



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION NEUROCIENCIA**

“Mecanismo de sensibilidad a potencial de membrana en canales de K^+ de alta conductancia activados por Ca^{2+} y voltaje”

Alumno

Ignacio Segura Lanyon

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas Mención
Neurociencia**

Director de Tesis:

**Dr. Ramón Latorre de la Cruz
Universidad de Valparaíso**

Año 2021

INDICE

RESUMEN	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
I. Diseño modular en la estructura del canal BK.....	7
II. Dominio sensor de calcio.	10
III. Dominio del poro.....	10
IV. Dominio sensor de voltaje.....	14
V. Mecanismos alostéricos de <i>gating</i> en la estructura modular del canal BK.....	18
VI. Acoplamiento alostérico VSD-PD.....	19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
DISEÑO EXPERIMENTAL	23
MATERIALES Y METODOS	24
7.1 Biología Molecular.....	24
7.2 Animales de experimentación y microinyección.	27
7.3 Electrofisiología.	28
RESULTADOS	34
8.1 Caracterización de las <i>gating</i> currents en mutaciones puntuales sobre el VSD del BK.....	34
8.2 Solo dos argininas alteran la dependencia de voltaje de activación del VSD del canal BK.....	38
8.3 Una histidina en la posición 210 promueve el transporte de protones voltaje dependiente.	41
8.4 El equilibrio reposo - activo está determinado por interacciones electrostáticas. ...	42
DISCUSIÓN	46
REFERENCIAS.....	51

RESUMEN

Una característica distintiva de los canales de K^+ de alta conductancia activados por Ca^{2+} y voltaje (BK), es que pueden ser activados tanto por incrementos de Ca^{2+} citosólico como por la despolarización de la membrana plasmática. Esta capacidad se debe a la presencia de módulos sensores especializados, que actúan de manera sinérgica o independiente. Las contribuciones funcionales de los sensores a la apertura del canal surgen de interacciones alostéricas extendidas entre tres dominios estructurales, presentes en la subunidad α formadora de tetrámeros: i) el dominio de poro (PD), ii) el dominio sensor de voltaje (VSD) responsable de transducir cambios en el potencial transmembrana, y iii) el dominio C-terminal (CTD) que contiene sitios de unión a Ca^{2+} en los dominios reguladores de conductancia de K^+ (RCK) conformando el denominado *gating ring*. En ciertos canales de K^+ voltaje-dependientes (K_v), la activación del VSD se acopla alostéricamente con el poro mediante un cambio conformacional electro-mecánico, disminuyendo la energía libre necesaria para la apertura del canal. La activación del VSD conlleva un movimiento de cargas dentro de la proteína, fenómeno que se puede determinar experimentalmente en registros de corrientes de *“gating”*. Utilizando mutagénesis, se pueden neutralizar las cargas presentes en el VSD, para obtener una idea sobre su funcionamiento, pero en trabajos anteriores no se ha tenido éxito en ofrecer una explicación adecuada a susodichos mecanismos planteados. En este trabajo, mediante la medición de corrientes de compuerta o *“gating currents”* en macroparches de membrana de ovocitos de *X. laevis* expresando canales BK con mutaciones de neutralización sobre las cargas del VSD, demostramos que dos argininas en el segmento transmembrana S4 (R210 y R213) son las únicas cargas responsables de generar las corrientes de *gating* en el canal BK. De manera convincente, el paisaje energético de las partículas de *gating* se encuentra concertado electrostáticamente por una red de puentes salinos contenidos en el VSD. Simulaciones de dinámica molecular y el transporte de protones activado por hiperpolarización en el VSD modulado por la mutación R210H, sugieren que el campo eléctrico cae en una barrera muy estrecha, donde los límites se ven definidos por las dos partículas de *gating* identificadas. En este trabajo proporcionamos una descripción del mecanismo de detección de voltaje en canales BK, que muestra ser diferente al propuesto para otros canales de K^+ dependientes de voltaje

ABREVIATURAS

BK	Canal de potasio de alta conductancia activado Ca^{2+} y voltaje.
C	Factor alostérico que explica la interacción entre los sitios de enlace de Ca^{2+} y la puerta del canal.
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración de iones de calcio interno o intracelular.
C-O	Configuración cerrada y abierta del canal.
CTD	Dominio carboxilo terminal o dominio de cola citosólica.
D	Factor alostérico que explica la interacción entre los sensores de voltaje y la compuerta del canal.
E	Factor alostérico que explica la interacción entre los sensores de voltaje y los sitios de unión a Ca^{2+} .
e_0	Carga electrónica elemental (1.602×10^{-9} coulomb).
F	Constante de Faraday.
G(V)	Relación Conductancia vs. Voltaje.
$\Delta\Delta G_V$	Cambios en la energía libre de Gibbs de la activación de los sensores de voltaje inducida por mutaciones de neutralización.
I_g	Corriente de <i>gating</i> .
J	Constante de equilibrio para la transición de reposo (R) hacia activo (A) de cada sensor de voltaje.
J_0	Constante de equilibrio para la transición de reposo (R) hacia activo (A) de cada sensor de voltaje a cero potencial.
K	Constante de equilibrio para la transición de sitio-libre (U) hacia Ca^{2+} -unido (B) para cada sitio de unión a Ca^{2+} definido.
K_D	Constante de disociación.
Kv	Canales de K^+ voltaje-dependientes.
L	Constante de equilibrio para la transición de cerrado (C) hacia abierto (O) del dominio de poro.
PD	Dominio de poro.
Q_c	Carga de <i>gating</i> desplazada entre los estados cerrados (C-C) del canal.
$Q_c(V)$	Carga de <i>gating</i> desplazada entre los estados cerrados del canal versus el voltaje.
R	Constante de los gases ideales.
RCK	Regulador de la conductancia de K^+ .

R-A	Configuraciones reposo y active de los sensores de voltaje
T	Temperatura.
TM	Transmembrana.
TMD	Dominio transmembrana.
V	Voltaje.
V_h	Voltaje de activación media de la apertura del canal.
V₀	Voltaje de activación media de los sensores de voltaje.
ΔV_0	Cambios en el V_0 relativo a una condición inicial.
VSD	Dominio sensor de voltaje
wt	Canal silvestre o " <i>Wild type</i> ".
Z_J	Desplazamiento de cargas de gating asociadas con la transición de reposo hacia activo del sensor de voltaje.

INTRODUCCIÓN

Una importante cantidad de procesos celulares y fisiológicos se caracterizan por mantener el equilibrio o un estado estacionario específico. Esta capacidad de mantener sus condiciones internas estables se denomina homeostasis, y se lleva a cabo a nivel celular y de organismos complejos (Cannon, 1929). Para mantener la homeostasis se requiere de mecanismos de retroalimentación que permitan detectar, integrar y responder a una determinada perturbación. Un estímulo o perturbación de interés clave para el funcionamiento del sistema nervioso, corresponde a los cambios en la diferencia de potencial a través de la membrana (ΔV_m) plasmática de las células electro-excitable. Para lograr la homeostasis, estas células deben alcanzar el potencial de reposo, que está principalmente regulado por las conductancias de K^+ , ya que el potencial de reversión del ion K^+ es cercano al potencial de reposo de estas células. Por otra parte, diversas funciones celulares, incluidas la transmisión sináptica y la contracción muscular, implican aumentos del Ca^{2+} citosólico como la señal o perturbación en los mecanismos de transducción (Berridge et al., 2000; Ghosh and Greenberg, 1995). Así, la activación de conductancias dependientes de Ca^{2+} que corresponden a las respuestas más rápidas en la señalización celular, también participan en la regulación homeostática del calcio citosólico, y llevan a cabo cambios fisiológicos inmediatos y de largo plazo (Clapham, 2007). Sumado a los papeles funcionales que cumplen, es destacable que dentro de la gran familia de canales de iones Ca^{2+} -dependientes (Hille, 2001), los canales de K^+ activados por Ca^{2+} presentan una extensa distribución abarcando a una amplia diversidad de tipos celulares (Latorre et al., 1984; Schwarz & Passow, 1983).

Las primeras conductancias de K^+ inducidas por el aumento del Ca^{2+} intracelular fueron reportadas en eritrocitos humanos casi finalizando los años 50 (Gardos, 1958). Varios años más tarde, evidencia electrofisiológica clara de corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+} fue encontrada gracias a manipulaciones farmacológicas de la concentración plasmática o interna de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), tanto en neuronas de vertebrados como de invertebrados (Krnjević & Lisjewicz, 1972; Meech, 1978). En contraste, para esta época ya se distinguían las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} , de las corrientes de K^+ entonces halladas por Hodgkin y Huxley (1952).

Los primeros registros de actividad de un solo canal de K^+ de alta conductancia activado por Ca^{2+} y voltaje (BK) se reportaron en células de musculo esquelético (Pallota et al., 1981), células cromafines (Marty, 1981) y por reconstitución del canal desde células de musculo esquelético en bicapas artificiales (Latorre et al., 1982). Una de las características halladas en este canal es su gran conductancia unitaria de entre los 200 y 300 pS, ganándose el nombre de BK (por Big K^+) (Marty, 1983) o MaxiK (Latorre & Miller, 1983). De manera subsecuente, y gracias al descubrimiento de la mutación *Slowpoke* (Slo) en *Drosophila*, que erradica un componente de la corriente de salida de K^+ en células musculares (Elkins et al., 1986; Singh & Wu, 1989) y neuronas (Saito & Wu, 1991), llevaron a la identificación del primer gen y locus estructural que codifica para el canal BK (Adelman et al., 1992; Atkinson et al., 1991). También se ha descrito para sus ortólogos en mamíferos (Butler et al., 1993; Dworetzky et al., 1994; McCobb et al., 1995), demostrando que el canal BK se encuentra conservado evolutivamente y que las extensas variantes por *splicing* alternativo del canal BK son el producto de las modificaciones post-transcripcionales de un mismo gen.

La activación y apertura de poro del canal BK produce un rápido eflujo de iones K^+ que contribuyen a repolarizar el potencial de membrana (V_m) regulando así la excitabilidad de las células durante el potencial de acción, la homeostasis de iones intracelulares, la señalización de Ca^{2+} , y el volumen celular. La participación del canal BK en estas funciones celulares trasciende de importancia dada su distribución ubicua en una gran variedad de tejidos, concibiendo así a los canales BK como un elemento clave en la modulación de procesos fisiológicos en los cuales la excitabilidad eléctrica está ligada ejemplarmente a variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, la contracción de musculo liso (Dopico et al., 2018), la duración del potencial de acción (Contet et al., 2016; Jaffe et al., 2011; Vandael et al., 2010) y subsecuente frecuencia de disparo (Contet et al., 2016; Kimm et al., 2015) y liberación de neurotransmisores (Griguoli et al., 2016). Además están involucrados en el proceso de oír (Pyott & Duncan, 2016), en los ritmos circadianos (Meredith et al., 2006), y la expresión de genes (Li et al., 2014).

I. Diseño modular en la estructura del canal BK.

La clonación del gen *slo1* (también referido como K_{Ca} 1.1 y gen KCNMA1 en mamíferos) (Kaczmarek et al., 2017), y conjunto a lo que se ha descrito sobre el perfil de hidrofobicidad de la

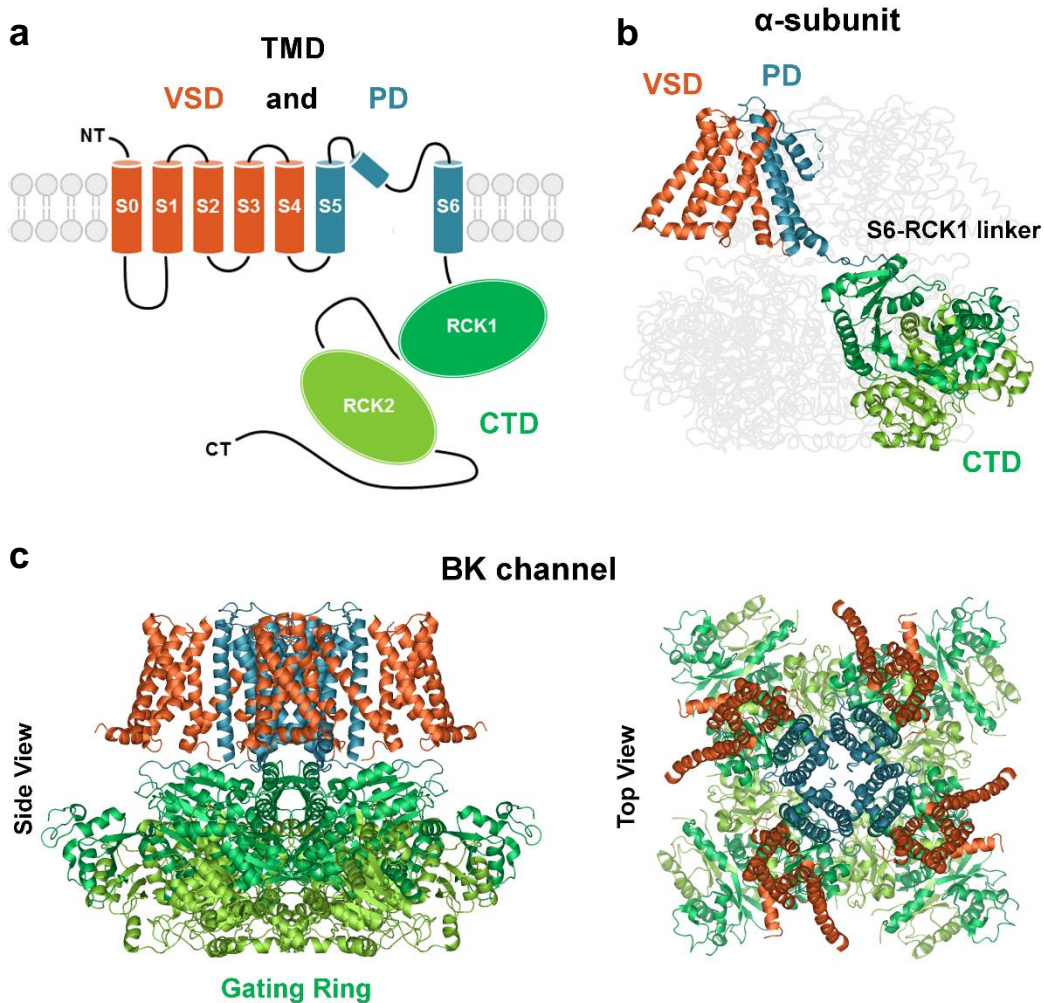


Figura 1. Estructura del canal BK. (a) Topología de membrana de una subunidad α , destacando sus tres dominios funcionales: PD (S5- hélice de poro- S6), VSD (S0-S4) y CTD (RCK1 y RCK2). (b) Estructura codificada en colores de PD (azul), VSD (naranja) y CTD (verde) de la estructura de *Aplysia californica* (acSlo1) (Protein Data Bank [PDB] ID: 5TJI) (Hite et al., 2017). Cabe destacar que a diferencia de otros canales Kv, en el canal BK no se aprecia una configuración de dominios-intercambiados entre el VSD y el PD dentro de una misma subunidad. Pero al mismo tiempo el *linker* S6-RCK1 crea un arreglo mediante el cual los dominios RCK se encuentran intercambiados y por tanto generando contacto físico con el TMD de la subunidad adyacente. (c) Organización homotetramérica completa de la estructura del canal BK desde una vista lateral (izquierda) y otra desde la parte superior (derecha).

proteína y análisis topológicos en la membrana plasmática mediante diversas aproximaciones experimentales, han revelado varias propiedades importantes de los canales BK (Adelman et al., 1992; Butler et al., 1993; Meera et al., 1997; Wallner et al., 1996). El gen *slo1* codifica para la subunidad *alfa* (α) la cual posee alrededor de 1100 aminoácidos, y se compone de una región

transmembrana (TMD) que alberga dos dominios funcionales: (1) la parte conductora de iones del canal compuesta por los segmentos S5-S6, denominado el dominio de poro (PD), y (2) en los segmentos S0-S4 el dominio sensor de voltaje (VSD) (**Figura 1a**). Las hélices transmembrana S1-S6 en el PD y VSD tienen una organización similar a la familia de canales de K⁺ voltaje-dependientes (K_v), pero la subunidad α del BK posee además un séptimo segmento llamado S0, que determina que el N-terminal del canal BK se oriente hacia el espacio extracelular a diferencia de otros canales K_v (**Figura 1a**) (Meera et al., 1997; Wallner et al., 1996). A continuación del TMD, se localiza un gran dominio carboxilo terminal (CTD) que consiste en aproximadamente un 65% de la totalidad de la secuencia, el que se compone por dos dominios no idénticos reguladores de la conductancia de K⁺ (RCK), RCK1 y RCK2. Cada RCK posee distintos sitios de unión a Ca²⁺. Basándose en estructuras obtenidas mediante cryo-EM de canales BK de *Aplysia californica* (acSlo1), se ha establecido que el *linker* entre el segmento transmembrana (TM) S6 y el dominio RCK1 genera una estructura de dominios intercambiados o “*domain-swapped*” entre el TMD y el CTD (Hite et al., 2017; Tao et al., 2017). En otras palabras, el VSD de una subunidad α hace contacto físico con el CTD de la subunidad adyacente, en la estructura cuaternaria del canal (**Figura 1b**). De igual manera, y en contraste con otros canales K_v, cuyos VSD se encuentran en forma *domain-swapped* con el dominio poro de sus subunidades adyacentes, ocurre que en los canales BK, el VSD interactúa directamente con el PD de una misma subunidad (**Figura 1**).

Esencialmente, cuatro subunidades α formadoras de poro se ensamblan para formar un canal BK funcional (Quirk & Reinhart, 2001; Shen et al., 1994) (**Figura 1c**), de tal manera que la estructura global de los canales BK concuerda con un diseño modular con tres partes distintivas: la conducción de iones o PD, el VSD, y por último el CTD, que forma un arreglo estructural citoplasmático en forma de anillo tetramérico denominado el *gating ring* (**Figura 1c**) (Hite et al., 2017; Tao et al., 2017; Wu et al., 2010; Yuan et al., 2010). Bajo esta premisa, análisis más profundos sobre la estructura global sugieren que cada módulo individual puede experimentar cambios conformacionales relativamente independientes en respuesta a los estímulos correspondientes, y a su vez permite el acoplamiento alostérico a través de extensas interacciones proteína-proteína (Zhou et al., 2017).

II. Dominio sensor de calcio.

El Ca^{2+} intracelular se une al CTD en el canal BK, donde cada regulador de conductancia o dominio RCK es capaz de unir Ca^{2+} en el rango micro molar desde 0,1-300 μM , lo que concuerda con la alta homología estructural observada entre los dominios RCK y RCK2 (Xia et al., 2002; Yusifov et al., 2010; Yusifov et al., 2008). A la fecha se han descrito dos sitios de unión a Ca^{2+} , el primero corresponde a un sitio de alta afinidad formado por cinco residuos de Aspartato ubicados en el RCK2 que inicialmente fue llamado el “*calcium-bowl*” (Schreiber & Salkoff, 1997) (**Figura 2c**). La constante aparente de disociación de Ca^{2+} obtenida por registros electrofisiológicos es aproximadamente 3,1 μM para el canal en estado abierto y 0,88 μM para el canal cerrado (Sweet & Cox, 2008). El segundo sitio, también de alta afinidad, se ubica en el RCK1 y está formado por los aminoácidos D367, R512 y M513 (Bao et al., 2002; Xia et al., 2002; Yusifov et al., 2010; Zeng et al., 2005). La constante de disociación aparente para este sitio es de alrededor de 23 μM para el canal abierto y 4,9 μM para el canal cerrado (Sweet & Cox, 2008). Se ha descrito un tercer sitio de unión de baja afinidad que puede unir Ca^{2+} y Mg^{2+} en concentraciones de 1 mM a 100 mM. En la formación de este sitio contribuyen residuos de RCK1 (E374 y E399), del lazo intracelular S0-S1 (D99) y del lazo intracelular S2-S3 (N172) (Shi et al., 2002; Xia et al., 2002; Yang et al., 2007) (**Figura 2b**). La estructura encargada de convertir la señal de Ca^{2+} en corrientes de K^+ que opera como un transductor quimio-mecánico corresponde a la estructura en forma de anillo llamada el *gating ring*, formada por los ocho dominios RCK, un par de RCK1-RCK2 por cada subunidad del tetrámero. Esta estructura posiblemente facilita la apertura de poro mediante el lazo RCK1-S6 (Niu et al., 2004). La transducción de energía ocurre debido a que la unión de Ca^{2+} en los dominios RCK provoca cambios en la forma del *gating ring* (Miranda et al., 2013; Yuan et al., 2010) (**Figura 2a**). Se ha estimado que por cada ion de Ca^{2+} unido la probabilidad de encontrar abierto el canal aumenta cerca de 4,7 veces y con todos los sitios saturados de Ca^{2+} este aumento podría alcanzar las 487 veces (Sweet & Cox, 2008).

III. Dominio del poro.

El dominio de poro o PD del canal BK está formado por los segmentos S5-S6 y la hélice de poro (PH) de cada subunidad, estructuras que convergen en el centro de simetría de la proteína y forman un poro acuoso que permite el paso de los iones (**Figura 3**). Su estructura puede ser dividida

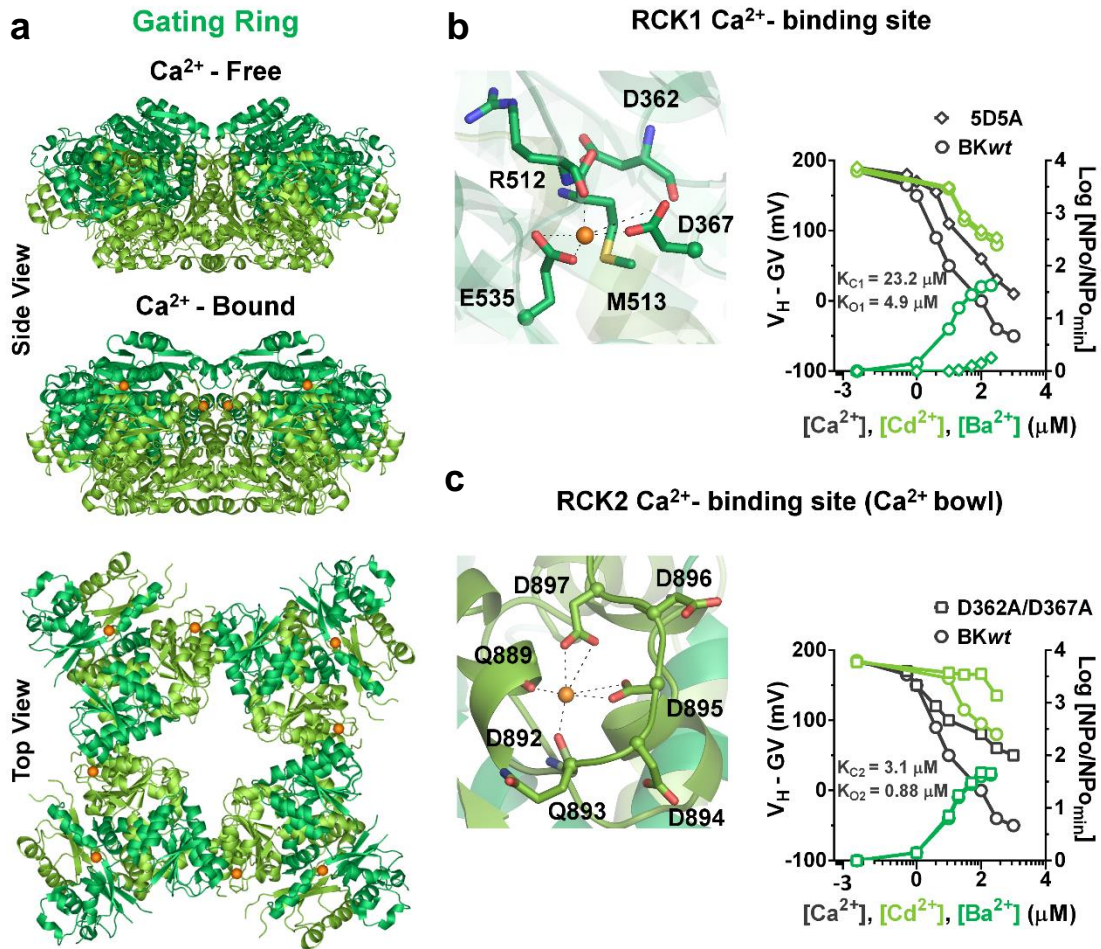


Figura 2. Sitios de unión a Ca²⁺ en el *gating ring*. (a) Estructuras cryo-EM del *gating ring* de acSlo1 en las conformaciones sin ligando (vista lateral; ID de PDB: 5TJI) y unido a Ca²⁺ (vista lateral y superior; PDB ID: 5TJ6), en la que los iones Ca²⁺ (esferas naranjas) se une en el sitio RCK1 (verde) y *calcium bowl* (verde claro). (b) Vista de alta resolución del sitio de unión RCK1 mostrando los residuos que coordinan el calcio D367, E535 y R514. (c) Vista de alta resolución del sitio de unión a Ca²⁺ RCK2. Se destaca el grupo de residuos de aspartato que forman el *calcium bowl* y los demás residuos coordinadores de Ca²⁺. A la derecha se muestran las curvas de activación dependiente de Ca²⁺-, Cd²⁺- y Ba²⁺ mediada por el sitio RCK1 (b) y por el *calcium bowl* (c) (Xia et al., 2002; Zeng et al., 2005; Zhou et al., 2012).

desde el espacio extracelular hacia el intracelular en: vestíbulo externo, filtro de selectividad y vestíbulo interno (**Figura 3**). Al comparar este dominio con el de otros canales selectivos a K⁺, se vuelven de particular interés los elementos moleculares que determinan la alta conductancia del canal BK, la cual excede por un orden de magnitud en proporción a otros canales K_v (Carrasquel-Ursulaez et al., 2018) a pesar de las similitudes estructurales presentes (Adelman et al., 1992;

Brelidze et al., 2003; Butler et al., 1993). El mecanismo molecular precedente a esta inusual conductancia no ha sido del todo resuelto, pero ideas pioneras derivan de la existencia de dos *clusters* de residuos ácidos que se localizan en las entradas intra- y extracelular de la vía de conducción (**Figura 3c, e**).

Se ha propuesto que las cargas negativas presentes en estos *clusters* actúan como infalibles trampas electrostáticas de modo que atraen y concentran localmente el K^+ , promoviendo el aumento de la conductancia (Brelidze et al., 2003; Carvacho et al., 2008). El vestíbulo externo presenta un anillo de cuatro residuos de ácido aspártico (D292) localizados en las cercanías de la entrada externa del filtro de selectividad (**Figura 3b, c**), los cuales contribuyen con aproximadamente un 40% de la conductancia unitaria (Haug et al., 2004). El filtro de selectividad no presenta mayores diferencias con otros canales K_v , ya que contiene la secuencia "TVGYGD" altamente conservada en estos canales, en la que los aminoácidos GYG son críticos para la conducción del ion K^+ (**Figura 3b**) (Heginbotham et al., 1994). De esta forma, los canales BK se vuelven altamente selectivos a K^+ por sobre Na^+ (Blatz & Magleby, 1984; Eisenman et al., 1986; Yellen, 1984). Por último, el vestíbulo interno contiene un anillo de ocho cargas negativas localizadas en la base del TM S6 (E321 y E324) que otros canales K_v no poseen. Se ha observado además, que en condiciones simétricas de potasio la corriente de salida disminuye aproximadamente a la mitad en canales con mutaciones de neutralización en las posiciones 321 y 324, lo que sugiere que estas cargas negativas incrementan la concentración de K^+ en el vestíbulo interno mediante interacciones electrostáticas de largo alcance (Brelidze et al., 2003; Carvacho et al., 2008; Nimigean et al., 2003). Por otro lado, interacciones entre los residuos F315 y L312 de subunidades alfa adyacentes (Carrasquel-Ursulaez et al., 2014; Hite et al., 2017; Wu et al., 2009) permiten estabilizar una estructura de anillo hidrófobo (**Figura 3b, d**) cuya deformación produce efectos importantes en la conductancia unitaria del canal (Carrasquel-Ursulaez et al., 2014). Es así como ciertas características como el tamaño del vestíbulo interno y la naturaleza de la compuerta que controla el flujo de iones, se tornan materia interesante de estudio ya que exhiben diferencias importantes respecto a otros canales de K^+ .

Estudios de accesibilidad utilizando reactivos modificadores de cisteínas (MTS) (Geng et al., 2011; Zhou et al., 2011) y la información reciente sobre la totalidad de la estructura en el canal BK (Hite et

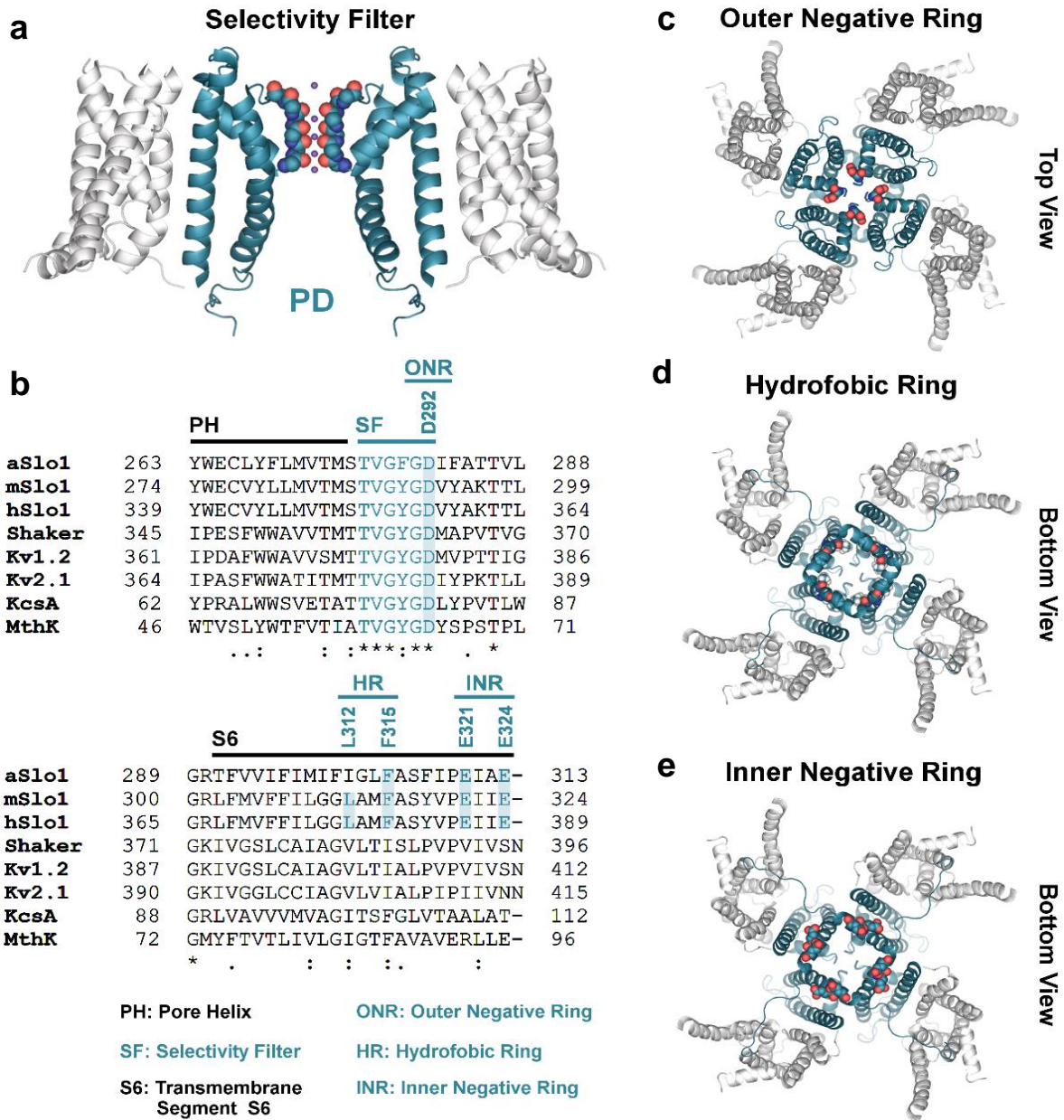


Figura 3. Características estructurales del dominio de poro. (a) Vista lateral de la estructura secundaria de dos subunidades α del dominio de poro (S5-PH-S6). Se resaltan los residuos del filtro de selectividad. (b) Alineación del dominio de poro de distintos canales K^+ , incluyendo la hélice de poro (PH), filtro de selectividad (SF) y segmento S6 del acSlo1 (UniProt Accession Number (AC): Q5QJC5), mSlo1 (Q08460), hSlo1 (Q12791), *Shaker-related* (B2RU13), Kv1.2 (P16389), Kv2.1 (Q14721), KcsA (P0A334) y MthK (O27564) (c) Ocho residuos hidrófobos (L312 y F315) forman un anillo hidrófobo (HR) (d) y ocho residuos de glutamato (E321 y E324) ubicados en la entrada interna de PD forman el Anillo Negativo Interno (INR) (e) Las coordenadas atómicas se tomaron de la estructura acSlo1 (PDB ID: 5TJI), para todos los casos los residuos se marcan en color rojo.

al., 2017; Tao et al., 2017) revelaron que el diámetro de la entrada interna del poro del canal BK es aproximadamente 20 Å más grande que en otros canales K_v , lo que ha llevado a considerar un posible efecto del tamaño del vestíbulo interno sobre la conductancia unitaria del canal (Naranjo et al., 2016). Consistentemente, al reducir el volumen efectivo de la cavidad interna del canal o reduciendo el tamaño del vestíbulo interno utilizando mutaciones puntuales en las posiciones E321 y E324 producen una disminución en la conductancia de canal único del BK (Brelidze & Magleby, 2005; Geng et al., 2011). Por otro lado, la utilización de bloqueadores de canales de K^+ (Miller, 1982) también permiten dar evidencia sobre las determinantes estructurales del poro. Cuando los canales BK son expuestos por el perfil intracelular a amonios cuaternarios de gran tamaño como deciltriethylamonio (C10) o tetrabutylamonio (TBA), la cinética de bloqueo es comparablemente más rápida (Li & Aldrich, 2004) que la observada en otros canales K_v bajo las mismas condiciones (Choi et al., 1993). Esencialmente, compuestos modificadores como MTS y bloqueadores de gran tamaño como C10 y TBA pueden ingresar al vestíbulo interno incluso cuando el canal se encuentra cerrado (Tang et al., 2009; Wilkens & Aldrich, 2006; Zhou et al., 2011) sugiriendo que la compuerta que controla el flujo de iones se encuentra por encima del vestíbulo interno.

Por último, varios estudios han permitido dilucidar que la mayor proporción del campo eléctrico a través del poro cae en el filtro de selectividad y tan solo un estimado del 7% de la resistencia total en la vía de conducción yace en el vestíbulo interno de los canales BK (Brelidze & Magleby, 2005; Carvacho et al., 2008; Díaz-Franulic et al., 2015; Geng et al., 2011), en contraste con los canales de K^+ *Shaker*, en los cuales la región del vestíbulo interno del poro es la que posee la mayor resistencia eléctrica (Díaz-Franulic et al., 2015; Naranjo et al., 2016).

IV. Dominio sensor de voltaje.

El dominio sensor de voltaje del canal BK (VSD) está formado por los TM S0-S4. Estos segmentos contienen residuos cargados distribuidos entre los segmentos S2 (R167 y D153), S3 (D186) y S4 (R207, R210, R213). Los residuos con cargas positivas del segmento S4 se encuentran intercalados por cada dos residuos hidrófobos (**Figura 4b**), y corresponde a un arreglo común en otros canales sensibles a voltaje como canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} .

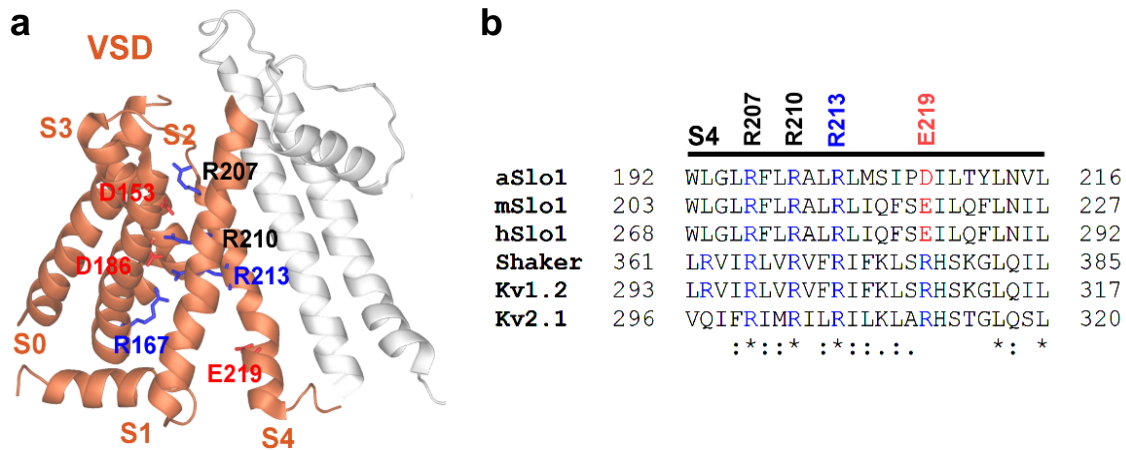


Figura 4. Estructura del dominio sensor de potencial (VSD) (a) Vista lateral de la estructura terciaria de la región TMD de una sola subunidad. El VSD (S0-S4) está en naranja y el PD (S6-PH-S6) está en gris claro. Se resaltan los posibles residuos sensores de voltaje ubicados en los TM S2 (D153 y R167), S3 (D186) y S4 (R213) (Díaz et al., 1998; Ma et al., 2006) (los residuos cargados positivamente y negativamente se colorean en azul y rojo, respectivamente). (b) Alineación del TM S4 de los canales Kv: acSlo1 (número de acceso UniProt (AC): Q5QJC5), mSlo1 (Q08460), hSlo1 (Q12791), *Shaker* (P08510), Kv 1.2 (P16389), Kv 2.1 (Q14721). Se resaltan los residuos sensores de voltaje canónicos en el TM S4 de los canales Kv (argininas R0-R4). Los números superiores indican los residuos cargados en mSlo1.

La primera prueba directa de que los canales BK poseen un VSD proviene de registros electrofisiológicos de corrientes de compuerta o “gating currents”, obtenidas en ausencia de Ca^{2+} y en ausencia de corrientes iónicas (Stefani et al., 1997) luego de restar la respuesta capacitiva de la membrana plasmática mediante un protocolo de pulsos pequeños y negativos para la sustracción de componentes lineales (Armstrong & Bezanilla, 1974). La corriente de gating o I_g resultante, también capacitivas, es la corriente eléctrica generada por la activación del VSD como consecuencia de la translocación de cargas o la reorientación de dipolos a través del campo eléctrico de la membrana en respuesta a cambios en el V_m . En palabras más simples, las I_g reflejan el movimiento de cargas del VSD que están embebidas en la membrana plasmática. Para determinar la naturaleza del proceso de activación del sensor de voltaje, se han estudiado las propiedades biofísicas de las corrientes de compuerta y se ha revelado que la relajación de las I_g se ajusta a una curva exponencial sin fase ascendente, así la naturaleza del sensor de voltaje implica que este se distribuya en al menos dos estados energéticos discretos: el estado reposo (R) y el estado activo (A). La carga desplazada durante la activación del VSD se obtiene integrando las I_g , y al graficar los datos

obtenidos en función del voltaje ($Q(V)$) (Horrigan et al., 1999), se puede describir una probabilidad relativa en equilibrio de encontrar las partículas de *gating* en un estado u otro utilizando la distribución de probabilidad de Boltzmann:

$$Q(V) = \frac{Q_{max}}{1 + e^{\frac{-zF(V-V_h)}{RT}}} \quad (Ec. 1)$$

Donde z determina la dependencia de voltaje, V_h es el voltaje al que se encuentran el 50% de los sensores en estado activo, T es la temperatura absoluta en grados Kelvin, F es la constante de Faraday y R la constante universal de los gases.

Se puede determinar la cantidad de cargas de *gating* por canal mediante el método Q / N (carga máxima de *gating* (Q) desplazada, sobre el número total de canales (N)). Los primeros resultados para el canal BK sugirieron que 4 a 5 cargas electrónicas fundamentales (e_0^-) son desplazadas por el VSD del canal (Stefani et al., 1997) durante la transición R - A. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que 0,6 e_0^- se desplazan por cada VSD, lo que da un equivalente a 2,4 e_0^- por canal (Horrigan & Aldrich, 2002; Horrigan et al., 1999b). Estos resultados revelan que en el VSD del canal BK se mueve por lo menos entre tres a cinco veces menos cargas que los VSD de canales K_v típicos como el canal *Shaker*, cuyo VSD mueve entre 12-14 e_0^- por canal (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Noceti et al., 1996; Schoppa & Sigworth, 1998; Seoh et al., 1996).

La secuencia especial de residuos básicos (principalmente argininas) localizados en el segmento TM S4, cada uno separado por dos residuos sin carga, corresponde a un patrón altamente conservado en los canales dependientes de voltaje. Se ha llegado al consenso de que el TM S4 es el componente principal en la detección de voltaje en canales K_v porque alberga todos los residuos cargados implicados en la sensibilidad a voltaje (**Figura 4b**) (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Gandhi & Isacoff, 2002; Islas & Sigworth, 1999; Jensen et al., 2012; Seoh et al., 1996), los cuales pueden cruzar parcial o completamente el campo eléctrico de la membrana, contribuyendo a la carga total del *gating* del canal (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Gandhi & Isacoff, 2002).

Pese a que el canal BK posee un segmento TM S4 con un arreglo equivalente; R207, R210 y R213 (en mSlo1; **Figura 4b**), homólogos a los residuos sensores de voltaje canónicos R2, R3 y R4 en el S4 del canal $K_v1.2$ (**Figura 4b**), se ha propuesto que solo el residuo R213 en el segmento S4

de los canales BK contribuye a la carga de *gating* (Díaz et al., 1998; Ma et al., 2006). Por otro lado, utilizando el modelo cinético de H-A (Horrigan y Aldrich, 2002), se ajustaron datos obtenidos de experimentos de corrientes iónicas y se propuso que otros tres residuos están involucrados, D153 y R167 en el TM S2, y D186 en el S3 (**Figura 4a**) (Ma et al., 2006). Adicionalmente, el residuo E219 en el C-terminal del segmento TM S4 fue también sugerido como posible sensor de voltaje (Zhang et al., 2014). Así, esta distribución “descentralizada” de las cargas de *gating* y la **sensibilidad** a voltaje relativamente débil del canal BK, sugieren que los segmentos S2, S3 y S4 experimentan tan solo pequeños desplazamientos en respuesta a los cambios de voltaje, mecanismo que difiere al gran movimiento del segmento TM S4 durante la detección de voltaje en otros canales K_v (Ma et al., 2006).

Para realizar un sondeo de los cambios conformacionales del VSD en canales BK se ha utilizado una técnica denominada *voltage-clamp fluorometry* (VCF), donde se demostró que los movimientos relativos de los segmentos TM S2 y S4 a través del campo eléctrico de la membrana resultan de interacciones recíprocas y cooperativas entre sí, ya que la neutralización de cargas en un segmento afectan directamente el movimiento del otro (Pantazis et al., 2010a). Además, en experimentos utilizando apagadores o “*quenchers*” de fluorescencia, se encontró que posterior a la despolarización, el segmento TM S4 se aleja de los demás segmentos transmembrana, mientras que el segmento S2 se acerca al S1 (Pantazis et al., 2010b; Pantazis & Olcese, 2012), sugiriendo que la activación del VSD del canal BK involucra cambios conformacionales importantes. Cabe destacar que en la estructura del acSlo1 se revela que la hélice S4 se acomoda en forma antiparalela respecto del segmento TM S5 en el PD de una misma subunidad α (**Figura 1a, b, c**). Este arreglo estructural podría restringir el movimiento del TM S4 de canales BK (Tao et al., 2017; Zhou et al., 2017). En contraste, las hélices del segmento S4 de canales K_v se encuentran fundamentalmente separadas del segmento TM S5 (Long et al., 2005; Long et al., 2007) y presentan menor impedimento estérico para someterse a un cambio conformacional (Tao et al., 2017). Además, el centro de transferencia de carga presente en los segmentos S3-S4 de otros canales K_v , que corresponde a una estructura importante para el movimiento de cargas de *gating* (Long et al., 2005), no se encuentra presente en la estructura del acSlo1 (Tao et al., 2017; Zhou et al., 2017).

V. Mecanismos alostéricos de *gating* en la estructura modular del canal BK.

El modelo alostérico es un constructo teórico que permite explicar los cambios en el trabajo molecular de proteínas altamente cooperativas, que sobrellevan modificaciones estructurales debido a un estímulo determinado, desencadenándose en un nuevo estado energético. El desarrollo de dicho modelo comprende dos aspectos cruciales, uno estructural y otro farmacológico. Por tanto, los mecanismos moleculares de *gating* se pueden esclarecer en función de lo que ya se conoce sobre la estructura de un canal de iones.

Así, la activación del VSD por voltaje y del CTD por la unión de calcio, permiten aumentar la probabilidad de apertura del poro mediante un acoplamiento electromecánico y quimiomecánico respectivamente, los que además funcionan de manera independiente, y son fenómenos bien descritos en términos de mecanismos alostéricos (Monod et al., 1965). El término *gating* en el estudio de canales de iones, alude a una “compuerta” que controla el paso de iones, análogo a una manivela que controla la apertura y cierre de una verja.

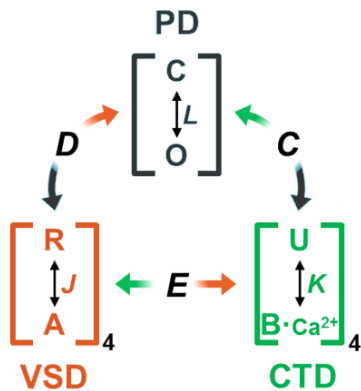


Figura 5. Modelo alostérico HA de *gating* de canales BK. Esquema del modelo alostérico de HA (Horrigan y Aldrich, 2002) indica los posibles estados de los sensores del PD (C-O), VSD (R-A) y CTD (U-B·Ca²⁺) en cada una de las cuatro subunidades α . La apertura del canal se define por la constante de equilibrio, L; La activación de VSD se define mediante la constante de equilibrio J, la unión de Ca²⁺ se define mediante la constante de equilibrio K. Las relaciones alostéricas entre los módulos se describen por los factores alostéricos D para PD-VSD, C para PD-CTD y E para CTD-VSD.

El modelo alostérico propuesto por Horrigan y Aldrich (2002) (**Figura 5**) destaca por su equilibrio entre la simplicidad y las capacidades predictivas que proporcionan un punto de partida útil para analizar los mecanismos de *gating* del canal BK en términos de interacciones entre los módulos del canal (Horrigan & Aldrich, 2002).

VI. Acoplamiento alostérico VSD-PD.

En ausencia de voltaje o Ca^{2+} , la compuerta del canal BK, o PD, puede transitar entre los estados cerrado (C) y abierto (O) con una probabilidad de estado abierto intrínseca (P_0) (Pallotta, 1985) de aproximadamente 10^{-7} (Cui & Aldrich, 2000; Horrigan & Aldrich, 1999). Por otro lado, en ausencia de Ca^{2+} , el equilibrio C-O regido por la constante de equilibrio L , se ve regulado además por cuatro sensores de voltaje independientes e idénticos.

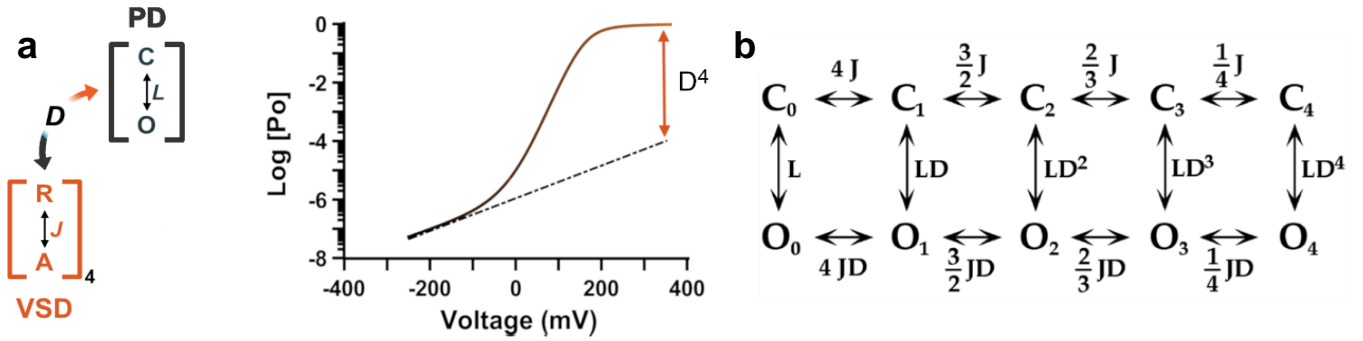


Figura 6. Acoplamiento *gating*-apertura de poro del canal BK. (a) (Izquierda): Modelo de compuerta alostérica entre el VSD y el PD en ausencia de Ca^{2+} . (Derecha): la activación del VSD incrementa la P_0 del canal BK a través del factor de acoplamiento D que describe la interacción energética VSD-PD según $D = e^{-\Delta\Delta G_{C\leftrightarrow O}^V/RT}$, debido a que la contribución energética de cada VSD al equilibrio C-O corresponde a $\Delta\Delta G_{C\leftrightarrow O}^V = -kT\ln(D)$. (b) Esquema del modelo alostérico que indica las transiciones entre los distintos estados cerrados y abiertos con sus respectivas constantes de equilibrio y constantes alostéricas, por un lado el esquema indica que a medida que aumenta el voltaje la constante de equilibrio J se hace más grande, por lo que la probabilidad de apertura estaría determinada por un factor $L(1 + DJ^4)$ (Horrigan et al., 1999a).

La despolarización de la membrana activa el VSD el cual transita desde un estado de reposo (R) hasta el estado activado (A) regido por la constante de equilibrio J , promoviendo la apertura del canal (Figura 6), fenómeno que se demuestra experimentalmente midiendo las corrientes de *gating*.

La función de cada VSD se define por la constante de equilibrio $J(V)$, descrita a continuación en la ecuación 2, mientras que la influencia del VSD sobre el equilibrio del PD se define por el factor alostérico D (Figura 6).

$$J(V) = J_0 e^{\frac{z_J q e V}{kT}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde J es la constante de equilibrio de la transición R-A, J_0 es la misma constante de equilibrio a $V = 0$, el parámetro z_j es la carga aparente desplazada asociada con la transición R-A, V es voltaje, q_e corresponde a la carga electrónica elemental o carga del electrón ($1,6022 \times 10^{-19}$ C), k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ JK⁻¹) y T es la temperatura en grados Kelvin.

La forma en que los cambios conformacionales del VSD mediados por voltaje se acoplan con la apertura del poro aún no está clara, pero se ha propuesto que el segmento TM S6 podría desempeñar un papel importante. Sobre esto se ha estudiado las interacciones entre los residuos E219 y E321/E324 (Zhang et al., 2014) situados en el lado citosólico de los TM S4 y S6, respectivamente, y se ha encontrado que al eliminar estas interacciones, disminuye significativamente el valor de la constante de acoplamiento VSD-PD. También se demostró que la neutralización de los residuos del VSD E180, E186 y R210 producen efectos consistentes con una reducción del factor alostérico D (Ma et al., 2006), lo que sugiere que las interacciones entre los residuos en diferentes segmentos TM pueden tener cierto impacto en la interacción VSD-PD. Adicionalmente, basado en estudios funcionales donde se modificaron residuos en el poro del canal y modelamiento molecular, se ha propuesto que un anillo hidrófobo podría actuar como un nodo de integración entre las señales alostéricas de ambos dominios (Carrasquel-Ursulaez et al., 2014, 2018).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de que el canal BK ha sido ampliamente caracterizado, el estudio directo de su VSD ha presentado diversos obstáculos experimentales. El estudio de la activación del sensor de voltaje requiere de la medición de las corrientes de *gating* para describir apropiadamente las relaciones energéticas del equilibrio entre los estados *R* y *A*. Como se mencionó anteriormente, la carga de *gating* por canal relativamente pequeña (Stefani et al., 1997), lo que sumado a la gran conductancia del canal BK, complican el apropiado aislamiento de las corrientes de *gating* de las corrientes de iones. Además, las mutaciones de los residuos en el VSD pueden producir grandes corrimientos en el eje del voltaje tanto en las curvas $Q(V)$ como en las curvas de conductancia-voltaje ($G(V)$) (Ma et al., 2006). Bajo esta premisa, se vuelve necesario alcanzar voltajes extremos para definir apropiadamente la dependencia de voltaje de algunas mutantes, lo que resulta difícil de lograr experimentalmente. Es por esto que la identificación de las partículas de activación del VSD en canales BK ha sido abordada solo mediante aproximaciones indirectas (Díaz et al., 1998; Ma et al., 2006). La combinatoria de mediciones electrofisiológicas de corrientes macroscópicas y modelamiento cinético sugieren que el VSD del canal BK se encuentra “descentralizado”, donde cuatro residuos cargados (D153 y R167 en el S2, D186 en el S3, y R213 en el S4) supuestamente actúan como las partículas que otorgan la sensibilidad a voltaje. Así, se vuelve relevante determinar con precisión cuales son las partículas de *gating* en el canal BK. En el presente trabajo se muestra una caracterización de las corrientes de *gating* del canal BK con mutaciones puntuales de neutralización, para determinar su influencia en la dependencia de potencial del canal. Tanto el canal *wild type* (wt) como las mutantes se expresarán heterológamente en ovocitos de *X. laevis*, como se describe a continuación.

HIPÓTESIS

En el canal BK, el proceso de activación del VSD gobernado por el movimiento de cargas del S4, se limita a un pequeño desplazamiento de los aminoácidos R210 y R213, residuos que generan una pequeña barrera hidrófoba en donde el campo eléctrico que atraviesa la membrana plasmática se debilita. Basándose en los antecedentes entregados, la identificación de los residuos involucrados en el movimiento de cargas de compuerta solo puede realizarse de manera inequívoca mediante la medición de corrientes de *gating*.

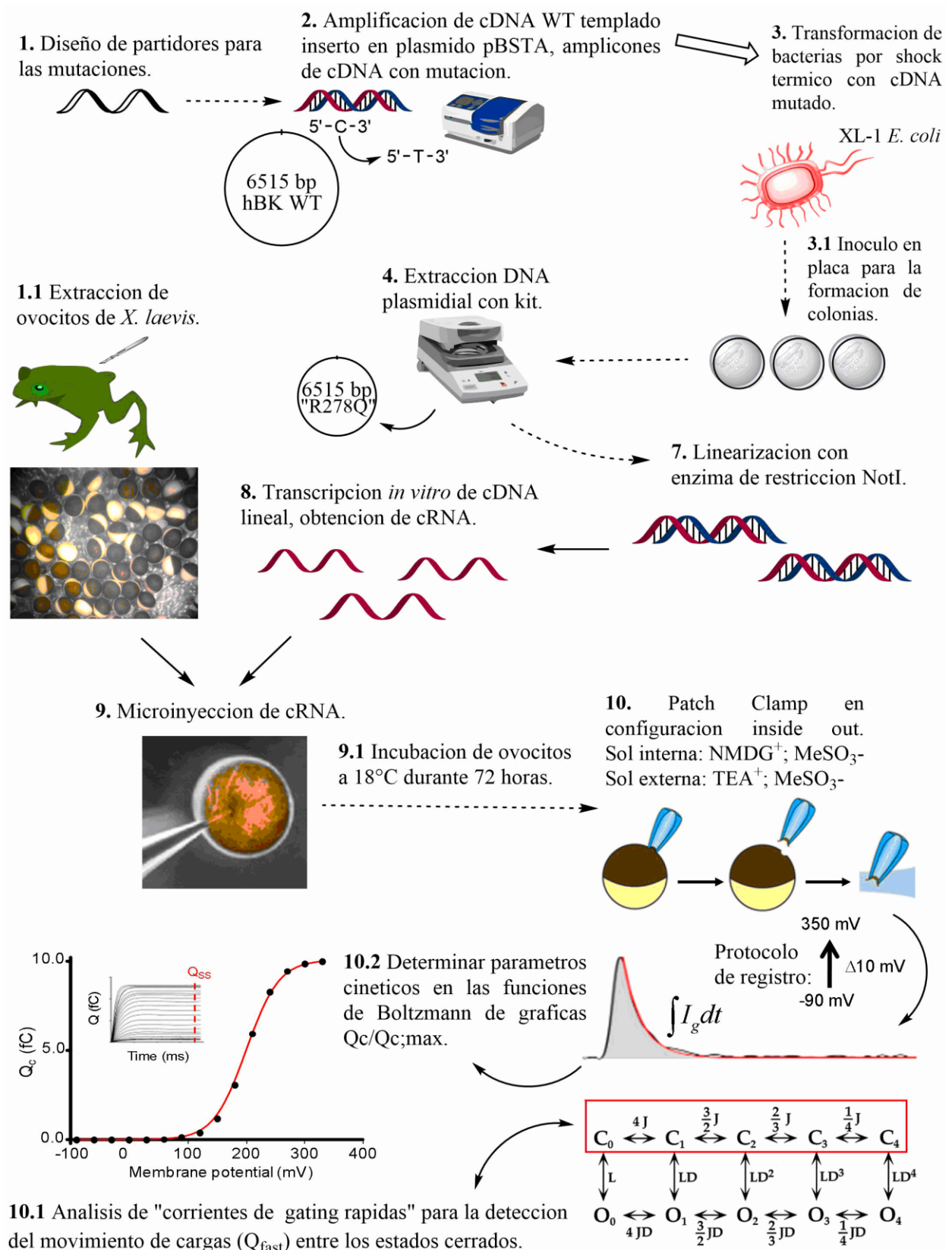
OBJETIVO GENERAL

Identificar y determinar el rol funcional de los aminoácidos encargados del movimiento de cargas en el VSD del canal BK.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar electrofisiológicamente las corrientes de *gating* de canales BK con mutaciones individuales de residuos dentro del VSD.
- II. Dilucidar los mecanismos de pérdida de sensibilidad a voltaje que producen las mutaciones específicas en el VSD.
- III. Evaluar la contribución energética al equilibrio R-A del VSD mediado por residuos cargados que no alteran la dependencia de voltaje del canal.
- IV. Establecer un posible mecanismo de activación del sensor de voltaje del canal BK.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y METODOS

7.1 Biología Molecular.

7.1.1.- Bacterias.

7.1.1.1.- Cepa Bacteriana.

Se utilizó la cepa bacteriana XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA USA) y se eligió de acuerdo a sus características genéticas recomendadas para amplificar las secuencias de DNA clonadas en el vector pBSTA.

7.1.1.2.- Cultivo de bacterias.

Los cultivos de bacterias crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB) a 37°C el cual se agito a 225 ciclos/minuto, en un agitador orbital. Para los cultivos en medio sólido, se utilizó medio LB suplementado con agar-agar al 1,5%. Todos los medios se esterilizaron a 125°C y 15 Psi por 45 minutos.

7.1.1.3.- Obtención de bacterias competentes.

Las bacterias XL-1 Blue se hicieron competentes mediante un protocolo utilizando cloruro de rubidio. Se aisló una colonia bacteriana cultivada en medio líquido LB sin antibiótico. Esta colonia se inoculo en 100 mL de medio LB y se dejó incubando a 37°C overnight (O.N.). Este cultivo se diluyo 100 veces en 100 mL de medio mínimo y creció hasta alcanzar una densidad óptica (D.O) de 0,5 a 0,6 a 550 nm. Los cultivos se sedimentaron por centrifugación a 4800 g por 15 minutos a 4°C, para luego resuspender en una solución estéril y fría que contenía 50 mM de KCH_3CO_2 , 50 mM de MnCl_2 , 10 mM de RbCl , 10 mM CaCl_2 y glicerol al 12% *p/v*, todo a pH = 7,0.

Las bacterias se incubaron en hielo por 90 minutos, se hicieron alícuotas y se congelaron en nitrógeno líquido, posteriormente se almacenaron a -80°C.

7.1.1.4.- Transformación de bacterias.

Las bacterias competentes fueron descongeladas en hielo durante 10 minutos, luego se agregó la muestra de DNA (1 ng de DNA aproximadamente o producto de PCR) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Las bacterias fueron sometidas a shock térmico a 42°C durante 45 segundos, y posteriormente fueron transferidas inmediatamente a hielo. Las bacterias se incubaron durante 1 hora a 37°C en 0,5 mL de medio LB. El cultivo se transfirió a placas con medio sólido suplementadas con Ampicilina a 50 µg/µL (Sigma-aldrich, St Louis MO), y se incubaron a 37°C por un mínimo de 4 horas hasta un máximo de 20 hrs, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico codificada en el plásmido deseado.

7.1.2.- Diseño de partidores y mutagénesis.

Se utilizó el cDNA codificante de la unidad α del canal BK (N° acceso GeneBank: U11058) clonado de humano. Este canal (hBK) fue sub-clonado en el vector pBSTA, el cual fue gentilmente donado por la Dr. Ligia Toro de la Universidad de California (UCLA), EE.UU. Este cDNA será el templado para la mutagénesis sitio-dirigida por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El diseño de partidores fue realizado mediante el software SnapGene™, en donde se insertó el vector pBSTA con el gen hBK, y mediante las herramientas de base de datos del software, se intercambiaron nucleótidos específicos en la secuencia del BK para obtener *primers* con mutaciones que permiten sintetizar por PCR, el cDNA que expresa para cada uno de los BK con mutaciones puntuales en todos los residuos cargados del VSD.

7.1.3.- Obtención y purificación de plásmidos de DNA.

El DNA se extrajo de un cultivo de bacterias ya transformadas con el cDNA de interés, en este caso obtenido de cada PCR realizada con *primers* para distintas mutaciones, que se dejaron creciendo O.N. a 37°C con agitación a 300 rpm. La extracción de DNA se realizó con columnas "Maxi" según las indicaciones del fabricante (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA).

7.1.4.- Transcripción *in vitro*.

7.1.4.1.- Linearización y Purificación de DNA.

Para obtener DNA preparado para la transcripción, se linearizó con una enzima de restricción de corte único, *NotI*, cuyo sitio de corte se encuentra en el extremo 3' de la región a transcribir. Se linearizaron 10-20 µg de DNA según el protocolo recomendado para la enzima, en un volumen total de 50 µL. La mezcla de reacción se incubó por 4 horas a 37°C. El producto de linearización se verificó cargando 1 µL de la reacción en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, estimando el tamaño de DNA en referencia al DNA circular. El DNA lineal se purificó haciendo pasar el producto por columnas de purificación (QuiaQuick Gel Extraction kit, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA).

7.1.4.2.- Preparación del RNA mensajero.

La transcripción *in vitro* se efectuó con el kit mMMESSAGE mMACHINE T7 *ultra* (Ambion Inc., Austin, TX, USA). Se utilizó la enzima RNA polimerasa T7, puesto que el DNA codificante se encuentra bajo el control del promotor de virus T7, en el vector pBSTA. Los reactivos se agregaron en el siguiente orden: 10 µL de nucleótidos trifosfatos (NTP), 2 µL de tampón de transcripción 10X, 1 µg de DNA lineal y 1 µL de enzima T7 en un volumen final de 20 µL. Esta mezcla se incubó por 10 minutos a 37°C para luego agregar 1 µL de GTP 30 mM, y seguir incubando por al menos 2 horas más a 37°C. Para terminar la reacción, el DNA se digirió utilizando 1 µL de TURBO-DNasa e incubando por 15 minutos a 37°C. Se usó la enzima *E. coli* Poly(A) polimerasa (E-PAP), para agregar una cola de poliadenina al RNA mensajero sintetizado e impedir la rápida degradación en el citoplasma de los ovocitos. La reacción entonces se realizó agregando al producto anterior los reactivos en el siguiente orden: 36 µL de agua libre de nucleasas (RNasa free), 20 µL de tampón de poliadenilación 5X, 20 µL de MnCl₂, 10 µL de ATP y 4 µL de la enzima E-PAP. La mezcla se incubó por 30 minutos a 37°C, finalmente la enzima fue inactivada incubándola en hielo por 10 minutos. El cRNA sintetizado se purificó utilizando columnas de purificación de RNA según las indicaciones del fabricante (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany). La integridad del transcrito obtenido se verificó en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm.

7.2 Animales de experimentación y microinyección.

7.2.1.- Preparación de Ovocitos de *Xenopus laevis*.

Ranas adultas hembras de *X. laevis* se anestesiaron por inmersión en 5% p/v de tricaina. (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 30 minutos. Mediante una incisión abdominal se procedió a disectar dos lóbulos ováricos. Estos últimos se transfirieron a solución OR-2, compuesta por 82,5 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 5 mM de ácido N-(2hidroxietil) piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), a pH = 7,6. La incisión fue suturada y el ejemplar se colocó en agua de ranas para su recuperación.

Los lóbulos fueron desmembrados manualmente en grupos de 5 a 10 ovocitos y luego desfoliculados por digestión enzimática con colagenasa tipo 2 (450 U/mL; Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ) en medio OR-2, por un periodo de 45 a 60 minutos, a temperatura ambiente y con una agitación orbital de 30 a 60 ciclos/minuto. Los ovocitos se lavaron 3 veces en medio OR-2 sin colagenasa, y 2 veces en solución SOS (100 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 5 mM HEPES a pH = 7,6). Posteriormente los ovocitos se colocaron en una placa de Petri con medio SOS suplementado con amikacina (300 µg/mL; LabChile SA, Santiago, Chile) y se efectuó una primera selección de ovocitos, que se mantuvieron en incubación a 18°C. Doce a veinticuatro horas después de finalizado el tratamiento, se efectúa una segunda selección de ovocitos, eligiendo mediante inspección visual aquellos ovocitos que no tuvieran membrana de células foliculares. Estos ovocitos se inyectaron con los cRNA preparados de cada una de las mutantes del canal BK o el canal silvestre, durante las próximas 12 horas.

7.2.2.- Expresión heteróloga de canales en ovocitos de *X. laevis*.

Se inyectó un volumen de 50 a 100 nL de cRNA dependiendo del fenotipo de expresión de la mutante (amplitud de corriente por concentración de cRNA), a una concentración de 1 µg/µL de BK α wt y con mutaciones puntuales. La microinyección se realizó con la ayuda de un sistema que consistió de una lupa binocular (Nikon, Tipo 2001), una fuente de luz con fibra óptica ("FO-Z", Chiu Technical Corp.; World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA), un microinyector (NANOJECT, Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) y un micromanipulador ("M3301R", WPI,

Sarasota, FL, USA). Las micropipetas de inyección se fabricaron estirando capilares de vidrio (“4878”, WPI, Sarasota, FL, USA) en un *puller* o estirador horizontal (Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA). La punta de micropipeta se quebró con una tijera especial bajo la lupa, con el objetivo de obtener puntas de un diámetro aproximado de 10 μm . La extensión total de la micropipeta fue llenada con aceite mineral (M-3516, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). La micropipeta se insertó en el vástago del microinyector y se hizo avanzar la punta del microinyector hasta casi el máximo que cede. Se succiono entonces un volumen de 2 μL de RNA mensajero, depositado previamente en un trozo de Parafilm® ubicado sobre una placa de Petri llena de hielo. Los ovocitos seleccionados anteriormente se depositaron en una placa plástica que contenía medio OR-2. Esta placa tiene pequeños sacados de 1 mm de ancho que permite mantener a los ovocitos en una posición fija durante la microinyección. Los ovocitos se inyectaron inmediatamente por el polo animal o su región oscura.

Los registros electrofisiológicos se efectuaron 1-4 días después de la microinyección. Durante este tiempo los ovocitos microinyectados se mantuvieron en incubación a 18°C en medio SOS suplementado con amikacina. Previo a la realización de los experimentos de “Patch-Clamp”, se removió la manualmente la membrana vitelina del ovocito con un par de pinzas especiales (Dumont #5, Switzerland).

7.3 Electrofisiología.

7.3.1 Técnica de “Patch-Clamp”.

El registro de las corrientes de *gating* se realizó mediante la técnica de *patch-clamp* (Hamill et al., 1981) en configuración “inside-out” en macroparches de membrana de ovocito (Hilgemann, 1989).

7.3.2 Sistema de registro.

El sistema de registro se esquematiza en la **Figura 7** y está formado por: una cámara donde se ubica el ovocito, un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA), dos filtros Bessel de 8 polos, un para la corriente y otro para el voltaje (Frequency Devices 900, Haverhill, MA, USA), un osciloscopio de dos canales modelo 6502A (Hung Chang Co. Ltd., Seúl, Corea del Sur),



Figura 7. Esquema del sistema de registro para "Patch-Clamp".

una tarjeta de adquisición (convertor) National Instruments BNC-2110 (National Instruments, Austin, TX, USA) y un computador basado en el procesador Intel Core 2 Duo (Intel Corp., Santa Clara, CA, USA).

La cámara de registro se montó sobre una mesa antivibratoria fabricada en el laboratorio y justo debajo de una lupa binocular (WPI, Sarasota, FL, USA) con un rango de magnificación de 14 a 80 veces. La visualización del ovocito fue facilitada por una fuente de luz LED construida en el laboratorio.

La posición y el desplazamiento de la pipeta de registro se controló con un micromanipulador compuesto por tres plataformas con tornillos micrométricos (SI MP-85, Sutter Instruments Co., San Rafael, CA, USA) con un desplazamiento en los ejes X e Y en el plano horizontal y con desplazamiento en el eje Z desviado 45° en relación al plano vertical.

7.3.3 Pipeta de Registro.

Para los experimentos de *Patch Clamp* se utilizó pipetas de vidrio de borosilicato (1B150F-4, WPI, Sarasota, FL, USA), que fueron estiradas con calor en un "puller" o estirador horizontal (modelo P97, Sutter Instruments Co., San Rafael, CA, USA). Las pipetas utilizadas fueron de 10-45 μm de diámetro con una resistencia de 0.3 a 1 $\text{M}\Omega$, dependiendo de la utilidad; para corrientes iónicas se usaron pipetas más pequeñas y de mayor resistencia, y para corrientes de *gating* se usaron pipetas lo más

grande posible y de menor resistencia. Estas pipetas poseen un diámetro mayor que las habituales, es por eso que los parches se denominan macro parches. Los electrodos metálicos se fabricaron con alambre de plata recubiertos con cloruro de plata (Ag/AgCl).

7.3.4 Soluciones de registro.

Para el registro de corrientes macroscópicas de potasio el ovocito se bañó con una solución de: 110 mM KOH, 10 mM de HEPES, 5 mM de EGTA para obtener una solución “cero Ca^{2+} ” ($\sim 0,8$ nM, basada en la presencia contaminante de aproximadamente $10 \mu\text{M}$ $[\text{Ca}^{2+}]$) (Cui et al., 1997). Las pipetas de registro se llenaron con una solución a concentración simétrica con 110 mM de KOH, 10 mM HEPES y 2 mM MgCl_2 .

Para el registro de corrientes de *gating* el ovocito se bañó con una solución de: 110 mM de N-metil-D-Glucamina (NMDG-MeSO_3), 10 mM de HEPES, 5 mM de EGTA. Las pipetas de registro se llenaron con una solución a concentración simétrica con 110 mM de Tetraetilamonio (TEA-MeSO_3), 10 mM de HEPES, 2 mM de MgCl_2 . Todas las soluciones fueron tituladas a $\text{pH} = 7.4$ utilizando HMeSO_3 .

Para el registro de las corrientes de protones se utilizaron las mismas soluciones de *gating* con excepción de la solución de la pipeta, la cual lleva 110 mM TEA y 10 mM MES para obtener $\text{pH} \leq 5.5$, o 10 mM HEPES para $\text{pH} > 5.5$. La solución del baño contiene 110 mM NMDG, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA con $\text{pH} = 7.4$ ajustado con HMeSO_3 .

Las soluciones se mantuvieron almacenadas a 4°C . Para realizar los registros se esperó a que las soluciones alcanzaran temperatura ambiente ($21^\circ \pm 1^\circ\text{C}$)

7.3.5 Adquisición y análisis

Para la obtención de las corrientes macroscópicas (I_k) se utilizó un protocolo que consiste en pulsos rectangulares de voltaje, de magnitud creciente y con una duración de 10 ms con incrementos de voltaje de +10 mV. El potencial de holding y el voltaje final fueron escogidos dependiendo de las características de cada mutante: el potencial de holding fue -100 mV para todos los casos con excepción de la mutante R207Q, para la cual el potencial de holding fue de -200 mV; el voltaje final fue de 300 mV excepto para la mutante D153N (400 mV), R167Q (400 mV), D186N (350 mV), R210Q

(400 mV), R213Q (400 mV) y E219Q (400 mV). Los comandos de voltaje y de entrada de corriente se filtraron a 20 kHz y 10 kHz respectivamente.

Los registros de corrientes de *gating* (I_g) fueron evocados por pulsos rectangulares de voltaje de 1 ms para alcanzar el estado estacionario de las I_g , con variaciones de voltaje de 10 mV, el potencial de holding y el voltaje final fueron escogidos dependiendo de las características de cada mutante: El potencial de holding fue de -90 mV excepto para D186N, R207Q y R210Q, para los cuales el potencial de holding fue de -120 mV, 90 mV y 0 mV respectivamente; el voltaje final fue de 350 mV excepto para D153N (400mV), R167Q (400 mV), D186N (300 mV), R207Q (-350 mV), R210Q (-400 mV) y R213Q (400 mV).

Los registros de corrientes de protones (I_H) en la mutante R210H fueron evocados por pulsos de 3 ms con pasos de voltaje de -10 mV, el potencial de holding fue de 0 mV y el voltaje final fue de -400 mV. Tanto el comando de voltaje como la salida de corriente se filtraron a 20 kHz con el filtro pasa bajo Bessel de 8 polos. Las señales de corriente se muestrearon con un convertidor análogo-digital (A/D) de 16 bits, utilizando una frecuencia de muestreo de 250 kHz. La adquisición de datos se realizó mediante el software Clampex 10 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA). Para obtener el movimiento de carga neto, en todos los casos se sustrajo el componente lineal proveniente de la corriente capacitiva, utilizando el método de $P/8$. (Armstrong & Bezanilla, 1974).

7.3.6 Análisis de datos.

Todos los análisis de datos se realizaron con Clampfit 10.7 (Molecular Devices), Matlab (MathWorks) y OriginPro 8.6 (OriginLab). Para cada experimento de *gating* los primeros 100 μ s de las I_g fueron ajustados a una función exponencial simple y el área bajo la curva fue integrada hasta el infinito para obtener la carga desplazada entre los estados cerrados $Q_{c,i}(V)$, como se ha reportado previamente (Carrasquel-Ursulaez et al., 2014; Contreras et al., 2012; Lorenzo-Ceballos et al., 2019). Los datos $Q_{c,i}(V)$ para cada experimento i fueron ajustados usando una función de Boltzmann,

$$Q_{c,i}(V) = \frac{Q_{c,i,max}}{1 + e^{\left(\frac{-z_{Q,i}F(V-V_{o,i})}{RT}\right)}} \quad (Ec. 3)$$

Donde $Q_{c,i,max}$ es la carga máxima, $z_{Q,i}$ es la dependencia de potencial de la activación del VSD, $V_{0,i}$ es el voltaje de activación media, T es la temperatura absoluta (294 K), F es la constante de Faraday, y R es la constante universal de los gases. Los mejores valores para $Q_{c,i,max}$, $V_{0,i}$, y $z_{Q,i}$ fueron determinados usando la función de Matlab *Isqnonlin*. El voltaje de activación media promedio ($\langle V_0 \rangle$) y la dependencia de voltaje promedio ($\langle z_Q \rangle$) fueron reportados como promedio + S.E.M. de n experimentos. Cada curva $Q_{c,i}(V)$ individual fue normalizada dividiendo por su valor específico de $Q_{c,i,max}$ y luego alineadas desplazándolas a lo largo del eje del voltaje por $(\langle V_0 \rangle - V_{0,i})$. Un desplazamiento adicional de las curvas $Q_{c,i}(V)$ se llevo a cabo aproximando cada valor de voltaje a su décimo más cercano. Este procedimiento permite generar una curva promedio con un valor de dependencia de voltaje representativo para los n experimentos (Horrigan & Aldrich, 2002). Finalmente, los valores a cada voltaje fueron promediados y reportados como promedio + S.E.M. Esta nueva relación promedio $Q_c(V)$ fue ajustada con una función de Boltzmann,

$$Q_c(V) = \frac{1}{1+e^{\left(\frac{-z_Q F(V-V_0)}{RT}\right)}} \quad (Ec. 4)$$

Para el caso de las corrientes iónicas y de protones, los datos de $I_{tail,i}(V)$ instantanea para cada experimento i fueron ajustados usando una función de Boltzmann,

$$I_{tail,i}(V) = \frac{I_{tail,i,max}}{1+e^{\left(\frac{-z_\delta F(V-V_{h,i})}{RT}\right)}} \quad (Ec. 5)$$

Donde $I_{tail,i,max}$ es la corriente de cola maxima, z_δ es la dependencia de voltaje de la activacion del canal, V_h es el voltaje de activacion media, T , F y R están definidas anteriormente. Los mejores valores para $I_{tail,i,max}$, z_δ y V_h fueron determinados utilizando la función de Matlab *Isqnonlin*. . El voltaje de activación media promedio ($\langle V_h \rangle$) y la dependencia de voltaje promedio ($\langle z_\delta \rangle$) fueron reportados como promedio + S.E.M. de n experimentos. Las curvas $G_i(V)$ fueron obtenidas

dividiendo las curvas $I_{tail,i}(V)$ por su específico valor de $I_{tail,i,max}$. Las curvas $I_{tail,i}(V)$ se alinearon desplazandolas a lo largo del eje del voltaje según $(\langle V_h \rangle - V_{h,i})$.

7.3.7 Ajuste al modelo cinético.

Se ajustaron los datos experimentales de $Q_C(V)$ que denotan mecanismos de movimiento de cargas del sensor de voltaje en el marco del modelo alostérico general de Horrigan-Aldrich (HA) (Horrigan & Aldrich, 2002). En términos de los mecanismos alostéricos de HA, la constante de equilibrio dependiente de voltaje $J(V)$ que define el equilibrio R-A es

$$J = \frac{A}{R} = e^{\frac{z_J F(V-V_0)}{RT}} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde z_J (equivalente a z_Q) es la carga asociada con la activación del sensor de voltaje. De esta manera, la fracción de carga total desplazada esencialmente entre estados cerrados como se denota en la ecuación 4 $(Q_C(V)/Q_{C,MAX})$, en ausencia de calcio se puede escribir como: $Q_C(V)/Q_{C,MAX} (Ca^{2+} \ll K_D) = \frac{1}{1+J^{-1}}$ donde K_D es la constante de disociación de sitios de unión a Ca^{2+} todos los sensores de voltaje en reposo y el canal cerrado.

RESULTADOS

8.1 Caracterización de las *gating* currents en mutaciones puntuales sobre el VSD del BK.

Separadamente, 10 residuos cargados entre los segmentos TM S1-S4 del canal BK humano fueron mutados por aminoácidos neutros de similar tamaño como se describe en la sección metodológica y también se visualiza en la **Figura 9a**. Las primeras mediciones realizadas fueron las corrientes macroscópicas de K^+ o I_K en la configuración “*inside-out*” para confirmar que los canales BK expresados, wt y mutantes, forman canales funcionales y corresponden al fenotipo electrofisiológico de la subunidad α .

Las I_K fueron evocadas por pulsos de voltaje de 10 ms de duración como se describió en la sección metodológica, con un potencial de mantención o “*holding*” de -100 mV con excepción de la mutante R207Q cuyo potencial de holding fue de -200 mV (**Figura 8**), esto debido a que esta mutación provoca que aumente la probabilidad de apertura del canal BK a voltaje cero e incluso a voltajes más negativos, como se puede visualizar en la curva $G(V)$ de color calipso (**Figura 8c**). Para obtener las relaciones de apertura del canal versus voltaje se analizaron las “colas” de los registros, donde se vuelve a repolarizar al potencial de *holding* y se genera una corriente de entrada o de polaridad inversa, en este punto las corrientes saturan ya que la P_0 no aumenta, aunque se siga incrementando la fuerza impulsora. Esto se manifiesta en las curvas $G(V)$, tras el ajuste de datos a una Boltzmann de dos estados descrito en la ecuación 5, y otorgan los parámetros biofísicos correspondientes a la apertura del poro del canal. Se puede observar en cada registro que todas las mutaciones o canales presentan su respectivo código de colores en un pequeño círculo junto al nombre del canal (**Figura 8a**), este código de colores es fundamental para lograr observar las curvas $G(V)$ de cada mutante, las cuales además están separadas en dos grupos, las mutaciones de los segmentos TM S1-S2 (**Figura 8b**) y las mutaciones de los segmentos TM S3-S4 (**Figura 8c**).

Luego de caracterizar las corrientes macroscópicas de cada mutación, se registraron las corrientes de *gating*, que corresponde a un método de medición directa del movimiento de cargas del VSD en el canal BK.

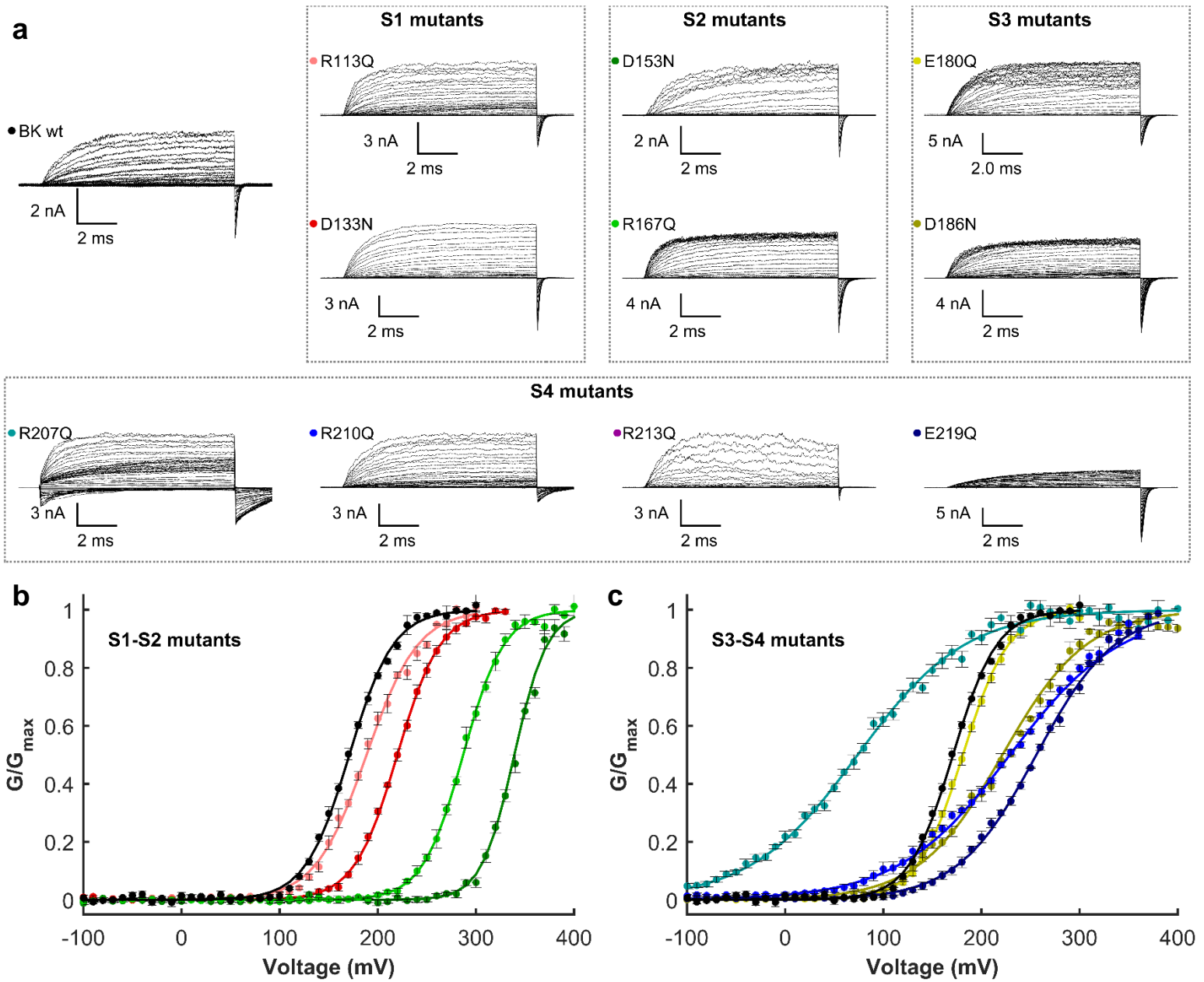


Figura 8. Familias de corrientes I_K representativas de canales BK expresados en *X. laevis* y sus respectivas relaciones de conductancia macroscópica-voltaje. (a) Las corrientes se registraron en configuración “inside-out” con el fin de asegurar que los canales BK con mutaciones eran semejantes al wt. Las I_K se registraron en 110 mM K^+ simétrico a “cero” Ca^{2+} . La duración de los pulsos se estableció de manera que las corrientes alcanzaran un estado estacionario. (b-c) Relaciones $G(V)$ de cada una de las mutaciones realizadas. Los colores de cada curva representan el color otorgado para cada mutante en los puntos coloreados en a.

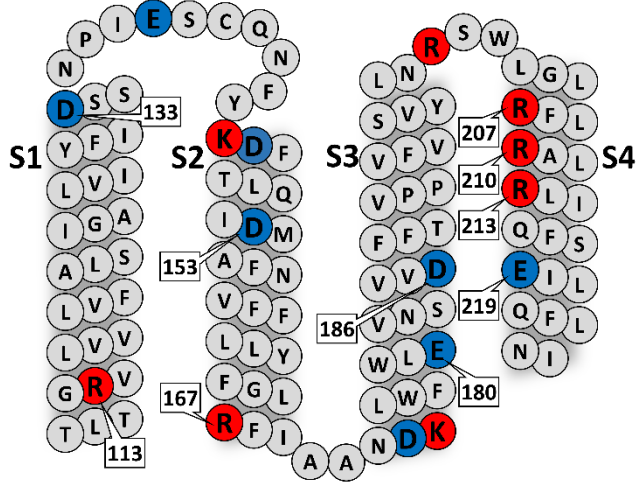
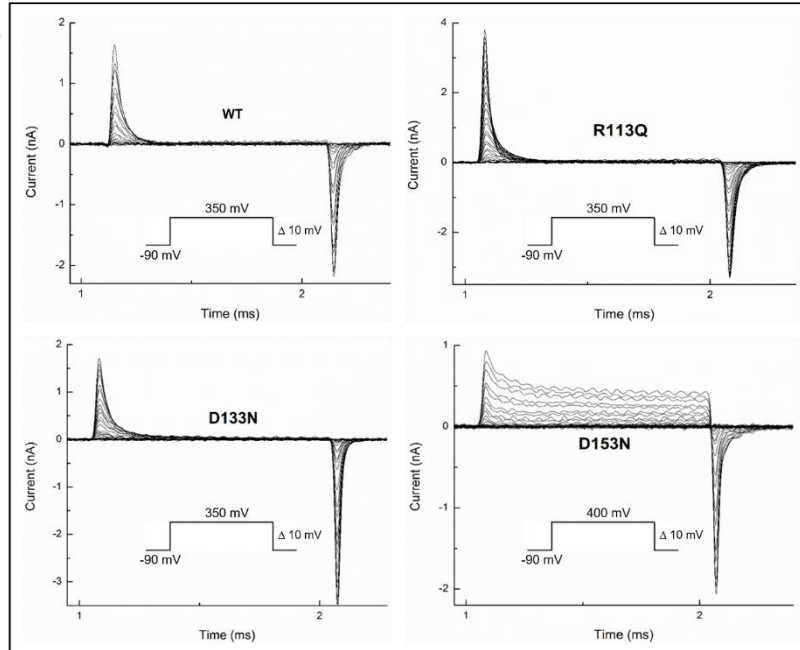
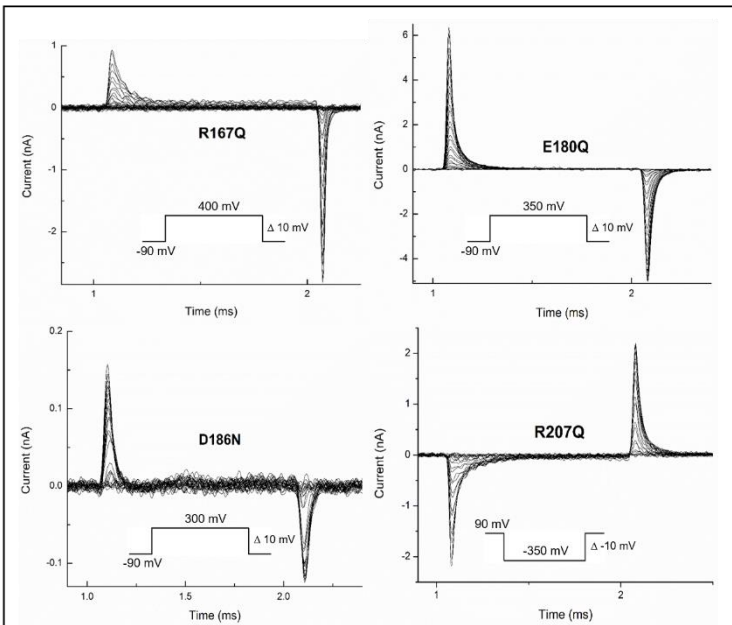
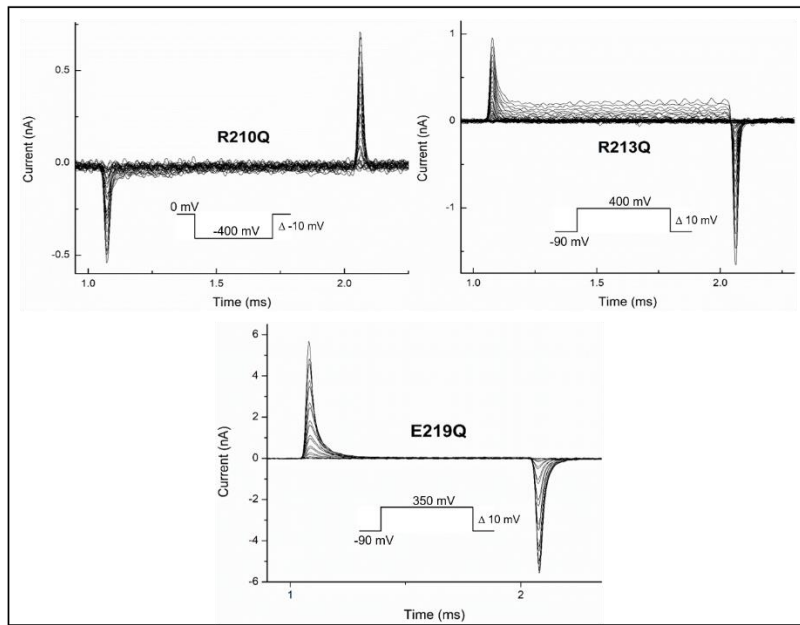
a**b****c****d**

Figura 9. Familia de corrientes I_g representativas de canales BK con mutaciones puntuales en el VSD. (a) Esquema de la estructura primaria del VSD para visualizar la posición de cada mutación cuyos fenotipos se ven representados por las corrientes de *gating*. (b) Set de registros representativos que incluyen al canal wt, y las mutantes R113Q, D133N y D153N con sus respectivos protocolos de pulsos de voltaje. (c) Set de registros representativos que incluyen a las mutantes R167Q, E180Q, D186N con protocolos de pulsos similares excepto para la mutante R207Q la cual se registra con un protocolo de pulsos invertido. (d) Set de registros que incluyen a las mutantes R210Q, R213Q y E219Q, se muestra además un protocolo de pulsos invertido para la mutante R210Q. Las mutantes correspondientes a las cargas de *gating* propuestas por el grupo de Ma et al., (2006) corresponden a D153N, R167Q, D186N y R213Q.

8.2 Solo dos argininas alteran la dependencia de voltaje de activación del VSD del canal BK.

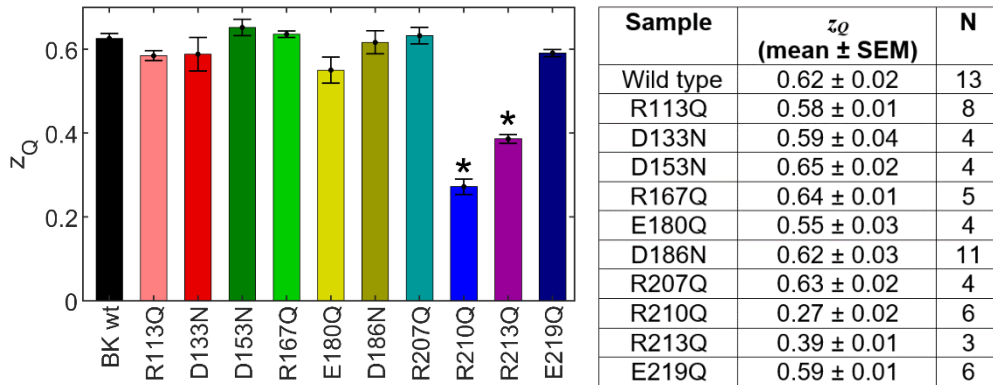


Figura 11. Parámetros biofísicos obtenidos para cada canal o mutante tras ajuste a una función de Boltzmann. Se graficaron los promedios y desviaciones estándar del parámetro z_Q que representa la dependencia de voltaje de la activación de los sensores de potencial. A la derecha se muestra una tabla resumen de los parámetros destacados para cada mutante y canal silvestre, obtenidos tras ajuste a la función de Boltzmann.

De las relaciones $Q_c(V)$ se puede apreciar que las pendientes de las curvas de tres mutantes que fueron propuestas por el grupo de Ma et al., (2006) como cargas de *gating*, D153N, R167Q y D186N no son diferentes a las del BK wt (**Figura 10b**), lo que se refleja en la dependencia de potencial (z_Q) que se mantiene similar, en comparación al canal silvestre (**Figura 11**). Mientras tanto, las pendientes de las curvas $Q(V)$ de las mutantes R210Q y R213Q son las únicas que cambian respecto al canal wt (**Figura 10b**), siendo significativamente distintas (**Figura 11**), sugiriendo fuertemente que tienen una contribución directa al movimiento de cargas de *gating*. Por otro lado, los corrimientos en el voltaje de activación media del VSD (V_0) con respecto al BK wt, se relaciona con los cambios en la constante de equilibrio J que provoca cada mutante, específicamente en la energía libre necesaria para producir la activación de los sensores. Así mismo, las mutantes R210Q y R213Q son las que producen los mayores corrimientos en V_0 en relación al wt (**Figura 10b; Figura 11 derecha**), con valores de V_0 de -342 ± 11 mV (R210Q) y 394 ± 1 mV (R213Q). Estos resultados, en su conjunto, sugieren que estos dos residuos cargados son de gran relevancia en la sensibilidad a voltaje y también en la energía libre necesaria para abrir el canal. Por tanto, proponemos que R210 y R213 son los únicos residuos sensores de voltaje en el VSD del canal BK.

De la ecuación 6 presentada en la metodología, se puede obtener que la diferencia en la energía libre (ΔG^0), a 0 mV, entre los estados R-A es

$$\Delta G^0 = z_J F V_0 \quad (\text{Ec. 7})$$

La diferencia en el ΔG^0 de un mutante particular (ΔG_{mut}^0) comparada con el wt (ΔG_{WT}^0) se define como

$$\Delta(\Delta G^0) = \Delta G_{mut}^0 - \Delta G_{WT}^0 \quad (\text{Ec. 8})$$

Excepto por R210 y R213, las mutantes de neutralización se puede clasificar en dos grupos: las que desplazan la curva $Q_c(V)$ hacia potenciales más depolarizantes a lo largo del eje del voltaje (D133, R167 y D153), sesgando la reacción R-A hacia el estado reposo ($\Delta(\Delta G^0) > 0$) (**Tabla N°1**); y aquellas

Tabla 1 Parámetros usados para ajustar los datos $Q(V)$ del canal wt y mutantes.

<i>Channel</i>	V_0 (mV) (Mean \pm SEM)	z_Q (Mean \pm SEM)	N	$\Delta\Delta G^0$ (kJ)
Wild Type	172 \pm 3	0.62 \pm 0.02	13	0.0
R113Q	170 \pm 5	0.58 \pm 0.01	8	-0.8
D133N	212 \pm 3	0.59 \pm 0.04	4	1.8
D153N	340 \pm 7	0.65 \pm 0.02	4	11.0
R167Q	289 \pm 5	0.64 \pm 0.01	5	7.6
E180Q	121 \pm 8	0.55 \pm 0.03	4	-3.9
D186N	72 \pm 5	0.62 \pm 0.03	11	-6.0
R207Q	-147 \pm 3	0.63 \pm 0.02	4	-19.2
R210Q	-342 \pm 11	0.27 \pm 0.02	6	-19.2
R210C	-370 \pm 6	0.30 \pm 0.01	3	-21.0
R210H	-366 \pm 5	0.28 \pm 0.02	5	-20.2
R210I	-350, -354	0.29, 0.30	2	-20.5
R210N	-361, -364	0.27, 0.28	2	-20.0
R213Q	394 \pm 1	0.39 \pm 0.01	3	4.5
R213H	402 \pm 4	0.31 \pm 0.01	22	1.7
R213C	398 \pm 2	0.34 \pm 0.02	13	2.8
E219Q	121 \pm 6	0.59 \pm 0.01	6	-3.4

que desplazan la curva $Q_c(V)$ hacia potenciales más hiperpolarizantes (E180, D185, R207 y E219),

estabilizando el estado activo del sensor ($\Delta(\Delta G^0) < 0$) (**Tabla N°1**). Ninguna de estas mutantes produjo cambios en z_Q (**Figura 11**), por lo que no son determinantes de la sensibilidad a voltaje del VSD del canal BK. Pese a que poseen un rol crucial en la posición del V_0 , los residuos D153, R167 y D186 no deben ser considerados como potenciales residuos sensores de voltaje, como se había propuesto previamente (Ma et al., 2006).

Para explorar la dinámica del VSD a nivel molecular, en colaboración con el grupo del Dr. Fernando González-Nilo (UNAB) se realizaron simulaciones de dinámica molecular, usando la estructura del canal BK humano en estado cerrado. El modelamiento molecular del VSD (**Figura 12**) basado en la estructura del hSlo (Tao & Mackinnon, 2019) reveló la existencia de dos vestíbulos acuosos separados por un “septum” que contiene los residuos R210 y R213. Se puede observar que R210 se encuentra esencialmente en una zona desprovista de agua, y que R213 reside en una interfaz entre el vestíbulo acuoso interno y una zona en donde la densidad de agua parece disminuir abruptamente. Así, la zona seca del VSD define la región del canal que probablemente abarcará la mayor parte de la caída en el campo eléctrico a través de la membrana.

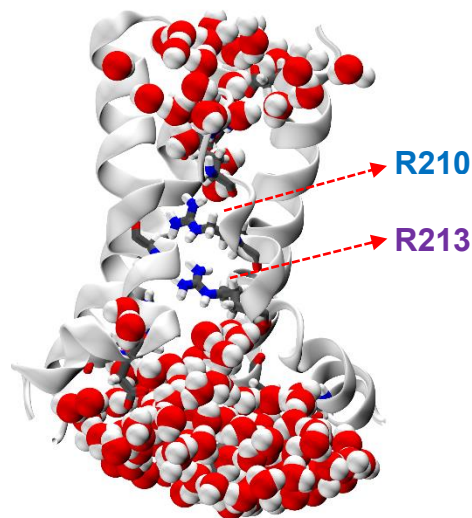


Figura 12. Dos residuos básicos en el segmento transmembrana S4 constituyen el sensor de voltaje del canal BK. Modelo *in silico* del canal BK humano obtenido por homología con el acSlo1 y sometido a dinámica molecular, utilizando como modelo 3-D la secuencia (UniProt ID: Q12791) almacenada en GenPept, y la estructura cryo-EM del canal *A. californica* como templado (Tao et al., 2017). Se escogió la estructura de menor energía para construir el modelo tetramérico del VSD evaluado previamente con software ANOLEA. Se observa que el par de residuos sensores de voltaje residen en una barrera muy estrecha entre las caras intracelular y extracelular de la membrana.

8.3 Una histidina en la posición 210 promueve el transporte de protones voltaje dependiente.

El grupo del Dr. Francisco Bezanilla (U. Chicago) ha demostrado que reemplazando las argininas sensibles a voltaje en el segmento TM S4 del canal de K⁺ *Shaker* con histidinas (pKa = 6.2 para su cadena lateral), transforman su VSD en un canal de protones o un transportador de protones (Starace & Bezanilla, 2001, 2004). Estos resultados son una clara demostración de que estos residuos se deben estar desplazando en el campo eléctrico en una región estrecha, denominada el centro de transferencia de carga (Tao et al., 2010). Convincentemente, un comportamiento tipo transportador predice que bajo un gradiente de pH la corriente de protones mediada por histidinas debe alcanzar un máximo justo en el voltaje de activación media (Starace & Bezanilla, 2001). Por otro lado, la formación de un poro de protones mediado por sustituciones de histidina predice la existencia de una barrera muy estrecha que concentra el campo eléctrico y permite separar el agua y los protones (Starace & Bezanilla, 2004). Los datos mostrados en la **Figura 10b** y **Figura 11** sugieren de manera contundente que R210 y R213 no se mueven a través de todo el campo eléctrico, lo cual es también consistente con la existencia de un *septum* que define la región en donde el campo eléctrico transmembrana se concentra. Se ha razonado entonces que una histidina situada, por ejemplo, en la posición 210 debería reducir la z_Q a pH neutro o básico, y que se debería recuperar la z_Q total cuando la $Q(V)$ se determina desde las corrientes OFF-gating a pH en el cual la histidina se encuentre protonada (**Figura 13a**). Como se ha esperado, el valor de z_Q (0.28 ± 0.02) de la mutante R210H en pH = 7.4 simétrico es casi idéntico al de la mutante R210Q (**Figura 13b; Tabla N°1**). Sin embargo, observamos que cuando el pH externo es reducido a 5.1, corrientes iónicas de entrada se han desarrollado a medida que el estado reposo del VSD se halló más poblado (-100 mV; **Figura 13c**). Estas corrientes de protones poseen todas las características que posee un canal rectificador de entrada (**Figura 13d**). Estos resultados sugieren que i) en el estado reposo del VSD la histidina 210 reside en la interfaz del *septum* y la cavidad interna del VSD y ii) que este *septum*, a pesar de presentar una baja densidad de agua (**Figura 12**), posee, en un gradiente de pH, los protones suficientes para generar una corriente de entrada asistida por las fluctuaciones térmicas que impulsan el movimiento de H₂O entre el *septum* y la solución intracelular (a pH neutro o básico).

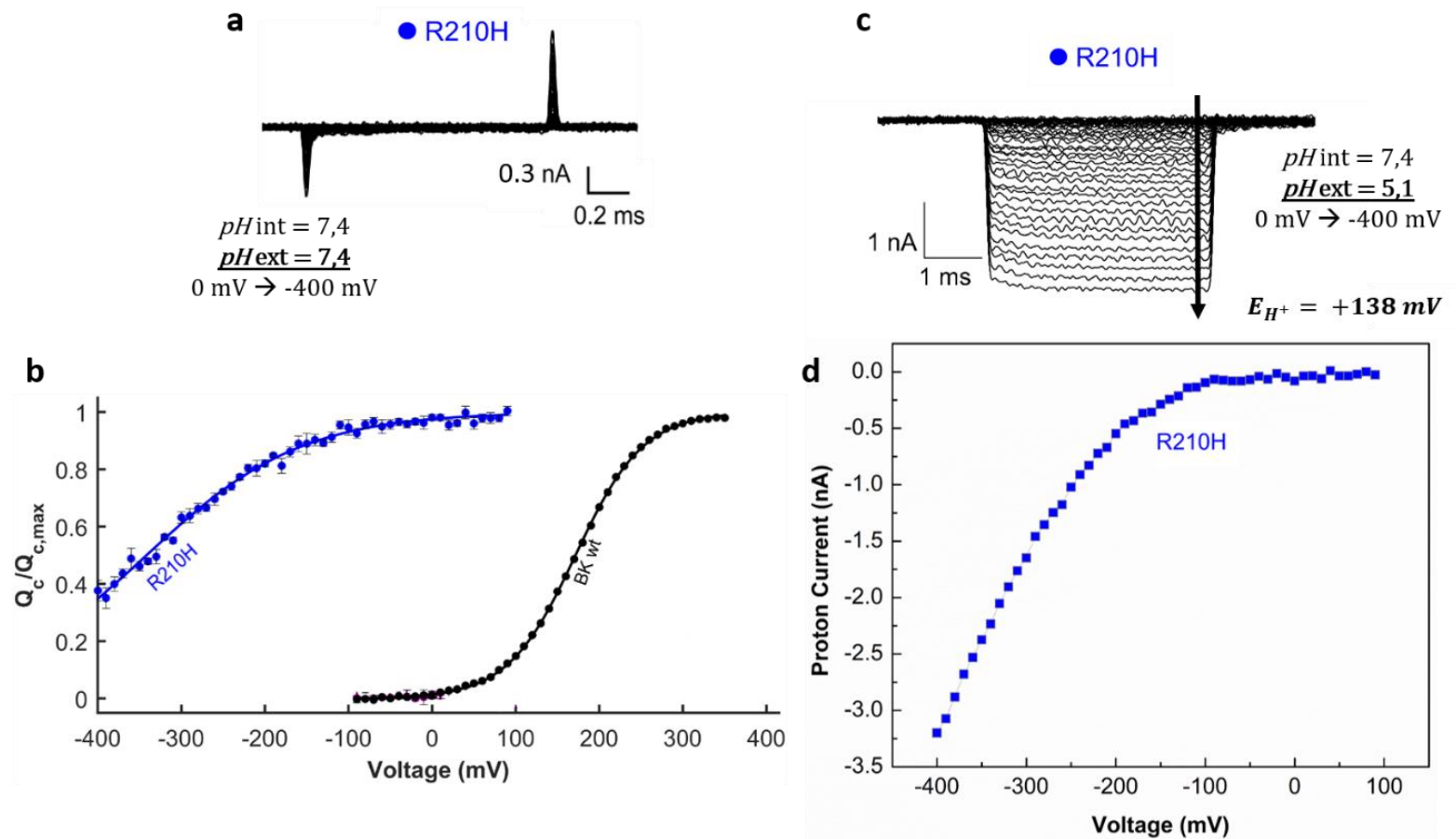


Figura 13. Un poro de protones activado por hiperpolarización revela un mecanismo distintivo de activación del VSD del canal BK. (a) Corriente de *gating* representativa para el canal R210H bajo condiciones de **pH** simétrico. **(b)** Relación $Q(V)$ para la mutante R210H obtenida a **pH** = 7.4 simétrico. **(c)** La acidificación externa protona la histidina en esta posición generando un canal de protones rectificador de entrada. **(d)** Curva de corriente en estado estacionario vs voltaje obtenida desde los registros de corriente mostrados en **c**.

8.4 El equilibrio reposo - activo está determinado por interacciones electrostáticas.

Como es para el caso de la mayoría de los sensores de voltaje, en las simulaciones otorgadas por el Dr. Fernando González-Nilo se muestra que los residuos cargados en el VSD forman una red posiblemente dinámica de puentes salinos (**Figura 14**). Consistentemente, esta red de puentes salinos se encarga de fijar el voltaje de activación media del VSD, como se detalló anteriormente. Por ello se destaca la importancia de las interacciones intramoleculares de tipo electrostáticas, que

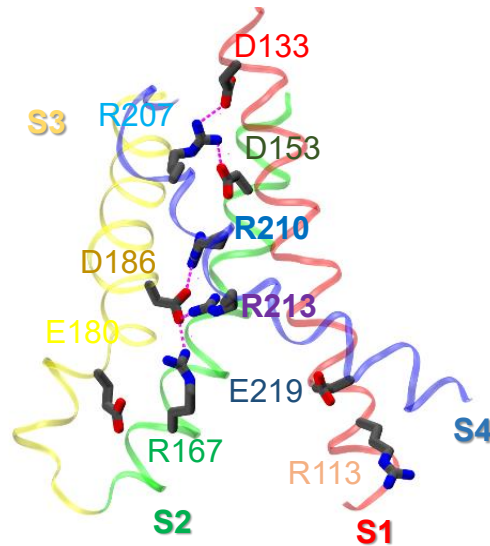


Figura 14. Modelo obtenido por dinámica molecular muestra la existencia de un “cluster” de residuos cargados en los segmentos TM S1-S4. Representación obtenida en VMD usando el mismo modelo descrito en la Figura 12, de los segmentos S1-S4 del VSD del canal BK, en colores se muestra cada TM del VSD con los respectivos residuos explorados en este estudio, que además conservan el código de colores establecido en la Figura 10. Se muestran los puentes salinos formados entre los residuos en líneas punteadas rojas.

en este caso suponemos que corresponden a interacciones electrostáticas de largo alcance y cumplen con estabilizar los estados discretos del VSD, ya que, al neutralizar las cargas involucradas en estas interacciones, se altera la energía libre necesaria para la activación del sensor (**Tabla N°1**). Dado a que se ha podido aislar el efecto de cada mutación de neutralización sobre el VSD, es importante resolver cuales son los determinantes moleculares involucrados en la interacción electrostática definida por el *cluster* de cargas presentes en los segmentos TM que componen el VSD. De aquí en adelante nos limitamos solo a realizar un análisis cualitativo de lo que ya fue descrito en la sección 8.2 utilizando la ecuación 8 y resumido en la Tabla 1. Como se describió anteriormente, se separaron las mutantes en grupos según el efecto que provocan sobre el equilibrio R-A del VSD. Los efectos producidos en las curvas $Q(V)$ debido a las mutaciones en los segmentos TM S1-S4, se explican en gran parte por la posición espacial y la naturaleza de la carga del aminoácido en concreto (**Figura 14**). Esto se manifiesta en la estabilización o desestabilización de los estados discretos por el cual transita el sensor de potencial (**Figura 15**). Consistentemente con lo evaluado en la sección

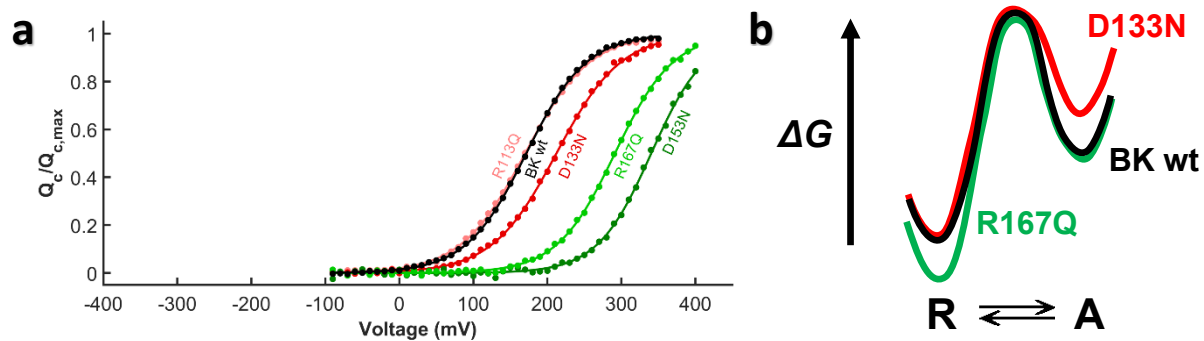


Figura 15. Estudios funcionales de mutaciones de neutralización en los segmentos TM S1-S2 del VSD del canal BK. (a) Curvas $Q(V)$ de las mutantes descritas que denotan el desplazamiento hacia la derecha a lo largo del eje del voltaje con respecto al canal wt. (b) Representación del perfil energético de la transición R-A para las mutaciones seleccionadas, que en este caso producen un sesgo del equilibrio hacia el estado reposo.

8.2, el grupo de mutantes que desplazan la curva $Q(V)$ hacia la derecha a lo largo del eje del voltaje (Figura 15a), estabilizan el equilibrio R-A hacia el estado reposo ya que: una carga negativa por encima del *cluster* de cargas (Figura 14) (D133N) desestabiliza el estado activo, mientras que una carga positiva por debajo del *cluster* (R167Q) estabiliza el estado reposo (Figura 15b).

Para el caso de mutaciones en el TM S3 y S4 (excepto R210 y R213), estas manifiestan un claro corrimiento a la izquierda en las $Q(V)$ (Figura 16a; Figura 17a), que como se describió anteriormente, estarían generando que se favorezca el equilibrio R-A hacia el estado activo ya que: una carga negativa por debajo del *cluster* (D186N) desestabiliza el estado reposo (Figura 16b), mientras que una carga positiva (R207Q) por encima del *cluster* estaría estabilizando fuertemente el estado activo del sensor de voltaje del canal BK (Figura 17b).

En conjunto, estos análisis permiten dar sustento al rol que posee cada residuo cargado en el VSD bajo la premisa de los sesgos electrostáticos que genera cada mutación y que es consistente con los datos obtenidos desde la ecuación 8, permitiendo explicar la importancia de los hallazgos en los resultados de dinámica molecular (Figura 14), y sustentando el hecho de que la naturaleza y posición de las cargas presentes en el *cluster* de puentes salinos exhiben un rol crucial en la activación del sensor de voltaje del canal BK.

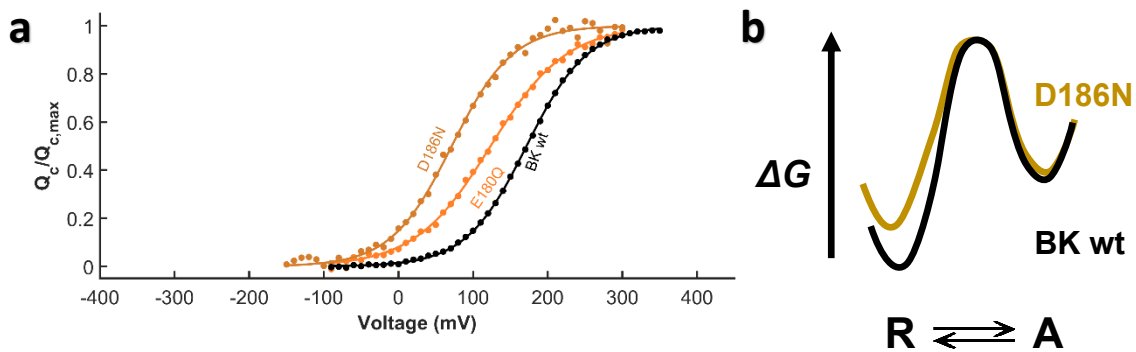


Figura 16. Estudios funcionales de mutaciones de neutralización en el segmento TM S3 del VSD del canal BK. (a) Curvas $Q(V)$ de las mutantes del VSD que desplazan hacia la izquierda a lo largo del eje del voltaje con respecto al canal wt. (b) Representación del perfil energético de la transición R-A para las mutaciones seleccionadas, que en este caso producen un sesgo del equilibrio hacia el estado activo.

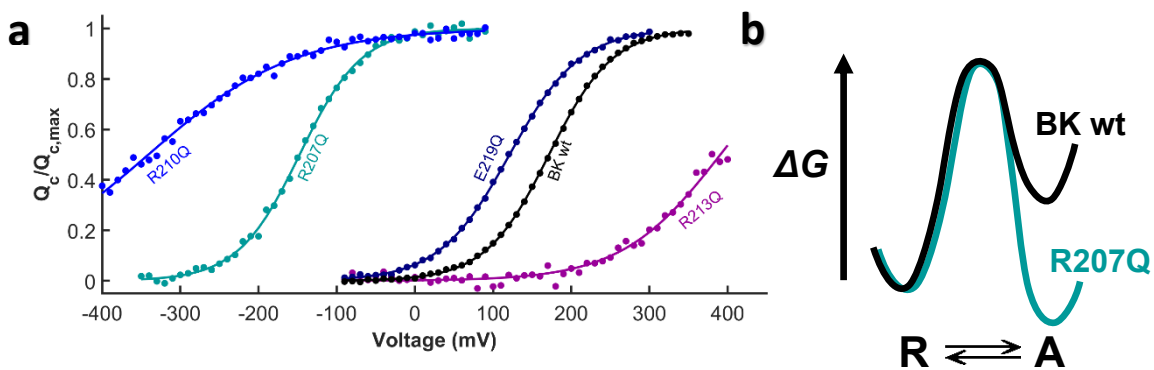


Figura 17. Estudios funcionales de mutaciones de neutralización en el segmento TM S4 del VSD del canal BK. (a) Curvas $Q(V)$ de las mutantes descritas que muestran el desplazamiento hacia la izquierda a lo largo del eje del voltaje con respecto al canal wt. (Sin considerar R120 y R213) (b) Representación del perfil energético de la transición R-A para las mutaciones seleccionadas, que en este caso producen un sesgo del equilibrio hacia el estado activo.

DISCUSIÓN

Los canales de iones voltaje-dependientes detectan variaciones en el potencial a través de la membrana y responden iniciando y propagando los potenciales de acción, y es por esto que presentan un rol clave en la señalización eléctrica de las células. Un cambio en el ΔV_m ejerce una fuerza neta sobre los residuos cargados (cargas de *gating*) de un canal de iones sensible a voltaje, promoviendo que estos residuos se reubiquen en una nueva posición de equilibrio. Este movimiento de cargas es responsable de la generación de corrientes de *gating*. A pesar de que por lo menos tres argininas canónicas del S4 de canales Kv se encuentran conservadas en los canales BK (R207, R210, R213 en el BK humano) (**Figura 4**), la dependencia de voltaje de la curva $Q(V)$ del canal BK es menor que la de canales Kv. De manera consistente, el número total de cargas de *gating* por canal ($4z_Q$) calculadas desde la pendiente de la curva $Q(V)$ del canal BK es de aproximadamente $2.4 e_0$ (Bao & Cox, 2005; Carrasquel-Ursulaez et al., 2014; Contreras et al., 2012; Horrigan & Aldrich, 1999, 2002; Lorenzo-Ceballos et al., 2019; Stefani et al., 1997), un valor notablemente menor comparado con las 12-13 e_0 reportadas para otros canales de K^+ dependientes de voltaje (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Seoh et al., 1996). Bajo esta premisa, es normal cuestionar la identidad de las cargas de *gating* del canal BK y el mecanismo por el cual estas son capaces de responder a los cambios en el potencial transmembrana, otorgando así la sensibilidad a voltaje.

Además de la dificultad técnica de detectar tal pequeña cantidad de cargas de *gating* moviéndose a través del campo eléctrico, la identificación de estas cargas en el canal BK se ha visto limitada debido a la falta de un acoplamiento estricto entre la activación del sensor de voltaje y la apertura de poro, que sí ocurre en canales Kv. Este hecho vuelve inaplicable algunas metodologías clásicas como es el método de la pendiente límite (Almers, 1978; Horrigan & Aldrich, 2002; Sigg & Bezanilla, 1997), ya que en los canales BK la pendiente límite refleja únicamente la dependencia de voltaje de la apertura del poro.

Por otra parte, tras analizar la dependencia de potencial de las curvas de conductancia vs. voltaje ($G(V)$) a diferentes concentraciones de Ca^{2+} , e interpretando aquellos resultados utilizando el modelo alostérico de Horrigan y Aldrich, Ma et al., (2006) llegaron a la conclusión de que los residuos

involucrados en la sensibilidad a voltaje del canal BK se encontraban distribuidos entre los segmentos TM S2 (D153 y R167), S3 (D186), y S4 (R213) (Ma et al., 2006). En esta tesis, evitamos las incertidumbres del ajuste al modelo alosterico evaluando los efectos de la neutralización individual de cada residuo cargado entre los segmentos TM S1-S4, mediante estimaciones directas del desplazamiento de cargas en el VSD durante la activación del canal BK, midiendo directamente las corrientes de *gating*. La reducción de z_0 luego de la neutralización de R210 y R213 (**Figura 11**), inequívocamente identifica a estos residuos como las cargas de *gating* del canal BK, permitiendo además descartar al resto de residuos entre los segmentos TM S1-S4 como transportadores de carga. De manera trascendental, la sustitución por histidina en el residuo R210, en presencia de un gradiente de pH genera un canal de protones rectificador de entrada (**Figura 13c, d**), sugiriendo que el movimiento de cargas de *gating* debe ocurrir dentro de un *septum* muy estrecho en lugar de moverse entre dos vestibulos hidratados mediante un centro de transferencia de cargas como se ha reportado para los canales Kv (Tao et al., 2010). Este mecanismo es totalmente consistente con las simulaciones por dinámica molecular (Tao et al., 2017) (**Figura 12**), que muestra dos vestibulos acuosos aparentemente separados por un *septum* que contiene precisamente a los residuos R210 y R213.

Los resultados mostrados en esta tesis presentan ciertas concordancias con estudios previos, en el trabajo de Ma et al., (2006) donde se estableció que el R213 era el principal residuo sensor de voltaje, y además que R207 no transportaba carga, siendo consistente con nuestros resultados (**Figura 11**). Así mismo, ya se había estudiado anteriormente el rol del residuo R210, sugiriendo que podría estar formando parte del sensor de voltaje (Díaz et al., 1998), siendo descartado posteriormente por el grupo de Ma et al., (2006), donde evaluaron cambios en el promedio de cargas desplazadas (q_a) y reportaron que R210 no formaba parte del sensor. Como ya se mencionó anteriormente, la medición directa de corrientes de *gating* (**Figura 9 y 10**) revela que efectivamente R210 sí corresponde a una carga de *gating* (**Figura 11**) entregando sustento a los datos anteriormente mencionados por Díaz et al., (1998).

Distintas mutaciones de neutralización de cargas individuales pueden tener efectos directos o indirectos en la carga de *gating*. El efecto directo consiste en remover una carga que contribuya a la

carga total de *gating* (z_T), mientras que efectos indirectos incluyen cambios desconocidos en la conformación o el movimiento del sensor de voltaje que alteran la fracción del campo eléctrico atravesado por residuos no mutados.

El sensor de voltaje puede ser perturbado en gran medida por mutaciones sin efectos indirectos en la carga de *gating* (ejemplo, D153N y R207Q) (**Figura 11**). Se ha intentado establecer efectos indirectos analizando parámetros de dependencia de voltaje de estas mutaciones, donde muestran aumentos en la z_T y z_I (Ma et al., 2006) con respecto al BK silvestre, y que los autores contrastan con una situación similar que se ha reportado además para el canal *Shaker* (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Seoh et al., 1996). Pese a esto, los parámetros biofísicos propuestos para el VSD del canal BK han sido totalmente sobreestimados, llevando a los autores a concluir que el residuo R210 no formaba parte del sensor de voltaje del canal, trabajo en donde además no pudieron registrar corrientes de *gating* para esta mutación (Ma et al., 2006). Es por esto que los residuos que no están implicados en la dependencia de potencial deben ser identificados correctamente a menos que dichos residuos si tengan efectos directos e indirectos sobre la z_T . Es por esto que es importante que todos los residuos cargados entre los segmentos TM S1-S4 fueran estudiados y destacamos el hallazgo de que la gran mayoría efectivamente no están implicados en el movimiento de cargas de *gating*.

Nuestra conclusión de que los residuos R210 y R213 corresponden a las cargas de *gating* en el TM S4 es consistente con lo que se ha descrito anteriormente mediante experimentos de accesibilidad del grupo de Hu et al., (2003), mostrando que a -80 mV una cisteína en la posición 210 (mutante R210C) se ve expuesta a la solución externa, mientras que R213 puede ser únicamente modificada desde la parte interna de la membrana (Hu et al., 2003). En la Tabla 1 se muestra que a -80 mV el sensor de voltaje de la mutante R210C se encuentra en la configuración activa, indicando que una cisteína en la posición 210 podría estar expuesta a la solución externa a este voltaje.

Se estableció en el presente trabajo que los residuos que no son cargas de *gating* contribuyen a la estabilidad relativa de los estados activos y reposo del sensor de voltaje de BK, lo que sugiere la participación de estos residuos en interacciones electrostáticas estado-dependientes. Las estructuras de KvAP (Jiang et al., 2003) y Kv 1.2 (Long et al., 2005) y estudios anteriores en *Shaker*

(Papazian et al., 1995; Tiwari-Woodruff et al., 1997) indican que las interacciones por puentes salinos ocurren entre residuos con cargas opuestas en los dominios sensores de voltaje, pero generalmente se desconoce si tales interacciones dependen del estado de activación del sensor de voltaje. Una interacción estado-dependiente puede tener un impacto en la constante de equilibrio para la activación del sensor de voltaje (J_0) comparable a la energía de interacción por puentes salinos (Ma et al., 2006). Aparentemente la mayor parte de los residuos mutados cambian J_0 , reflejando la diferencia energética entre los estados activo y reposo cuando el $\Delta V_m = 0$ mV (dado $\Delta G_V = -kT \ln(J_0)$). En casi todos los casos los cambios en la energía libre ($\Delta \Delta G_V = -kT \ln(J_0^M / J_0^{WT})$) son cualitativamente distintos, como para establecer conclusiones consistentes respecto a la existencia de interacciones electrostáticas estado-dependientes (**Figura 15, 16 y 17**). Sumado a esto, los resultados de dinámica molecular determinados por el grupo del Dr. Fernando González-Nilo, entregan un modelo detallado donde se muestra la interacción entre los residuos del VSD, y sugiere que se dan principalmente mediante puentes salinos (**Figura 14**), complementando nuestros hallazgos experimentales.

Si bien la relación $Q(V)$ para el BK wt ha sido reproducida por distintos grupos, gran mayoría de nuestros resultados con las mutantes de neutralización en el VSD se apartan de algunos de los parámetros reportados por Ma et al. (2006) utilizando el modelo H-A. Por ejemplo, se llegó a estimar que z_j disminuye a prácticamente la mitad luego de la neutralización de D186 (Ma et al., 2006), mientras que en el presente trabajo determinamos que no hay cambios en la z_j para D186N, aun que su V_0 se encuentre desplazado hacia la izquierda por aproximadamente 100 mV (**Figura 10 y 16; Tabla N°1**). La neutralización de D153 disminuye la electronegatividad a lo largo de la cara extracelular del VSD, cambiando el paisaje electrostático en el campo eléctrico detectado por R210 y R213, lo que contribuye a estabilizar la conformación de reposo del sensor de voltaje ($\Delta V_0 = 168$ mV). Esto es consistente con la observación de que los residuos cargados negativamente en la cara extracelular del VSD estarían involucrados en la inhibición del canal BK inducida por pH ácido (Zhou et al., 2018). Los residuos D133 y D153 aparentemente estarían generando puentes salinos con R207 (**Figura 14**). Sin embargo, mientras que el residuo D133 queda expuesto a la solución externa, D153 está completamente embebido en el VSD. Esto indica que la carga D133 puede ser apantallada

electrostaticamente por el medio externo, mientras que D153, con una longitud de Debye mas extensa, probablemente ejerce un efecto mas fuerte en el equilibrio R-A del VSD. Como se menciona brevemente en un párrafo anterior, para el caso de la mutante R207Q, nuestras estimaciones de z_j y J_0 se encuentran en total acuerdo con los valores publicados (Ma et al., 2006), aunque ellos a diferencia de nosotros no realizaron mediciones directas de las cargas de *gating*.

El grupo de Zhang et al., (2014) reportó que la mutación E219R desplaza la curva $Q(V)$ hacia la izquierda en el eje del voltaje por -126 mV, aumentando el número de carga aparente de *gating* por sensor de voltaje de 0.5 en el wt a 0.66 en la mutante E219R. Nuestros datos muestran que la mutante E219Q desplaza la curva $Q(V)$ a la izquierda por -51 mV, esencialmente sin ningún cambio en z_Q (**Tabla N°1**). Estos resultados son consistentes con la hipótesis electrostática donde el mutante de neutralización E219Q o el mutante de carga inversa E219R introducen sesgos electrostáticos que desestabilizan la conformación en reposo del sensor de voltaje. Como se esperaba, el cambio inducido por E219R es mayor que el cambio inducido por E219Q, que progresa de acuerdo con su potencial electrostatico en la vecindad del R213. Además, aquellas mutaciones que promueven cambios en el V_0 de las curvas $Q(V)$, muestran los mismos cambios correspondientes en la eficiencia de FRET vs. voltaje (Miranda et al., 2018), lo que es consistente con nuestros hallazgos.

Aquí, se propone un mecanismo distintivo de sensibilidad a voltaje para los canales BK, que difiere de los encontrados en canales Kv, donde las cargas se mueven entre dos vesitublos acuosos separados por un *plug* hidrofobo con un movimiento significativo del segmento TM S4 (Islas & Sigworth, 2001; Lacroix et al., 2014). Esencialmente, en canales BK, los residuos R210 y R213 experimentan pequeños desplazamientos a traves de una zona seca en la cual se concentra el campo electrico transmembrana. En esta propuesta, las cargas de *gating* del canal BK son equivalentes a los residuos R365 y R368 de canales *Shaker*. Sin embargo, a diferencia de los canales Kv, ninguno de estos residuos ve ambos vestíbulos acuosos durante la activación del VSD. Estas observaciones pueden explicar el hecho de que mientras R365 y R368 contribuyen con 1 e_0 a la valencia efectiva, el desplazamiento de R210 y R213 es solo equivalente a aproximadamente una mitad de e_0 .

REFERENCIAS

- Adelman, J. P., Shen, K. Z., Kavanaugh, M. P., Warren, R. A., Wu, Y. N., Lagrutta, A., ... Alan North, R. (1992). Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*, *9*(2), 209–216. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90160-F](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90160-F)
- Aggarwal, S. K., & MacKinnon, R. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, *16*(6), 1169–1177. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80143-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80143-9)
- Almers, W. (1978). Gating currents and charge movements in excitable membranes. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *82*, 96–190. <https://doi.org/10.1007/bfb0030498>
- Armstrong, C. M., & Bezanilla, F. (1974). Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the na channels. *Journal of General Physiology*, *63*(5), 533–552. <https://doi.org/10.1085/jgp.63.5.533>
- Atkinson, N. S., Robertson, G. A., & Ganetzky, B. (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science*, *253*(5019), 551–555. <https://doi.org/10.1126/science.1857984>
- Bao, L., & Cox, D. H. (2005). Gating and ionic currents reveal how the BKCa channel's Ca²⁺ sensitivity is enhanced by its β 1 subunit. *Journal of General Physiology*, *126*(4), 393–412. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509346>
- Bao, L., Rapin, A. M., Holmstrand, E. C., & Cox, D. H. (2002). Elimination of the BKCa channel's high-affinity CA²⁺ sensitivity. *Journal of General Physiology*, *120*(2), 173–189. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028627>
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Blatz, A. L., & Magleby, K. L. (1984). Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *Journal of General Physiology*, *84*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1085/jgp.84.1.1>
- Brelidze, T. I., & Magleby, K. L. (2005). Probing the geometry of the inner vestibule of BK channels with sugars. *Journal of General Physiology*, *126*(2), 105–121. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509286>
- Brelidze, T. I., Niu, X., & Magleby, K. L. (2003). A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(15), 9017–9022. <https://doi.org/10.1073/pnas.1532257100>
- Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D. P., Wei, A., & Salkoff, L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding “maxi” calcium-activated potassium channels. *Science*, *261*(5118), 221–224. <https://doi.org/10.1126/science.7687074>
- Cannon, B. (1929). Reviews 1929. *Physiological Reviews*, *IX*(3), 399–431. Retrieved from <https://doi.org/10.1152/physrev.1929.9.3.399>
- Carrasquel-Ursulaez, W., Contreras, G. F., Sepúlveda, R. V., Aguayo, D., González-Nilo, F., González, C., & Latorre, R. (2014). Hydrophobic interaction between contiguous residues in

- the S6 transmembrane segment acts as a stimuli integration node in the BK channel. *Journal of General Physiology*, 145(1), 61–74. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411194>
- Carrasquel-Ursulaez, W., Lorenzo, Y., Echeverria, F., Latorre, R., Carrasquel-Ursulaez, W., Lorenzo, Y., ... Latorre, R. (2018). Large Conductance Potassium Channels in the Nervous System. In *The Oxford Handbook of Neuronal Ion Channels*. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780190669164.013.11>
- Carvacho, I., Gonzalez, W., Torres, Y. P., Brauchi, S., Alvarez, O., Gonzalez-Nilo, F. D., & Latorre, R. (2008). Intrinsic electrostatic potential in the BK channel pore: Role in determining single channel conductance and block. *Journal of General Physiology*, 131(2), 147–161. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709862>
- Choi, K. L., Mossman, C., Aubé, J., & Yellen, G. (1993). The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron*, 10(3), 533–541. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90340-W](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90340-W)
- Clapham, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Contet, C., Goulding, S. P., Kuljis, D. A., & Barth, A. L. (2016). BK Channels in the Central Nervous System. In *International Review of Neurobiology* (1st ed., Vol. 128). <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.04.001>
- Contreras, G. F., Neely, A., Alvarez, O., Gonzalez, C., & Latorre, R. (2012). Modulation of BK channel voltage gating by different auxiliary subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), 18991–18996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216953109>
- Cui, J., & Aldrich, R. W. (2000). Allosteric linkage between voltage and Ca²⁺-dependent activation of BK-type mslo K⁺ channels. *Biochemistry*, 39(50), 15612–15619. <https://doi.org/10.1021/bi001509+>
- Cui, J., Cox, D. H., & Aldrich, R. W. (1997). Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K⁺ channels. *Journal of General Physiology*, 109(5), 647–673. <https://doi.org/10.1085/jgp.109.5.647>
- Díaz-Franulic, I., Sepúlveda, R. V., Navarro-Quezada, N., González-Nilo, F., & Naranjo, D. (2015). Pore dimensions and the role of occupancy in unitary conductance of Shaker K channels. *Journal of General Physiology*, 146(2), 133–146. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411353>
- Díaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L., & Latorre, R. (1998). Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32430–32436. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32430>
- Dopico, A. M., Bukiya, A. N., & Jaggar, J. H. (2018). Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 470(9), 1271–1289. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2151-y>
- Dworetzky, S. I., Trojnecki, J. T., & Gribkoff, V. K. (1994). Cloning and expression of a human large-conductance calcium-activated potassium channel. *Molecular Brain Research*, 27(1), 189–193. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)90203-8](https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)90203-8)
- Eisenman, G., Latorre, R., & Miller, C. (1986). Multi-ion conduction and selectivity in the high-conductance Ca⁺⁺-activated K⁺ channel from skeletal muscle. *Biophysical Journal*, 50(6), 1025–1034. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83546-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83546-9)

- Elkins, T., Ganetzky, B., & Wu, C. F. (1986). A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(21), 8415–8419. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8415>
- Gandhi, C. S., & Isacoff, E. Y. (2002). Molecular models of voltage sensing. *Journal of General Physiology*, 120(4), 455–463. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028678>
- Gardos, G. (1959). The role of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Acta Physiologica Hungarica*, 15(2), 121–125.
- Geng, Y., Niu, X., & Magleby, K. L. (2011). Low resistance, large dimension entrance to the inner cavity of BK channels determined by changing side-chain volume. *Journal of General Physiology*, 137(6), 533–548. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110616>
- Ghosh A, Greenberg ME. 1995. Calcium Signaling in Neurons: Molecular Mechanisms and Cellular Consequences. *Science* (80-) 268:239–247. <https://doi.org/10.1126/science.7716515>
- Griguoli, M., Sgritta, M., & Cherubini, E. (2016). Presynaptic BK channels control transmitter release: physiological relevance and potential therapeutic implications. *Journal of Physiology*, 594(13), 3489–3500. <https://doi.org/10.1113/JP271841>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Haug, T., Olcese, R., Toro, L., & Stefani, E. (2004). Regulation of K⁺ flow by a ring of negative charges in the outer pore of BKCa channels. Part II: Neutralization of aspartate 292 reduces long channel openings and gating current slow component. *Journal of General Physiology*, 124(2), 185–197. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308950>
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophysical Journal*, 66(4), 1061–1067. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80887-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80887-2)
- Hilgemann, D. W. (1989). Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 415, 247–249. <https://doi.org/10.1007/bf00370601>
- Hille, B. (2001). *Ionic channels of excitable membranes*. Sunderland, Mass.: Sinaur Associates.
- Hite, R. K., Tao, X., & MacKinnon, R. (2017). Structural basis for gating the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Nature*, 541(7635), 52–57. <https://doi.org/10.1038/nature20775>
- Hodgkin, A., & Huxley, A. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conductance and excitation. *Journal of Physiology*, 117, 500–544.
- Horrigan, F. T., & Aldrich, R. W. (1999). Allosteric Voltage Gating of Potassium Channels II mSlo Channel Gating Charge Movement in the Absence of Ca²⁺. *Journal of General Physiology*, 114(2), 277–304. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.2.277>
- Horrigan, F. T., & Aldrich, R. W. (2002). Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *Journal of General Physiology*, 120(3), 267–305. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028605>

- Horrigan, F. T., Cui, J., & Aldrich, R. W. (1999). Allosteric voltage gating of potassium channels I: mSlo ionic currents in the absence of Ca²⁺. *Journal of General Physiology*, 114(2), 277–304. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.2.277>
- Hu, L., Shi, J., Ma, Z., Krishnamoorthy, G., Sieling, F., Zhang, G., ... Cui, J. (2003). Participation of the S4 voltage sensor in the Mg²⁺-dependent activation of large conductance (BK) K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10488–10493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834300100>
- Islas, L. D., & Sigworth, F. J. (1999). Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *Journal of General Physiology*, 114(5), 723–741. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.5.723>
- Islas, L. D., & Sigworth, F. J. (2001). Electrostatics and the gating pore of Shaker potassium channels. *Journal of General Physiology*, 117(1), 69–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.117.1.69>
- Jaffe, D. B., Wang, B., & Brenner, R. (2011). Shaping of action potentials by type I and type II large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Neuroscience*, 192, 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.028>
- Jensen, M., Jogini, V., Borhani, D. W., Leffler, A. E., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2012). Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science*, 336(6078), 229–233. <https://doi.org/10.1126/science.1216533>
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., & Mackinnon, R. (2003). *in a voltage-dependent K channel*. 423(May), 42–48.
- Kaczmarek, L. K., Aldrich, R. W., Chandy, K. G., Grissmer, S., Wei, A. D., & Wulff, H. (2017). International union of basic and clinical pharmacology. C. Nomenclature and properties of calcium-activated and sodium-activated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 69(1), 1–11. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012864>
- Kimm, T., Khaliq, Z. M., & Bean, B. P. (2015). Differential regulation of action potential shape and burst-frequency firing by BK and Kv2 channels in substantia nigra dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 35(50), 16404–16417. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5291-14.2015>
- Krnjević, B. Y. K., & Lisjewicz, A. (1972). *of Research*. 363–390.
- Lacroix, J. J., Clark Hyde, H., Campos, F. V., & Bezanilla, F. (2014). Moving gating charges through the gating pore in a Kv channel voltage sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1406161111>
- Latorre, R., Coronado, R., & Vergara, C. (1984). K⁺ channels gated by voltage and ions. *Annual Review of Physiology*, VOL. 46, 485–495. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.46.1.485>
- Latorre, R., Vergara, C., & Hidalgo, C. (1982). Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(3 1), 805–809. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.3.805>
- Latorre, Ramon, & Miller, C. (1983). Conduction and selectivity in potassium channels. *The Journal of Membrane Biology*, 71(1–2), 11–30. <https://doi.org/10.1007/BF01870671>
- Li, B., Jie, W., Huang, L., Wei, P., Li, S., Luo, Z., ... Gao, T. (2014). *Nuclear BK channels regulate*

gene expression via the control of nuclear calcium signaling. (June).
<https://doi.org/10.1038/nn.3744>

- Li, W., & Aldrich, R. W. (2004). Unique inner pore properties of BK channels revealed by quaternary ammonium block. *Journal of General Physiology*, *124*(1), 43–57.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200409067>
- Long, S. B., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2005). Voltage sensor of Kv1.2: Structural basis of electromechanical coupling. *Science*, *309*(5736), 903–908.
<https://doi.org/10.1126/science.1116270>
- Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, *450*(7168), 376–382.
<https://doi.org/10.1038/nature06265>
- Lorenzo-Ceballos, Y., Carrasquel-Ursulaez, W., Castillo, K., Alvarez, O., & Latorre, R. (2019). Calcium-driven regulation of voltagesensing domains in BK channels. *ELife*, *8*, 1–24.
<https://doi.org/10.7554/eLife.44934>
- Ma, Z., Lou, X. J., & Horrigan, F. T. (2006). Role of Charged Residues in the S1–S4 Voltage Sensor of BK Channels. *The Journal of General Physiology*, *127*(3), 309–328.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200509421>
- Marty A. (1981). Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*, *291*, 497–500. <https://doi.org/10.1038/291497a0>
- Marty, A. (1983). Ca²⁺-dependent K⁺ channels with large unitary conductance. *Trends in Neurosciences*, *6*(C), 262–265. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(83\)90115-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(83)90115-7)
- McCobb, D. P., Fowler, N. L., Featherstone, T., Lingle, C. J., Saito, M., Krause, J. E., & Salkoff, L. (1995). A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *269*(3 38-3).
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.3.h767>
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., & Toro, L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (SO-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(25), 14066–14071. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.14066>
- Meredith, A. L., Wiler, S. W., Miller, B. H., Takahashi, J. S., Fodor, A. A., Ruby, N. F., & Aldrich, R. W. (2006). BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nature Neuroscience*, *9*(8), 1041–1049.
<https://doi.org/10.1038/nn1740>
- Miller, C. (1982). Bis-quaternary ammonium blockers as structural probes of the sarcoplasmic reticulum K⁺ channel. *Journal of General Physiology*, *79*(5), 869–891.
<https://doi.org/10.1085/jgp.79.5.869>
- Miranda, P., Contreras, J. E., Plested, A. J. R., Sigworth, F. J., Holmgren, M., & Giraldez, T. (2013). State-dependent FRET reports calcium- and voltagedependent gating-ring motions in BK channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(13), 5217–5222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219611110>
- Miranda, P., Holmgren, M., & Giraldez, T. (2018). Voltage-dependent dynamics of the BK channel

cytosolic gating ring are coupled to the membrane-embedded voltage sensor. *ELife*, 7, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.40664>

- Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12(1), 88–118. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6)
- Naranjo, D., Moldenhauer, H., Pincuntureo, M., & Díaz-Franulic, I. (2016). Pore size matters for potassium channel conductance. *Journal of General Physiology*, 148(4), 1–15. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611625>
- Nimigean, C. M., Chappie, J. S., & Miller, C. (2003). Electrostatic tuning of ion conductance in potassium channels. *Biochemistry*, 42(31), 9263–9268. <https://doi.org/10.1021/bi0348720>
- Niu, X., Qian, X., & Magleby, K. L. (2004). Linker-gating ring complex as passive spring and Ca²⁺-dependent machine for a voltage- and Ca²⁺-activated potassium channel. *Neuron*, 42(5), 745–756. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.001>
- Noceti, F., Baldelli, P., Wei, X., Qin, N., Toro, L., Birnbaumer, L., & Stefani, E. (1996). Effective gating charges per channel in voltage-dependent K⁺ and Ca²⁺ channels. *Journal of General Physiology*, 108(3), 143–155. <https://doi.org/10.1085/jgp.108.3.143>
- Pallota, B. S., Magleby, K. L., & Barrett, J. N. (1981). Single channel recordings of Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat muscle cell culture. *Nature*, 293, 471–474. <https://doi.org/10.1038/293471a0>
- Pallotta, B. S. (1985). N-bromoacetamide removes a calcium-dependent component of channel opening from calcium-activated potassium channels in rat skeletal muscle. *Journal of General Physiology*, 86(5), 601–611. <https://doi.org/10.1085/jgp.86.5.601>
- Pantazis, A., Gudzenko, V., Savalli, N., Sigg, D., & Olcese, R. (2010). Operation of the voltage sensor of a human voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4459–4464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911959107>
- Pantazis, A., Kohanteb, A. P., & Olcese, R. (2010). Relative motion of transmembrane segments S0 and S4 during voltage sensor activation in the human BKCa channel. *Journal of General Physiology*, 136(6), 645–657. <https://doi.org/10.1085/jgp.201010503>
- Pantazis, A., & Olcese, R. (2012). Relative transmembrane segment rearrangements during BK channel activation resolved by structurally assigned fluorophore-quencher pairing. *Journal of General Physiology*, 140(2), 207–218. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210807>
- Papazian, D. M., Shao, X. M., Seoh, S. A., Mock, A. F., Huang, Y., & Wainstock, D. H. (1995). Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in shaker K⁺ channel. *Neuron*, 14(6), 1293–1301. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90276-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90276-7)
- Pyott, S. J., & Duncan, R. K. (2016). BK Channels in the Vertebrate Inner Ear. In *International Review of Neurobiology* (1st ed., Vol. 128). <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.03.016>
- Quirk, J. C., & Reinhart, P. H. (2001). Identification of a novel tetramerization domain in large conductance KCa channels. *Neuron*, 32(1), 13–23. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00444-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00444-5)
- Saito, M., & Wu, C. F. (1991). Expression of ion channels and mutational effects in giant *Drosophila* neurons differentiated from cell division-arrested embryonic neuroblasts. *Journal of*

Neuroscience, 11(7), 2135–2150. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-07-02135.1991>

- Schoppa, N. E., & Sigworth, F. J. (1998). Activation of Shaker potassium channels: III. An activation gating model for wild-type and V2 mutant channels. *Journal of General Physiology*, 111(2), 313–342. <https://doi.org/10.1085/jgp.111.2.313>
- Schreiber, M., & Salkoff, L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophysical Journal*, 73(3), 1355–1363. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78168-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78168-2)
- Schwarz, W., & Passow, H. (1983). Ca²⁺-activated K⁺ channels in erythrocytes and excitable cells. *Annual Review of Physiology*, 45(26), 359–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.45.030183.002043>
- Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M., & Bezanilla, F. (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, 16(6), 1159–1167. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80142-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80142-7)
- Shen, K., Lagrutta, A., Davies, N. W., Standen, N. B., Adelman, J. P., & North, R. A. (1994). Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 426, 440–445. <https://doi.org/10.1007/BF00388308>
- Shi, J., Krishnamoorthy, G., Yang, Y., Hu, L., Chaturvedi, N., Harilal, D., ... Cui, J. (2002). Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature*, 418(6900), 876–880. <https://doi.org/10.1038/nature00941>
- Sigg, D., & Bezanilla, F. (1997). Total Charge Movement per Channel. *Journal of General Physiology*, 109(1), 27–39. <https://doi.org/10.1085/jgp.109.1.27>
- Singh, S., & Wu, C. F. (1989). Complete separation of four potassium currents in drosophila. *Neuron*, 2(4), 1325–1329. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90070-6)
- Starace, D. M., & Bezanilla, F. (2001). Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the Shaker K⁺ channel. *Journal of General Physiology*, 117(5), 469–490. <https://doi.org/10.1085/jgp.117.5.469>
- Starace, D. M., & Bezanilla, F. (2004). A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, 427(6974), 548–553. <https://doi.org/10.1038/nature02270>
- Stefani, E., Ottolia, M., Noceti, F., Olcese, R., Wallner, M., Latorre, R., & Toro, L. (1997). Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺ channel (hsl_o). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5427–5431. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5427>
- Sweet, T. B., & Cox, D. H. (2008). Measurements of the BK Ca channel's high-affinity Ca²⁺ binding constants: Effects of membrane voltage. *Journal of General Physiology*, 132(5), 491–505. <https://doi.org/10.1085/jgp.200810094>
- Tang, Q. Y., Zeng, X. H., & Lingle, C. J. (2009). Closed-channel block of BK potassium channels by bbTBA requires partial activation. *Journal of General Physiology*, 134(5), 409–436. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910251>
- Tao, X., Hite, R. K., & MacKinnon, R. (2017). Cryo-EM structure of the open high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Nature*, 541(7635), 46–51. <https://doi.org/10.1038/nature20608>

- Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D. A., & MacKinnon, R. (2010). A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science*, *328*(5974), 67–73. <https://doi.org/10.1126/science.1185954>
- Tao, X., & Mackinnon, R. (2019). Molecular structures of the human slo1 k+ channel in complex with b4. *ELife*, *8*, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.51409>
- Tiwari-Woodruff, S. K., Schulteis, C. T., Mock, A. F., & Papazian, D. M. (1997). Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of Shaker K+ channel subunits. *Biophysical Journal*, *72*(4), 1489–1500. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78797-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78797-6)
- Vandael, D. H., Marcantoni, A., Mahapatra, S., Caro, A., Ruth, P., Zuccotti, A., ... Carbone, E. (2010). Cav1.3 and BK channels for timing and regulating cell firing. *Molecular Neurobiology*, *42*(3), 185–198. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8151-3>
- W, M. R. (1978). CALCIUM-DEPENDENT. *Annual Review of Biophysical Bioengineering*, *7*, 1–18.
- Wallner, M., Meera, P., & Toro, L. (1996). Determinant for β -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca^{2+} -sensitive K+ channels: An additional transmembrane region at the N terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(25), 14922–14927. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14922>
- Wilkens, C. M., & Aldrich, R. W. (2006). State-independent block of BK channels by an intracellular quaternary ammonium. *Journal of General Physiology*, *128*(3), 347–364. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609579>
- Wu, Ying, Xiong, Y., Wang, S., Yi, H., Li, H., Pan, N., ... Ding, J. (2009). Intersubunit coupling in the pore of BK channels. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(35), 23353–23363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.027789>
- Wu, Yunkun, Yang, Y., Ye, S., & Jiang, Y. (2010). Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca^{2+} -gated K+ channel. *Nature*, *466*(7304), 393–397. <https://doi.org/10.1038/nature09252>
- Xia, X. M., Zeng, X., & Lingle, C. J. (2002). Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, *418*(6900), 880–884. <https://doi.org/10.1038/nature00956>
- Yang, H., Hu, L., Shi, J., Delaloye, K., Horrigan, F. T., & Cui, J. (2007). Mg^{2+} mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(46), 18270–18275. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705873104>
- Yellen, G. (1984). Ionic permeation and blockade in Ca^{2+} -activated K+ channels of bovine chromaffin cells. *Journal of General Physiology*, *84*(2), 157–186. <https://doi.org/10.1085/jgp.84.2.157>
- Yuan, P., Leonetti, M. D., Pico, A. R., Hsiung, Y., & Mackinnon, R. (2010). Structure of the Human BK Channel Ca^{2+} Activation Apparatus. *Science*, *329*(July), 182–186.
- Yusifov, T., Javaherian, A. D., Pantazis, A., Gandhi, C. S., & Olcese, R. (2010). The RCK1 domain of the human BKCa channel transduces Ca^{2+} binding into structural rearrangements. *Journal of General Physiology*, *136*(2), 189–202. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910374>

- Yusifov, T., Savalli, N., Gandhi, C. S., Ottolia, M., & Olcese, R. (2008). The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(1), 376–381. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705261105>
- Zeng, X. H., Xia, X. M., & Lingle, C. J. (2005). Divalent cation sensitivity of BK channel activation supports the existence of three distinct binding sites. *Journal of General Physiology*, *125*(3), 273–286. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409239>
- Zhang, G., Liang, H., Yang, J., Shi, J., McFarland, K., Cui, J., ... Chen, Y. (2014). A charged residue in S4 regulates coupling among the activation gate, voltage, and Ca²⁺ sensors in BK channels. *Journal of Neuroscience*, *34*(37), 12280–12288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1174-14.2014>
- Zhou, Y., Xia, X. M., & Lingle, C. J. (2011). Cysteine scanning and modification reveal major differences between BK channels and Kv channels in the inner pore region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(29), 12161–12166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104150108>
- Zhou, Y., Xia, X. M., & Lingle, C. J. (2018). BK channel inhibition by strong extracellular acidification. *ELife*, *7*, 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.38060>
- Zhou, Y., Yang, H., Cui, J., & Lingle, C. J. (2017). Threading the biophysics of mammalian Slo1 channels onto structures of an invertebrate Slo1 channel. *Journal of General Physiology*, *149*(11), 985–1007. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711845>