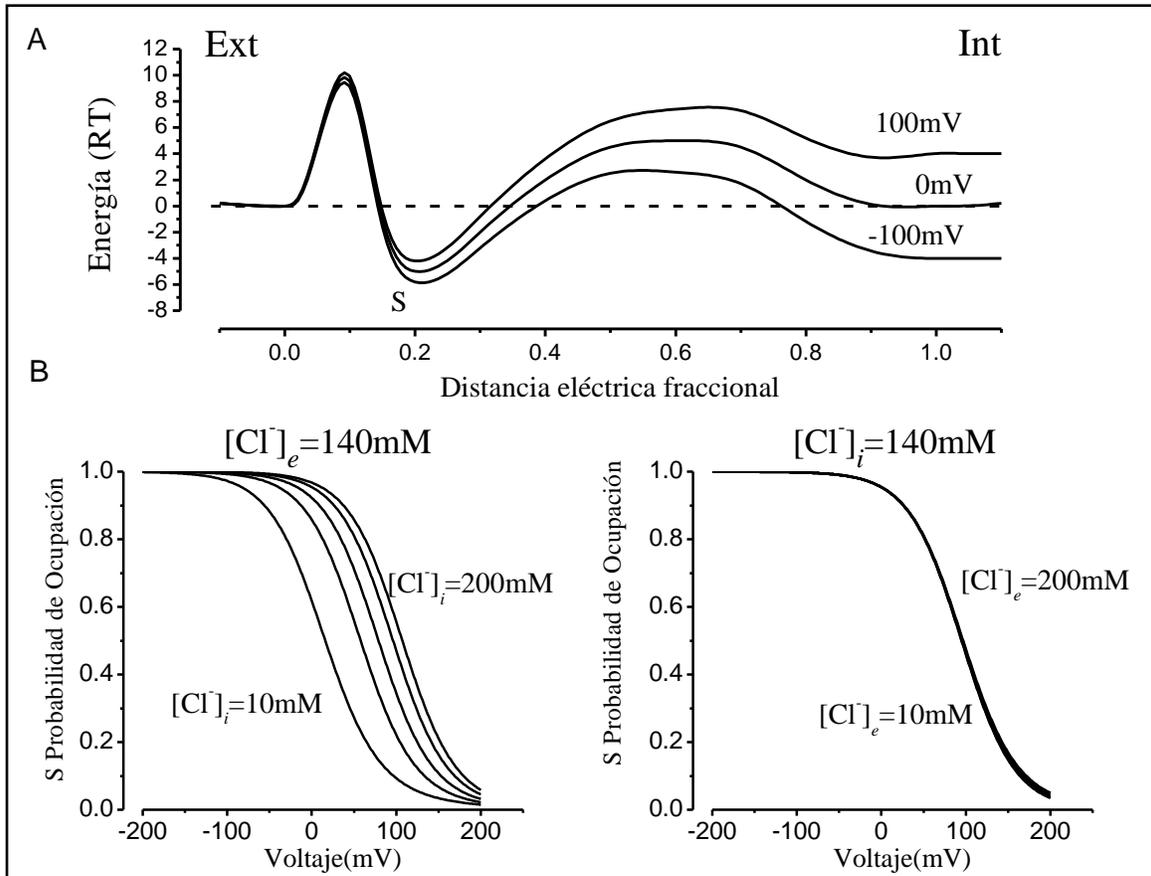


Figura 4.16. Estimación de las barreras de energía necesarias para acceder al sitio de unión S y su probabilidad de ocupación por efectos de cambios en $[Cl^-]_i$ y $[Cl^-]_e$. En A se puede ver la estimación de las barreras de energía para estímulos de voltaje de 0mV, 100mV y -100mV hechas a partir del programa *IchMASCOT*. En B se muestra la probabilidad de ocupación del sitio S en función del voltaje y de los cambios de $[Cl^-]_i$ (panel izquierdo) y para los cambios de $[Cl^-]_e$ (panel derecho).

4.7 Discusión

La dependencia con el voltaje de los canales CIC es un tema controversial, esto se debe a que en estos canales no se ha logrado encontrar un sensor de voltaje intrínseco similar al de otros canales activados por voltaje y a que la activación está fuertemente acoplada a la concentración de cloruro intracelular y el pH extracelular. Por este motivo, se piensa que la dependencia con el voltaje proviene del movimiento de Cl^- y/o de H^+ dentro del canal. Sin embargo aún no se ha logrado identificar la contribución a la dependencia con el voltaje del Cl^- y del H^+ .

En este trabajo se realizó un estudio cinético de la activación del canal iónico CIC-2, inicialmente estudiamos la posibilidad de que la protonación del canal fuera el primer paso para la activación, todos los modelos estudiados con estas características presentaron una descripción razonable de la conductancia en estado estacionario, sin embargo, fueron incapaces de describir los cambios en la cinética de cierre del canal para diferentes valores de pH. El siguiente paso consistió en suponer que la protonación ocurre después de la apertura del canal y por lo tanto, la función del H^+ es no de facilitar la apertura del canal, sino de estabilizar el estado abierto. Los modelos con esta propiedad fueron capaces de reproducir tanto la conductancia en estado estacionario como la cinética del cierre del canal. Con estos modelos se encontró que la contribución a la dependencia con el voltaje del H^+ era casi despreciable, por lo que sugirieron que el movimiento del cloruro dentro del canal es el responsable de la mayor dependencia con el voltaje del canal. Para estudiar la dependencia con el voltaje del movimiento de cloruro, se construyó un modelo que toma en cuenta tanto la permeación como el *gating*, por simplicidad se supuso que el canal está formado por solo un sitio de unión al cloruro. Con este modelo se logró reproducir el curso temporal de la activación, la conductancia en estado estacionario y la cinética de cierre. Según el modelo propuesto, cuando el canal está cerrado y se aplica un voltaje negativo, la probabilidad de ocupación del sitio de cloruro aumenta, una vez ocupado el sitio, ocurre una repulsión entre el cloruro y la compuerta (ácido glutámico) favoreciendo la apertura del canal. En el estado abierto, también se encontró que la probabilidad de ocupación del sitio de cloruro es favorecida por voltajes negativos, en estas condiciones, la ocupación del sitio interno del canal por el cloruro dificulta el cierre del canal debido a una repulsión entre el cloruro y la compuerta. Por tal motivo, los voltajes negativos favorecen la apertura del

canal, estabilizan su estado abierto al impedir que la compuerta se cierre y como consecuencia la probabilidad de apertura a voltajes negativos es alta, tal y como se observa experimentalmente. Para voltajes positivos, cuando el canal se encuentra en el estado abierto el sitio de cloruro tiene una probabilidad pequeña de ocupación, por lo que el canal se puede cerrar libremente y la probabilidad de apertura es muy pequeña. Es importante señalar que en el modelo de activación propuesto en este trabajo, es un modelo que toma en cuenta tanto la permeación como el *gating*, ningún modelo conocido tiene la característica de considerar simultáneamente las dos propiedades más importantes de los canales iónicos, su permeación y *gating*.

4.8 Trabajo a futuro

Es importante mencionar que a pesar del éxito del modelo en reproducir los datos experimentales, en el modelo se ha considerado solamente uno de los tres sitios de unión que existen en el canal. Para lograr una descripción más fina de los resultados experimentales, es necesaria la incorporación de los sitios de unión no considerados. Además de las observaciones experimentales descritas en este trabajo, existe también un efecto anómalo en la conductancia cuando la solución intracelular está formada por diferentes tipos de iones permeables ¹⁹, el estudio de dicho efecto es una extensión natural de este trabajo, en donde además de ser necesaria la inclusión de todos los sitios de unión al cloruro se requeriría tomar en cuenta los sitios de unión de otros iones.

Referencias

- 1 Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 2nd edn, (Sinauer Associates, Inc., 1992).
- 2 Sakmann & Neher. *Single-Channel Recording*. 2nd edn, (1980).
- 3 Gadsby, D. C. Ion transport: spot the difference. *Nature* **427**, 795-797, doi:10.1038/427795a 427795a [pii] (2004).
- 4 White, M. M. & Miller, C. A voltage-gated anion channel from the electric organ of *Torpedo californica*. *J Biol Chem* **254**, 10161-10166 (1979).
- 5 Koch, M. C. *et al.* The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* **257**, 797-800 (1992).
- 6 Cid, L. P., Montrose-Rafizadeh, C., Smith, D. I., Guggino, W. B. & Cutting, G. R. Cloning of a putative human voltage-gated chloride channel (CIC-2) cDNA widely expressed in human tissues. *Hum Mol Genet* **4**, 407-413 (1995).
- 7 Saito, F. *et al.* Human AQP2 and MIP genes, two members of the MIP family, map within chromosome band 12q13 on the basis of two-color FISH. *Cytogenet Cell Genet* **68**, 45-48 (1995).
- 8 Pusch, M. Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1. *Hum Mutat* **19**, 423-434, doi:10.1002/humu.10063 [pii] 10.1002/humu.10063 (2002).
- 9 Haug, K. *et al.* Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet* **33**, 527-532, doi:10.1038/ng1121 ng1121 [pii] (2003).
- 10 Ashcroft, F. *Ion Channel and Disease*. (2000).
- 11 Miller, C. Open-state substructure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **299**, 401-411 (1982).
- 12 Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**, 287-294, doi:10.1038/415287a 415287a [pii] (2002).
- 13 Accardi, A. & Miller, C. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl⁻ channels. *Nature* **427**, 803-807, doi:10.1038/nature02314 nature02314 [pii] (2004).
- 14 Miller, C. & White, M. M. Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2772-2775 (1984).
- 15 Dutzler, R., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Gating the selectivity filter in CIC chloride channels. *Science* **300**, 108-112, doi:10.1126/science.1082708 1082708 [pii] (2003).

- 16 Arreola, J., Begenisich, T. & Melvin, J. E. Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons. *J Physiol* **541**, 103-112, doi:PHY_16485 [pii] (2002).
- 17 Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Yusef, Y. R., Briones, R. & Sepulveda, F. V. Voltage-dependent and -independent titration of specific residues accounts for complex gating of a ClC chloride channel by extracellular protons. *J Physiol* **587**, 1387-1400, doi:jphysiol.2008.167353 [pii] 10.1113/jphysiol.2008.167353 (2009).
- 18 Santiago-Castillo, J. A. & Covarrubias, M. ICh-MASCOT A flexible and User Friendly Software for the Global Kinetic Modeling of Ion Channel Gating. *52nd Annual Meeting, Biophys. J.*, 1404-pos. (2008).
- 19 Sanchez-Rodriguez, J. E., De Santiago-Castillo, J. A. & Arreola, J. Permeant anions contribute to voltage dependence of ClC-2 chloride channel by interacting with the protopore gate. *J Physiol* **588**, 2545-2556, doi:jphysiol.2010.189175 [pii] 10.1113/jphysiol.2010.189175 (2010).