

**MECANISMO MOLECULAR DE ACTIVACIÓN DEL CANAL DE POTASIO DE ALTA
CONDUCTANCIA ACTIVADO POR CALCIO Y VOLTAJE (BK) POR EL DERIVADO DE
BENZIMIDAZOL, NS1619**

Tesis entregada a

LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

en Cumplimiento Parcial de los requisitos para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencia

Facultad De Ciencias

Por

Nailleth Daniela González Sanabria

Abril, 2023

Dirigida por: Dr. Ramón Latorre

Co-Dirigida por: Dr. Eduardo Perozo

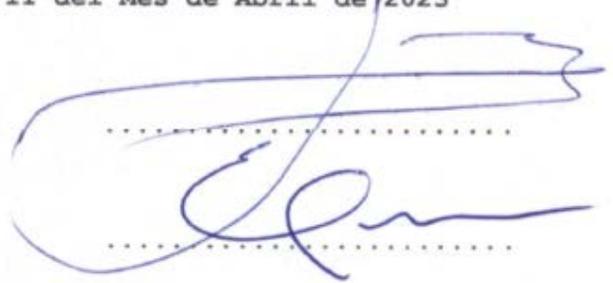
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por:

NAILETH DANIELA GONZALEZ SANABRIA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 11 del Mes de Abril de 2023

Director de Tesis:
Dr. Ramón Latorre



.....

Co-Director de Tesis:
Dr. Eduardo Perozo

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alan Neely



.....

Dra. Karen Castillo



.....

Dr. Danilo Gonzalez



.....

A la memoria de mi abuelo Francisco Sanabria,
cuya luz y amor continúan guiándome,
incluso después de su partida.

Este logro es en honor a ti y
al legado que dejaste en mi vida

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo amor y gratitud hacia mi familia, quienes han sido el pilar fundamental y la razón de ser en este arduo proceso. Este doctorado es un logro que les dedico, ya que sin su apoyo no hubiera sido posible alcanzarlo. A mi mamá, cuyo amor incondicional y constante aliento han sido el motor que me ha impulsado a seguir adelante; a mi papá, por estar siempre a mi lado, brindándome sabiduría y guía; a mi hermana, que representa mi mayor alegría, fuente de inspiración y fortaleza; y a mi abuela, cuyo amor y apoyo incesante han sido un faro en mi vida.

También quisiera agradecer a todos los seres maravillosos que se han cruzado en este camino y han dejado enseñanzas valiosas. En especial, quiero destacar al Dr. Jesús Romero, quien me brindó la oportunidad que hizo todo posible. A Ana María Floreani por las incontables horas de conversación. A mis grandes amigos, por su apoyo y las enriquecedoras conversaciones de ciencia que hemos compartido.

Mi profundo agradecimiento al Dr. Ramón Latorre, mi tutor, por permitirme formar parte de su equipo y guiarme con su sabiduría, experiencia y paciencia durante mi investigación. Asimismo, deseo agradecer a todos los compañeros del laboratorio, haciendo especial mención a Luisa Soto, por su dedicación y apoyo en el desarrollo de mi tesis doctoral.

Deseo expresar mi gratitud al Dr. Eduardo Perozo, por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y hacer posible la obtención de la estructura. Asimismo, agradezco a cada uno de los miembros de su laboratorio, quienes han contribuido con su apoyo invaluable y colaboración durante esta etapa de mi trabajo.

A Jorge, mi compañero de vida, por su apoyo incondicional, amor y comprensión en cada etapa de este desafío. Gracias por hacer este camino más fácil, llevadero y lleno de momentos memorables.

Finalmente agradezco a las instituciones que financiaron mis estudios: FIB-UV 2019, ANID 2020-2023 (beca doctorado nacional-21200592).

A todos, muchas gracias.

CONTENIDO

RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Antecedentes generales del canal BK.....	1
1.2.- Estructural del canal BK.....	2
1.2.1.-Dominio sensor de calcio.....	2
1.2.2.-Dominio sensor de potencial.....	3
1.2.3.-Domino del poro.....	4
1.3.- Modelo alostérico HA.....	4
1.4.-Bloqueadores del canal BK.....	5
1.5.-Activadores del canal BK.....	5
1.5.1.-Activadores de origen endogeno.....	6
1.5.2.-Activadores de origen natural.....	6
1.5.3.-Activadores de origen sintético.....	7
1.5.3.1.-Derivados de Benzimidazol.....	7
1.5.3.1.1.-NS1619	8
MATERIALES Y METODOS.....	12
2.1.- Pendiente límite.....	12
2.2.- Análisis de ruido no estacionario.....	13
2.3.- Corriente unitaria.....	14
2.4.- Docking molecular.....	15
2.5.- Realización de mutaciones.....	16
2.5.1.-Diseño de partidores y mutagénesis.....	17
2.5.2.- Purificación de plásmidos de DNA.....	17
2.5.3.- Linealización y purificación de DNA.....	17
2.5.4.- Preparación de RNA mensajero.....	18
2.6.- Animales de experimentación y microinyección.....	18
2.6.1.-Preparación de Ovocitos de Xenopus leavis.....	18
2.6.2.- Expresión heteróloga de canales en ovocitos de X. leavis.....	19

2.7.- Electrofisiología.....	19
2.7.1.- Técnica de "Patch-Clamp".....	19
2.7.2.- Sistema de registro.....	20
2.7.3.- Pipeta de registro.....	20
2.7.4.- Solución de registro.....	20
2.7.5.- Adquisición y análisis.....	20
2.8.- Criomicroscopía-electronica.....	21
2.8.1.- Clonación, expresión y purificación.....	21
2.8.2.- Preparación de grilla y obtención de imagen.....	22
2.8.3.- Análisis.....	22
2.8.4.- Modelo molecular y refinamiento.....	23
RESULTADOS.....	25
3.1.- Análisis de ruido no estacionario.....	26
3.2.- Corriente unitaria en presencia de NS1619.....	27
3.3.- Pendiente límite en presencia del NS1619.....	28
3.4.- Constante de tiempo en presencia del NS1619.....	30
3.5.- Docking molecular.....	32
3.6.- Curva de activación.....	33
3.7.- Escáner de alanina.....	34
3.8.- Escáner de alanina en presencia de calcio.....	38
3.9.- Modulación sitio de unión.....	40
3.10.- Efecto del NS1619 en ausencia y presencia de calcio.....	43
3.11.- Densidad coulombica del canal BK en presencia del NS1619.....	45
3.12.- Modelo molecular del canal BK en presencia del NS1619.....	46
DISCUSIÓN	47
4.1.- Mecanismo de activación del canal BK por parte del NS1619.....	47
4.2.- Sitio de unión del NS1619 en el canal BK.....	51
4.3.-Estructura del Canal BK en presencia del NS1619.....	54
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFIA.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del canal BK	2
Figura 2. Familia de los derivados sintéticos del benzimidazol.....	7
Figura 3. El activador NS1619 tiene efectos distintos en el canal BK wt y el BKG345S.....	9
Figura 4. Diagrama del procesamiento global y estrategia de refinamiento.....	24
Figura 5. Análisis de ruido no estacionario.....	26
Figura 6. Corriente unitaria en ausencia y presencia de 30 μ M NS1619.....	27
Figura 7. Pendiente límite en ausencia y presencia de 30 μ M NS1619.....	28
Figura 8. Efecto del activador NS1619 en el canal BK.....	30
Figura 9. Sitio de unión del NS1619 en el canal BK de tipo silvestre.....	32
Figura 10. Curva de activación del NS1619 en el canal BK de tipo silvestre.....	34
Figura 11. Escáner de alanina.....	35
Figura 12. Sensibilidad a calcio de las mutantes del escáner de alanina.....	38
Figura 13. Modulación sitio de unión NS1619 en BK.....	40
Figura 14. Sensibilidad a calcio de las mutantes.....	42
Figura 15. Efecto del NS1619 en ausencia y presencia de 100 μ M CaCl ₂	43
Figura 16. Densidad del canal BK en presencia de NS1619.....	45
Figura 17. Modelo molecular del canal BK en presencia de NS1619.....	46
Figura 18. Aminoácidos del sitio de unión del NS1619 en el canal BK.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ajuste al modelo HA en ausencia y presencia de 30 μ M NS161.....	28
Tabla 2. Escáner de alanina, resultados del ajuste de los datos a una ecuación de Boltzmann.....	36
Tabla 3. Sensibilidad a calcio de las mutantes del escáner de alanina, resultados del ajuste a una ecuación de Boltzmann.....	38
Tabla 4. Modulación sitio de unión NS1619 en BK, resultados del ajuste de ecuación de Boltzmann.....	41
Tabla 5. Sensibilidad a calcio de las mutantes, resultados del ajuste de ecuación de Boltzmann.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
K ⁺	Potasio
CA ²⁺	Calcio
BK	Canal de potasio de alta conductancia activado por calcio y voltaje
PS	Pico Siemens
MM	Milimolar
KV	Súper familia de canales de K ⁺ voltaje dependiente
CTD	Dominio citoplasmático
RCK1	Reguladores de la conductancia de K ⁺ 1
RCK2	Reguladores de la conductancia de K ⁺ 2
VSD	Dominio del sensor de voltaje
PD	Dominio del poro
CHTX	Caribdotoxina
IBTX	Iberiotoxina
μM	Micomolar
MTX	Mallotoxin
NS1619	3-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-6-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazol-2-one
PO	Probabilidad de apertura
G/V	Relación conductancia voltaje
N	Número de canales
PDF	Función de densidad de probabilidad
σ_k^2	Varianza general
σ_o^2	Varianza de ruido de un canal abierto
σ_c^2	Varianza del nivel cerrado
I	Corriente de membrana
I	Corriente unitaria
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
RNA	Ácido Ribonucleico.
Å	Amstrong
α, β	Constantes de rapidez hacia adelante y hacia atrás de la transición
C	Factor alostérico que describe el equilibrio entre la apertura del canal y

	la unión de Ca ²⁺ . Es la razón entre la K _D (constante de disociación) para canales abiertos y cerrados.
D	Factor alostérico que describe el equilibrio entre la apertura del canal y la activación de los sensores de voltaje. Es la razón entre la constante de equilibrio que describe la reacción R-A de los canales cerrados y abiertos.
E	Factor alostérico que describe el acoplamiento energético entre sensores de voltaje y la unión de Ca ²⁺ .
HEPES	Ácido (N-2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano sulfónico.
J	Constante de equilibrio de la reacción R-A.
K _D	Constante de disociación de Ca ²⁺ .
L	Constante de equilibrio de la reacción cerrado-abierto
MV	Milivolt, 10 ⁻³ volt.
S	segundo
MS	Milisegundo
N	Nano
P	Pico
T	Temperatura absoluta (medida en grados Kelvin).
T	Constante de tiempo
Z	Carga equivalente aparente.
Δ	Fracción del campo eléctrico.
G	Conductancia
V _{0.5} , V _{1/2}	Potencial de membrana en el que P(O)=0.5
F	Constante de Faraday
R	Constante de los gases
WT	Tipo silvestre

RESUMEN

El canal de potasio activado por calcio y voltaje (BK) codificado por el gen KCNMA1, es un homotetramero cuya subunidad α (subunidad principal) está formada por 7 segmentos transmembrana (S0-S6), una región N-terminal extracelular y una región C terminal (CTD) en el lado intracelular que incluye dominios reguladores de la conductancia de K⁺ (RCK1 y RCK2). El BK participa en distintos roles fisiológicos incluyendo, liberación de neurotransmisores, regulación del ritmo circadiano, duración del potencial de acción, secreción de potasio en el riñón, frecuencia de disparo del potencial de acción y contracción del musculo liso. Mutaciones en el canal BK están asociadas con diversas enfermedades, esto ha hecho que el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen el funcionamiento del canal, sean de gran importancia. En particular, se hace importante conocer cómo activadores y bloqueadores actúan sobre el canal, no solo para responder diversas interrogantes mecanísticas relacionadas con el funcionamiento de la proteína, sino también en aras del desarrollo de dianas terapéuticas. Este trabajo se enfoca en dilucidar el sitio de unión y el mecanismo mediante el cual el activador NS1619 actúa sobre el BK, utilizando técnicas de “acoplamiento molecular”, Patch-Clamp y criomicroscopía electrónica. Se encontró que el NS1619 modula la constante de equilibrio que describe el paso del cerrado al abierto (L) y el factor de acoplamiento alostérico entre el dominio sensor de potencial y el dominio del poro (D) en el modelo alostérico del canal, sin afectar directamente al dominio sensor de potencial ni al dominio sensor de calcio. Los aminoácidos Y332 y K392 fueron identificados como parte del sitio de unión del activador NS1619 y los aminoácidos F223, R329, K330 y K331 como parte del camino alostérico entre el sitio de unión y el dominio del poro.

ABSTRACT

The calcium- and voltage-activated potassium channel (BK) encoded by the KCNMA1 gene is a homotetramer, with its α subunit (main subunit) composed of 7 transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N-terminal region, and an intracellular C-terminal region (CTD) that includes regulatory domains of K⁺ conductance (RCK1 and RCK2). BK plays various physiological roles, including neurotransmitter release, circadian rhythm regulation, action potential duration, kidney potassium secretion, action potential firing frequency, and smooth muscle contraction. Mutations in the BK channel are associated with various diseases, making the study of the molecular mechanisms underlying channel function of great importance. In particular, it is important to understand how activators and blockers act on the channel, not only to answer various mechanistic questions related to protein function, but also for the development of therapeutic targets. This work focuses on elucidating the binding site and mechanism by which the activator NS1619 acts on BK, using molecular docking techniques, Patch-Clamp, and cryo-electron microscopy. It was found that NS1619 modulates the equilibrium constant that describes the transition from closed to open state (L) and the allosteric coupling factor between the voltage sensor domain and the pore domain (D) in the channel's allosteric model, without directly affecting the voltage sensor or calcium sensor domain. Amino acids Y332 and K392 were identified as part of the NS1619 activator binding site, and amino acids F223, R329, K330, and K331 as part of the allosteric pathway between the binding site and the pore domain.

INTRODUCCIÓN

En 1958, Gárdos y su equipo presentaron la primera evidencia de la existencia de una conductancia de K^+ inducida por el aumento intracelular de la concentración de Ca^{2+} en los eritrocitos. Posteriormente, en la década de los 70, se describieron corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} en neuronas de vertebrados e invertebrados (Krnjević & Lisjewicz, 1972; Meech, 1978). Diez años más tarde, se identificó en el músculo esquelético de la rata (Pallotta et al., 1981), las células cromafines (Marty, 1981) y las membranas de músculo esquelético reconstituidas en bicapas de lípidos (Latorre et al., 1982) el primer canal de potasio activado por calcio. Este canal se caracterizó por presentar una gran conductancia iónica, de entre 130-300 pS en condiciones simétricas de K^+ 100-140mM (Latorre et al., 1989), y debido a esta característica se le confirió el nombre de BK “big K^+ ” (Marty, 1983) o MaxiK (Latorre & Miller, 1983).

Además de tener una conductancia unitaria considerablemente mayor en comparación con otros miembros de la familia de canales de potasio, el canal BK presenta una alta selectividad por el potasio (Latorre & Miller, 1983) y está regulado no solo por la concentración intracelular de Ca^{2+} sino también por el potencial de membrana (Marty, 1981; Pallotta et al., 1981; Latorre et al., 1982; Eisenman et al., 1986)). El canal BK ha sido descrito en diferentes tipos celulares, participando en distintos roles fisiológicos, incluyendo la liberación de neurotransmisores (Hu et al., 2001), la regulación del ritmo circadiano (Colwell et al., 2006; Meredith et al., 2006), la duración del potencial de acción (Vandeval et al., 2010), la secreción de potasio en el riñón (Holtzclaw et al., 2011), la frecuencia de disparo del potencial de acción (Kimm et al., 2015) y la contracción del músculo liso (Dopico et al., 2018). Dada la distribución ubicua del canal BK, junto con la variedad de roles fisiológicos en los que está involucrado, es razonable pensar que las disfunciones que puede presentar este canal juegan un papel importante en diversas canalopatías, lo que recalca la importancia del estudio de los mecanismos moleculares involucrados en su funcionamiento como posibles dianas terapéuticas.

El canal BK es un miembro de la súper familia de canales de K⁺ voltaje dependiente (Kv) (Latorre et al., 2010). Es un homotetrámero cuya subunidad alfa (subunidad principal), codificada por el gen KCNMA1, está formada por 7 segmentos transmembrana (S0-S6), una región N-terminal ubicada hacia la cara extracelular y una región C terminal (CTD) ubicada en el lado intracelular (Figura 1). El CTD contiene dos dominios reguladores de la conductancia de K⁺ (RCK1 y RCK2) (Latorre et al., 2017). Los segmentos S0-S4 forman el dominio del sensor de voltaje (VSD) y los segmentos S5-S6 el dominio del poro (PD).

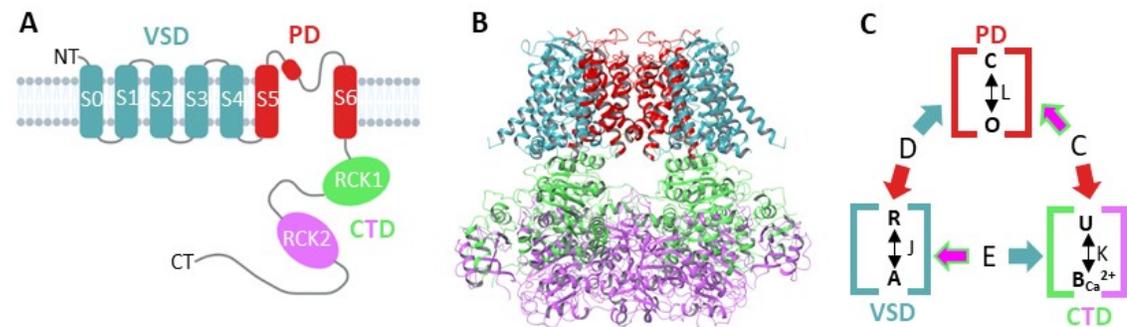


Figura 1. Estructura del canal BK. (A) Topología de membrana de una subunidad α , se destacan sus tres dominios: PD (S5- hélice de poro- S6), VSD (S0-S4) y CTD (RCK1 y RCK2). (B) Mapa codificado en colores de PD (rojo), VSD (azul) y CTD (verde (RCK1)-morado (RCK2)) de la estructura de hBK (Protein Data Bank [PDB] ID: 6v38) (Tao & Mackinnon, 2019). (C) Esquema del modelo alostérico de HA (Horrigan y Aldrich, 2002) muestra las posibles conformaciones del PD (C-O), VSD (R-A) y de la unión a Ca²⁺ (U-B-Ca²⁺) en cada una de las cuatro subunidades α . El equilibrio C-O 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 unión K. Las relaciones alostéricas entre los módulos se describen por los factores alostéricos D, C y E.

Los dominios RCK son responsables de la sensibilidad a Ca²⁺ del canal BK, y están conformados por el RCK1 (residuos 340-610) y el RCK2 (residuos 640-1055) en el canal BK de humanos (Jiang et al., 2002). En 1997, Schreiber et al. (1997) demostraron la existencia de un sitio de unión a Ca²⁺ de alta afinidad al que llamaron “Ca²⁺ bowl”, también conocido como RCK2. Posteriormente

se describió otro sitio de unión a Ca^{2+} de alta afinidad en el lado intracelular en el C-terminal proximal del canal, llamado RCK1 (Jiang et al., 2001). El CTD de cada subunidad α forma un oligómero conocido como “gating ring”, el cual se comporta como un transductor químico-mecánico al experimentar cambios conformacionales con la unión de Ca^{2+} (Jiang et al., 2002; Ye et al., 2006). La remoción del CTD elimina la sensibilidad a Ca^{2+} y a Mg^{2+} del canal BK (Budelli et al., 2013). Entre el RCK1 y los segmentos transmembrana de la subunidad α adyacente (Fig. 1A), se encuentra un sitio de unión a Mg^{2+} , que une Ca^{2+} con baja afinidad (Shi & Cui, 2001). A partir de mutagénesis en el extremo N-terminal del RCK1, se encontró que los residuos E374 y E399 son fundamentales para la unión de Mg^{2+} (Shi & Cui, 2001). Adicionalmente se demostró que el residuo D99 localizado en el lazo S0-S1 es clave en la formación del sitio de unión del Mg^{2+} (Yang et al., 2008 a).

El canal BK puede activarse por voltaje en ausencia de Ca^{2+} (Pallotta, 1985; Meera et al., 1996; Cui & Aldrich, 1997). Una demostración directa de la existencia de un dominio sensor de voltaje (VSD) en el canal BK se obtuvo a partir de los registros de corrientes de *gating* (Stefani et al., 1997; Horrigan & Aldrich, 1999). En contraste con otros canales catiónicos voltaje dependiente, BK solo posee tres residuos con carga positiva en el S4 (Díaz et al., 1998, Ma et al., 2006; Contreras et al. 2013). El número de cargas de gating por canal, estimado a partir del método Q/N (cargas de gating máxima (Q) desplazada durante la despolarización entre el número total de canales (N)) es de aproximadamente 4-5 cargas electrónicas (e_0) (Stefani et al., 1997). En estudios posteriores utilizando la pendiente de la curva Q(V), se estimó que cada VSD solo mueve $0,6 e_0$ por subunidad o un equivalente de $2,4 e_0$ por canal (Horrigan y Aldrich, 1999). El segmento transmembrana S0 parece desempeñar un papel de pivote, por el cual se mueve el segmento S4 hacia arriba durante la despolarización, lo que facilita la apertura del canal (Pantazis et al., 2010). Recientemente, Carrasquel-Ursulaez et al. (2022) a partir de corrientes de gating y simulaciones moleculares reportaron que los aminoácidos R210 y R213 son los principales responsables del mecanismo de detección de voltaje en los canales BK. Además, encontraron que en el caso del

BK, a diferencia de otros canales iónicos, como los canales Kv, , las cargas de gating no recorren todo el campo eléctrico.

El dominio del poro (PD) está conformado por los segmentos transmembrana S5-S6 y por la hélice del poro de cada subunidad α . En este dominio se encuentra el filtro de selectividad (una región estrecha en el dominio del poro que determina el paso de iones selectivamente a través del canal). El filtro de selectividad de la familia de canales de potasio posee una secuencia aminoacídica altamente conservada: TVGYG (Latorre et al., 2010). El BK posee una alta selectividad a K^+ , a la vez que presenta una gran conductancia (Latorre et al., 2017). La neutralización del residuo D292N ubicado fuera del filtro de selectividad reduce alrededor del 40% de la conductancia de canal único, que puede explicarse por una reducción en la densidad de la carga superficial (Haug et al., 2004 parte I y II). Al comparar la secuencia primaria de las regiones de poros de los canales BK y Kv, se hace evidente que BK, a diferencia de los canales Kv, contiene dos residuos de glutamato que dan lugar a dos anillos cargados negativamente para un total de ocho cargas negativas a la entrada del vestíbulo interno. La neutralización de estos dos glutamatos causa una disminución en la conductancia a la mitad del valor obtenido en el canal de tipo silvestre (Brelidze et al., 2003; Nimigean et al., 2003).

En un esfuerzo por comprender cómo los diferentes módulos (Ca^{2+} y Voltaje) se comunican entre sí para controlar la activación del BK, se han desarrollado modelos alostéricos. El modelo que mejor refleja la naturaleza alostérica de la activación del canal fue propuesto por Horrigan y Aldrich (2002) (modelo HA). En la Figura 1 se muestra el esquema del modelo alostérico HA (Horrigan y Aldrich, 2002). Donde las posibles conformaciones vienen dadas por: PD (cerrado-abierto (C-O)), VSD (reposo-activo (R-A)) y CDT (Ca^{2+} no unido- Ca^{2+} unido (U-B Ca^{2+})) 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 por la constante de equilibrio J , la unión de Ca^{2+} se define por la constante de unión K . Las relaciones alostéricas entre los módulos se describen mediante los factores alostéricos D (VSD-PD), C (CTD-PD) y E (VSD-CTD).

Las implicaciones del canal BK en distintas enfermedades, desde sistema cardiaco hasta sistema nervioso, han hecho que sea de gran importancia el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen el funcionamiento del canal. En consecuencia, se hace vital el desarrollo y uso de bloqueadores y activadores con el fin de realizar caracterizaciones biofísicas. Con esto surge la necesidad de conocer cómo estas moléculas actúan sobre el canal, no solo para encontrar respuesta a diversas interrogantes sobre el funcionamiento de la proteína, sino también con la finalidad de poder utilizarlo como dianas terapéuticas.

Las toxinas de escorpión han jugado un papel fundamental en la caracterización del BK. La caribdotoxina (ChTX), aislada del escorpión *Leiurus quinquestratus* fue la primera toxina empleada como bloqueador de canales BK con alta especificidad (Miller et al., 1985). Posteriormente se encontró que esta toxina bloquea otros canales de K⁺ voltaje dependientes (Attali et al., 1992). A diferencia de ChTX, Iberitoxina (IbTX) obtenida del veneno del escorpión *Buthus tamulus*, es un bloqueador altamente específico del canal BK, presentando una K_D aproximada de 1,2 nM (Galvez et al., 1990; Candia et al., 1992). Paxilina extraída a partir del hongo *Penicillium paxilli*, es otro bloqueador altamente específico del canal BK con una K_D alrededor de 1,9 nM (Knaus et al., 1994). Los canales BK son susceptibles a cloruro de tetraetilamonio (TEA) en el lado extracelular con una K_D alrededor de 250 μ M (Vergara et al., 1984; Villarroel et al., 1988), pero es considerado un bloqueador no específico de los canales BK (Hermann et al., 1981). La disponibilidad de bloqueadores específicos de canales BK representa una herramienta fundamental para fines experimentales y terapéuticos, limitado a algunos trastornos neurológicos, como la depresión y el deterioro de la memoria (Olesen et al., 1994). Pero quizás, una utilidad clínica más amplia podría venir del desarrollo de activadores del BK (Hoshi y Heinemann, 2016).

Se han descrito activadores del canal BK, de origen endógeno, natural y sintético. Todos ellos con un posible potencial terapéutico en una gran cantidad de afecciones fisiopatológicas humanas. Entre los activadores de origen endógeno se encuentran los ácidos grasos insaturados, como el ácido araquidónico, el cual puede aumentar la actividad del BK cuando se encuentra

como isómero cis (Denson et al., 2000). El ácido omega-3 docosahexaenoico (DHA) también puede aumentar la actividad del BK en presencia de las subunidades accesorias $\beta 1$ y $\beta 4$ (Hoshi et al., 2013). El 17β -estradiol aumenta la probabilidad de apertura del canal BK, en las células del músculo liso vascular, a través de un efecto modulador dependiente de la subunidad $\beta 1$ (Valverde et al., 1999, Granados S., et al. 2019). Dehidrosaponina-1 es un activador de origen natural, extraído de la planta *Desmodium adscendens*, que incrementa la probabilidad de apertura del BK cuando se coloca en el lado intracelular (McManus et al., 1993). Drogas como clorzoxazona, un relajante muscular (Liu et al., 2002), tamoxifen, utilizado en cáncer de mama (Coiret et al., 2007) y zonisamida, un anti epileptico (Huang et al., 2007) también promueven la activación del BK.

La familia de los derivados sintéticos del benzimidazol es conocida por albergar al activador de canal BK más utilizado: NS1619 (William, 2008; Gessner et al., 2012). Otros miembros de esta familia son: NS004, NS1608, NS19504 y NS11021 (Figura 2). El NS004, sintetizado junto al NS1619 (Olesen et al 1994a; Olesen et al 1994b) es un activador reversible del BK de baja afinidad, con un K_D en el orden micromolar (Olesen et al., 1994). La primera modificación a la estructura de benzimidazol fue la introducción de un conector de biarilurea que abrió el heterociclo de NS1619. Este compuesto, denominado NS1608 (Figura 2), presenta un efecto aditivo con aumentos en el calcio intracelular, y en presencia de concentraciones crecientes de Ca^{2+} genera un desplazamiento de la curva conductancia-voltaje ($G(V)$) hacia la izquierda (alrededor de 200 mV). Mientras que, en un sistema libre de calcio, la curva $G(V)$ en presencia de NS1608 solo se corre hacia la izquierda unos 70 mV (Williams et al., 2008). Nausch y su equipo reportaron que el activador NS19504 es capaz de reducir las contracciones asociadas con la hiperactividad espontánea de la vejiga. Este activador del canal BK posee un K_D en el orden μM desplazando la curva $G(V)$ hacia la izquierda hasta en 60 mV (Nausch et al., 2014). Finalmente, NS11021 es un potente activador altamente específico del canal BK, que ha suscitado gran interés gracias a su efecto vasodilatador (Kun et al., 2009). Recientemente Rockman y su equipo propusieron que este activador pudiese estar ejerciendo su efecto sobre el BK a partir de la modulación de la

constante de equilibrio entre el estado abierto y cerrado de canal (L en el modelo de HA), desplazando el equilibrio hacia el estado abierto (Rockman et al., 2020).

NS11021 desplaza el $V_{1/2}$ hacia voltajes más hiperpolarizados, tanto en presencia como en ausencia nominal de Ca^{2+} , lo que sugiere que se facilita la activación de los canales BK principalmente mediante un mecanismo distinto al de la activación por Ca^{2+} . Por otro lado, una concentración de 30 μ M NS11021 ralentiza la cinética de desactivación de los canales BK a -200 mV aproximadamente 10 veces en comparación con la ausencia de NS11021, con poco efecto sobre la cinética de activación. Esta acción es más pronunciada a voltajes negativos, donde los sensores de voltaje de los canales BK están en reposo. El análisis cinético de canal único muestra además que 30 μ M de NS11021 aumenta la probabilidad de apertura unas 62 veces e incrementa el tiempo medio de apertura de 0.15 a 0.52 ms en ausencia nominal de Ca^{2+} a voltajes inferiores a -60 mV. Los principales efectos activadores de NS11021 se pueden explicar mediante un esquema en el que el fármaco desplaza el equilibrio de cerrado-abierto hacia el estado abierto (Rockman et al., 2020)

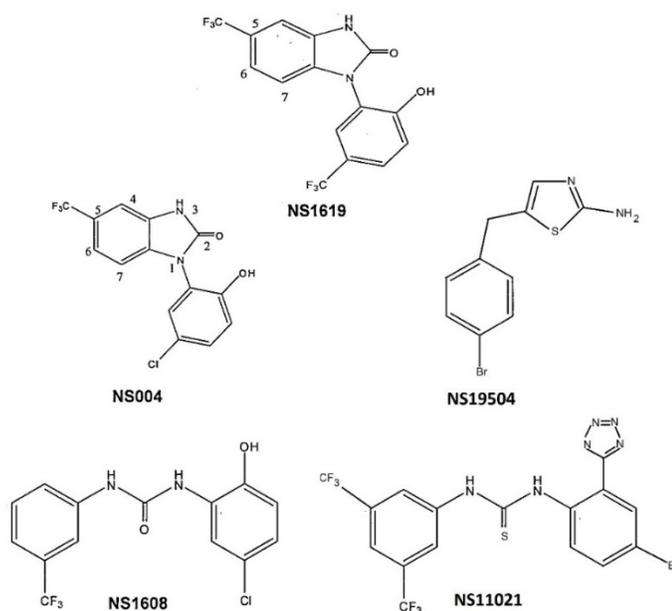


Figura 2. Familia de los derivados sintéticos del benzimidazol.

El NS1619 es un agente terapéutico potencial para tratar el dolor inflamatorio (Akerman et al., 2010), la hipertensión pulmonar (Revermann et al., 2014), la disfunción eréctil (Gonzalez-Corrochano et al., 2013), la inestabilidad de la vejiga (La Fuente et al., 2014), migrañas (Lu et al., 2014) y en la isquemia-reperfusión intestinal (Dai et al., 2017). Gessner et al. (2012) reportaron que el NS1619 podría funcionar por un mecanismo similar al que estos investigadores proponen para el Cym04, que involucra el lazo entre el S6 y el RCK1

Niu et al. (2004) cambiaron la longitud del lazo S6/RCK1. En ausencia de Ca^{2+} , un lazo S6/RCK1 corto aumenta la actividad del canal, mientras que el aumento de la longitud del lazo S6/RCK1 reduce la actividad del canal. La relación lineal observada entre el $V_{1/2}$ y la longitud del lazo S6/RCK1 es consistente con un modelo mecánico en el que el lazo S6/RCK1 forma un resorte pasivo que aplica fuerza a la compuerta del canal en ausencia de Ca^{2+} (Niu Et al., 2004). Por otra parte, Geng et al., (2020) proponen que se requiere una interfaz estructural entre la hélice αB del CTD y el VSD para una activación efectiva tanto por Ca^{2+} como por voltaje, y sugieren que estos procesos pueden compartir vías de activación alostéricas (Geng et al., 2020).

Gessner et al. (2012) proponen que el activador Cym04 funciona alterando la maquinaria de gating- Es por ello que, con base en los estudios de Niu et al., (2004), utilizan un empalme alternativo del BK mutuamente excluyente del exón 9, que codifica para el lazo S6/RCK, al cual llamaron slo1a9. Concentraciones saturantes de Cym04 en el lado intracelular en células HEK293 (configuración *inside-out*), aumenta la corriente del BK silvestre, pero no afecta las corrientes del canal slo1a9. Tampoco se detectaron cambios al evaluar gating usando la configuración de *whole-cell*, lo que indica que el VSD no se ve afectado. Seguidamente evalúan el efecto de mutar uno a uno los aminoácidos que difieren entre ambos canales. Sin embargo, ninguno de los mutantes puntuales muestra el fenotipo slo1a9 con respecto a la acción del activador. Al evaluar el efecto de deleciones en el lazo S6/RCK del canal silvestre, se demuestra una disminución del efecto del activador en este canal, sugiriendo que en el canal BK el Cym04 tiene un efecto equivalente a una deleción del lazo S6/RCK. Al evaluar el efecto del NS1619 no observan

activación del canal slo1a9, mediado por el activador, lo que si sucede al utilizar mallotoxin (MTx), otro activador del BK, concluyendo que el NS1619 también podría activar vía el lazo S6/RCK.

Los datos de Gessner et al. (2012) no permiten esclarecer si el efecto observado depende de la unión del activador al lazo S6/RCK, mediando la dependencia de voltaje, o si alternatively, el lazo S6/RCK podría ser un componente de acoplamiento que conecte funcionalmente el sitio de unión para Cym04 ubicado en otro lugar, al sensor de voltaje y el poro.

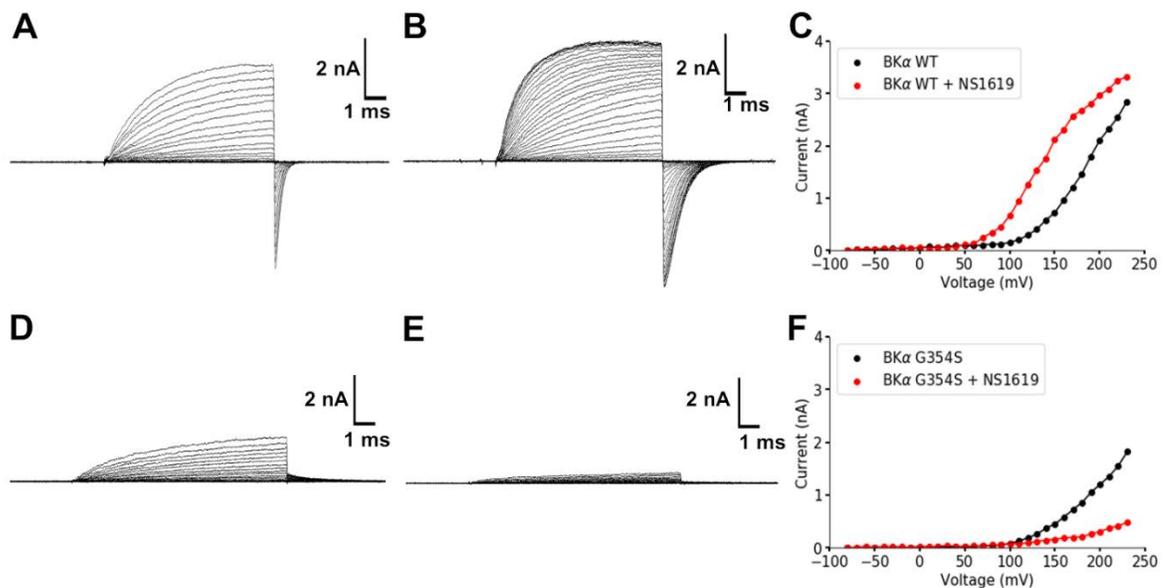


Figura 3. El activador NS1619 tiene efectos distintos en el canal BK de tipo silvestre y el BK_{G354S}. **(A)** Corrientes macroscópicas del canal BK α silvestre en la configuración de inside-out. El protocolo de estimulación consistió en un pre pulso de -80 mV, seguido de pulsos de voltaje en el rango de -120 mV hasta 350 mV con incrementos cada 10 mV, regresando a -80 mV. El potencial de mantención fue de 0 mV. **(B)** Corrientes macroscópicas del canal BK α silvestre con 30 μ M NS1619 agregados al baño. El protocolo de estimulación consistió en un pre pulso de -80 mV, seguido de pulsos de voltaje en el rango de -120 mV hasta 350 mV con incrementos cada 10 mV, regresando a -80 mV. El potencial de holding fue de 0 mV. **(C)** Curva corriente versus voltaje en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 10 μ M NS1619 para el BK silvestre. **(D)** Corrientes macroscópicas del canal mutante BK α G354S. El protocolo de estimulación consistió en un pre pulso de -80 mV, seguido de pulsos de voltaje en el rango de -80 mV hasta 250 mV con incrementos cada 10 mV, regresando a 60 mV. **(E)** Corrientes macroscópicas del canal BK α

G354S con 10 μ M NS1619. El protocolo de estimulación consistió en un pre pulso de -80 mV, seguido de pulsos de voltaje en el rango de -80 mV hasta 250 mV con incrementos cada 10 mV, regresando a 60 mV. **(F)** curva corriente versus voltaje en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 10 μ M NS1619 para el BK_{G354S}. (Du et al., 2020).

En la presente disertación, y en colaboración con investigadores de la Universidad de Chicago, hemos caracterizado una mutación puntual en el gen KCNMA1 en una paciente con ataxia cerebral,

donde se reemplaza la glicina 354 por una serina (G345S) en el filtro de selectividad. La caracterización biofísica de esta mutante ha demostrado que no solo, no se activa en presencia del NS1619, sino que se inhibe, Figura 3 (Du et al., 2020). Por otro lado, al evaluar el efecto sobre el canal de tipo silvestre, nuestros experimentos indican que el activador desplaza hacia la izquierda la curva de conductancia-voltaje (Figura 3C). Al aplicar protocolos de activación y desactivación encontramos que la constante de tiempo a potenciales negativos es mayor en presencia del activador, lo que quiere decir, que la constante de rapidez de desactivación se hace menor sustentando el enlentecimiento de la cinética de desactivación en presencia del activador. Resultados similares fueron reportados por Rockman et. al (2020) al evaluar el efecto del NS11021 en el canal BK. Dado que el NS1619 no tiene ningún efecto sobre el VSD ni el dominio sensor de Ca²⁺ (CSD) (Gessner et al., 2012), nuestras observaciones sugieren que el mecanismo de activación del BK por parte del NS1619 involucra el dominio del poro (PD), donde el equilibrio entre el estado abierto y cerrado ha sido desplazado hacia el estado abierto.

Como hemos discutido anteriormente, los activadores del BK son considerados potenciales dianas terapéuticas ante distintas enfermedades. Sin embargo, el desarrollo de medicamentos confiables estará limitado hasta que se conozcan de forma profunda el mecanismo molecular de estos activadores. Es por ello por lo que, con base en lo aquí expuesto, nos hemos planteado dilucidar el sitio de unión y establecer el mecanismo mediante el cual el activador NS1619 actúa sobre el canal de potasio de alta conductancia activado por calcio y voltaje (BK).

Hipótesis

El NS1619 estabiliza la configuración abierta del canal de potasio de alta conductancia activado por calcio y voltaje (BK) aumentando la constante de equilibrio L que define el equilibrio cerrado-abierto

Objetivo general

Dilucidar el sitio de unión y el mecanismo mediante el cual el activador NS1619 actúa sobre el canal de potasio de alta conductancia activado por calcio y voltaje (BK).

Objetivos específicos

- Dilucidar el mecanismo mediante el cual el activador NS1619 actúa en el canal BK de tipo silvestre.
- Encontrar el sitio de unión del activador NS1619 en el canal BK de tipo silvestre utilizando Docking Molecular.
- Validar el sitio de unión del NS1619 en el canal BK empleando electrofisiología.

MATERIALES Y METODOS

Objetivo 1: Dilucidar el mecanismo mediante el cual el activador NS1619 actúa en el canal

BK de tipo silvestre

Los experimentos de Gessner (2012), sugieren que individualmente, el NS1619 no tiene ningún efecto sobre el dominio sensor de voltaje (VSD) ó el dominio sensor de calcio (CSD) (Gessner et al., 2012). Aquí, nosotros postulamos que el mecanismo de activación del BK por parte del NS1619 involucra el dominio del poro (PD), donde desplazaría el equilibrio entre el estado abierto y cerrado hacia el estado abierto. Para corroborar el papel del PD, evaluamos la constante de equilibrio L mediante el método de pendiente límite.

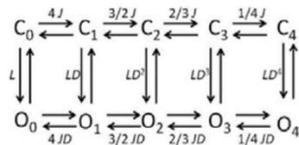
1.1 Pendiente límite

El método de pendiente límite postula que en canales voltaje-dependientes, a probabilidades de aperturas (P_o) muy bajas, la relación $\ln P_o/V$ se torna lineal (Orio & Latorre, 2005; Sigg & Bezanilla, 1997), y se expresa como:

$$\lim_{V \rightarrow -\infty} \frac{d \ln P_o}{dV} = \frac{zeF}{RT} \quad (1)$$

Donde ze es la carga del sensor de potencial acoplada a la apertura y F , R y T retienen sus significados habituales.

En ausencia de calcio y a potenciales muy negativos (donde el VSD está en reposo), solo estamos viendo el equilibrio entre los estados cerrado y abierto del canal BK (C_o - O_o):



Sabiendo que L:

$$L = L_o e^{\frac{z_L F V}{RT}} \quad (3)$$

Finalmente, la pendiente límite en el canal BK corresponde a:

$$\lim_{V \rightarrow -\infty} \frac{d \ln P_o}{dV} = \frac{z_L F}{RT} \quad (4)$$

Donde z_L corresponde a la dependencia de potencial de la constante de equilibrio L o la dependencia de potencial de la apertura del canal (Orio & Latorre, 2005). A nivel gráfico, la pendiente de la recta que se ajusta a la parte lineal de la curva corresponde a z_L y la extrapolación a $V=0$ corresponde a L_o (Latorre et al., 2017).

Para obtener el gráfico de pendiente límite, se llevaron a cabo una serie de protocolos en el mismo parche. En primer lugar, se realizó un protocolo de G/V para evocar las corrientes macroscópicas. A partir de estas corrientes, se obtuvo $I_{\text{cola}}/I_{\text{cola,max}}$ que como sabemos es igual a $P_o/P_{o,max}$. Luego, utilizando la P_o absoluta a un potencial dado, se escaló la curva $P_o/P_{o,max}$ y se obtuvo la parte positiva de la curva P_o vs V. Para obtener la P_o a potenciales negativos, se registraron corrientes unitarias desde -20 mV a -200 mV en pasos de 20 mV. A partir de estos registros, se obtuvo NP_o , donde N es el número de canales, y finalmente se dividió entre N para obtener P_o para cada potencial negativo. Se utilizó el análisis de ruido no estacionario ((Alvarez et al., 2002; Sigworth, 1980) para determinar la corriente unitaria (i) y N. La corriente media y la varianza de las isócronas se calcularon a partir de 200 registros de corriente macroscópica a 200 mV. La corriente unitaria y el número de canales se calcularon ajustando la varianza con respecto a la corriente media a la siguiente función:

$$\sigma_i^2 = i \langle I \rangle - \frac{\langle I \rangle^2}{N} \quad (5)$$

Donde σ es la varianza, i conductancia unitaria, I la corriente media y N el número de canales. La varianza y las medias de la corriente se calcularon con el software de análisis, el cual corrige la reducción paulatina (*rundown*) de la corriente durante los experimentos (Heinemann & Conti, 1992).

El valor $P_o max$ absoluta a 200 mV se calculó a partir de la corriente media máxima registrada $\langle I_{máx} \rangle$ dividida por la corriente media esperada cuando $P_o=1$:

$$P_o max = \frac{\langle I \rangle_{max}}{iN} \quad (6)$$

Para determinar la NP_o de los registros de corriente unitaria, se generaron histogramas de todos los puntos. Luego, se normalizó el histograma dividiendo los valores del eje de las ordenadas por la integral a lo largo del eje de corriente de membrana (I) para obtener la función de densidad de probabilidad (PDF) (Raddatz et al., 2014). La PDF describe la probabilidad de que ocurra un evento (en este caso, un nivel de corriente específico) en función de la distribución de los datos. Se asumió que máximo nueve canales pueden estar abiertos al mismo tiempo, por lo que la PDF teórica se construyó como la suma de 10 distribuciones normales a lo largo del eje de corriente (Figura 5).

$$PDF = \sum_{k=0}^9 \frac{P_k}{\sigma_k \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(I-ki)^2}{2\sigma_k^2}} \quad (7)$$

Donde k es el número de canales abiertos simultáneamente y i es la corriente unitaria. Cada distribución normal se centró en el nivel de corriente esperado, ki , con una varianza σ_k^2 . En la varianza de cada nivel de corriente se tuvo en cuenta el ruido instrumental y el ruido de los canales abiertos. La varianza general (σ_k^2) para el nivel con k canales abiertos se tomó como $(\sigma_c + k\sigma_o)^2$, donde σ_c^2 es la varianza del nivel cerrado, y σ_o^2 es la varianza de ruido de un canal abierto. P_k es el peso relativo de cada nivel de corriente y se calculó utilizando la probabilidad esperada de encontrar k canales abiertos simultáneamente en una membrana que contiene N canales y con una probabilidad de apertura (P_o) como se describe en la distribución de Poisson en la siguiente ecuación (Raddatz et al., 2014).

$$P_k = \frac{(NP_o)^k}{k!} e^{-NP_o} \quad (8)$$

NP_o se obtuvo del ajuste de la PDF teórica a la PDF experimental con el complemento Solver de MS-Excel. Los parámetros ajustables fueron NP_o , σ_c^2 , σ_o^2 y la corriente de un solo canal, i . Finalmente como mencionamos previamente, dividimos el valor de NP_o entre el número de canal

obtenido a partir del análisis de ruido no estacionario realizado en el mismo parche, obteniendo P_o .

Objetivo 2: Encontrar el sitio de unión del activador NS1619 en el canal BK de tipo silvestre.

Para dilucidar la ubicación del sitio de unión del NS1619 en el canal hBK, se empleó la técnica de Docking molecular.

2.1 Docking molecular.

El docking molecular es una técnica computacional que ha sido ampliamente utilizada en la investigación de interacciones moleculares y en el diseño de fármacos. El término docking fue acuñado por Kuntz et al. en 1982 para describir el proceso de búsqueda de la orientación óptima de dos moléculas que forman un complejo estable (Kuntz et al., 1982). El objetivo principal del docking es predecir cómo se unen dos moléculas, un ligando y un receptor, y cómo esta unión afecta su actividad biológica. Esta técnica utiliza modelos matemáticos y algoritmos computacionales para simular la interacción entre el ligando y el receptor (Pinzi & Rastelli, 2019). La técnica de docking se compone de dos etapas principales: el muestreo y la evaluación. Durante la etapa de muestreo, se generan posibles orientaciones y posiciones del complejo ligando-receptor. Esta etapa puede ser realizada mediante diferentes enfoques, como el muestreo aleatorio, el acoplamiento conformacional y el acoplamiento basado en fragmentos. El objetivo de esta etapa es generar una gran cantidad de posibles complejos ligando-receptor que se puedan evaluar subsecuentemente (Velásquez et al., 2013).

En la etapa de evaluación, se asigna una puntuación a cada conformación generada durante la etapa de muestreo. Esta puntuación se utiliza para estimar la estabilidad y la afinidad del complejo ligando-receptor. Las funciones de puntuación incluyen términos energéticos que describen la interacción entre la proteína y el ligando, así como otros factores como la complementariedad de la forma y la superficie, la solvatación y la flexibilidad (Pinzi & Rastelli, 2019).

En particular, en esta tesis se utilizó el programa Maestro 11.8, un software de química computacional desarrollado por Schrödinger, que se emplea para la exploración y análisis de estructuras moleculares, simulación y diseño de fármacos. Para llevar a cabo los dockings, se utilizó Glide, el cual emplea una función de puntuación que toma en cuenta tanto la geometría como la energía de interacción entre las moléculas para evaluar los modelos de docking generados. La puntuación obtenida en Glide es una medida de la afinidad de un ligando por una proteína, el cual se calcula a partir de una función de energía que incluye términos para la interacción entre los átomos, la solvatación y la entropía. En Glide, los modelos con valores de score más bajos se consideran de mayor calidad.

Objetivo 3: Validar el sitio de unión del NS1619 en el canal BK empleando electrofisiología.

Después de obtener los resultados del Docking Molecular, se procedió a realizar mutaciones puntuales en los aminoácidos que conforman el sitio de unión del NS1619 determinado *in silico*. Posteriormente, estas mutaciones se expresaron en ovocitos de *Xenopus laevis* y se midieron las corrientes macroscópicas utilizando la técnica de Patch Clamp en la configuración "inside-out", en presencia y ausencia de concentraciones saturantes del activador NS1619 (30 μ M). En principio, si los aminoácidos mutados son parte del sitio de unión del NS1619, se esperaría una reducción importante en el efecto del activador en dichas mutantes, lo que validará el sitio de unión en el canal BK.

3.1 Realización de mutaciones

Con la finalidad de obtener canales BK con las mutaciones puntuales de interés, se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieron introducir dichas mutaciones en el canal de tipo silvestre mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Posteriormente, el cDNA obtenido de la PCR se amplificó utilizando bacterias competentes y se purificó. Finalmente, se procedió a linealizar el DNA y a partir de este, se preparó el RNA mensajero que se inyectó en el sistema heterólogo de expresión.

3.1.1 Diseño de partidores y mutagénesis.

Se utilizó el cDNA codificante de la unidad α del canal BK (GeneBank: U11058) clonado de humano, (donado por la Dr. Ligia Toro de la Universidad de California Los Angeles, EE. UU), y se sub-clonó en el vector pcDNA3. Este cDNA se utilizó como templado para la mutagénesis por PCR. El diseño de los partidores se realizó mediante el software SnapGene™, donde se insertó el vector pcDNA3 con el gen hBK. A través de las herramientas de base de datos del software, se intercambiaron nucleótidos específicos en la secuencia del BK para obtener primers con mutaciones que permitieran sintetizar, mediante PCR, el cDNA que expresa el canal BK con las mutaciones en los aminoácidos postulados como parte del sitio de unión del NS1619.

3.1.2 Purificación de plásmidos de DNA.

El DNA se extrajo de un cultivo de bacterias previamente transformado con el cDNA de interés, correspondiente al obtenido de cada PCR con partidores para las distintas mutaciones. La extracción de DNA se realizó utilizando columnas "Maxi", siguiendo las indicaciones del fabricante (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA). La secuencia de todos los DNA fue confirmada usando secuenciación Sanger estándar.

3.1.3 Linealización y Purificación de DNA.

Para obtener el DNA necesario para la transcripción, se linealizó utilizando una enzima de restricción de corte único, NotI, cuyo sitio de corte se encuentra en el extremo 3' de la región a transcribir. Se linealizaron 10-20 μ g de DNA siguiendo el protocolo recomendado para la enzima. El producto de la linealización se verificó mediante la carga de 1 μ L de la reacción en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, estimando el tamaño del DNA en referencia al DNA circular. Para purificar el DNA lineal, se hizo pasar el producto por columnas de purificación (QuiaQuick Gel Extraction kit, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA).

3.1.4 Preparación del RNA mensajero.

La transcripción in vitro se realizó utilizando el kit mMMESSAGE mMACHINE T7 ultra (Ambion Inc., Austin, TX, USA). Posteriormente, el cRNA se purificó utilizando columnas de purificación de RNA, siguiendo 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.

3.2 Animales de experimentación y microinyección.

3.2.1 Preparación de Ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se anestesiaron las ranas adultas hembras de *X. laevis* mediante inmersión en 5% p/v de tricaina (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 30 minutos. A través de una incisión abdominal, se procedió a disecar dos lóbulos ováricos, que se transfirieron a una 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 se suturó y el ejemplar se colocó en agua para su recuperación.

Los lóbulos ováricos se separaron manualmente en grupos de 5 a 10 ovocitos y se eliminó el folículo 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 tres veces en medio OR-2 sin colagenasa y dos 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) y posteriormente se colocaron en una placa de Petri con medio SOS suplementado con amikacina (300 µg/mL; LabChile SA, Santiago, Chile). Tras una primera selección, los ovocitos se mantuvieron una hora en incubación a 18°C, cuando se procedió a realizar una segunda selección de ovocitos, eligiendo mediante inspección visual aquellos que no tenían membrana de células foliculares. Estos ovocitos se inyectaron con los cRNA de cada mutante del canal BK o el silvestre

3.2.2 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 de tipo silvestre y con mutaciones puntuales. La microinyección se realizó con la ayuda de un sistema que consistía en 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 prepararon 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 cortó con una tijera para obtener puntas de un diámetro aproximado de 10 µm. La extensión total de la micropipeta se llenó con aceite mineral (M-3516, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). La micropipeta se colocó en el vástago del microinyector y se hizo avanzar el vástago del microinyector hasta casi el máximo. Se succionó un volumen de 2 µL de RNA mensajero, depositado previamente en un trozo de Parafilm® que se ubicó sobre una placa de Petri. Los ovocitos seleccionados previamente se depositaron en una placa plástica con medio OR-2. Esta placa tenía pequeños sacados de 1 mm de ancho que permitían mantener a los ovocitos en una posición fija durante la microinyección. Los ovocitos se inyectaron por el polo animal.

3.3 Electrofisiología

3.3.1 Técnica de "Patch-Clamp".

Antes de la realización de los experimentos de "Patch-Clamp", se removió la membrana vitelina del ovocito manualmente con un par de pinzas especiales para la remoción de membranas foliculares.

La corriente se registró utilizando la técnica de Patch-Clamp (Hamill et al. 1981) en configuración "inside-out".

3.3.2 Sistema de registro.

El sistema de registro consistió en: una cámara donde se coloca el sistema heterólogo de expresión, una lupa binocular (WPI, Sarasota, FL, USA), una lámpara led, un micromanipulador (Modelo 420, Newport Co., Fountain Valley, CA, USA), un amplificador de Patch-Clamp Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA), dos filtros Bessel de 8 polos, uno para la corriente y otro para el voltaje (Frequency Devices 900, Haverhill, MA, USA), un osciloscopio de dos canales modelo 6502 (Hung Chang Co. Ltd., Seúl, Corea del Sur), una tarjeta de adquisición (convertor) Digidata 1550B (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA) y un computador.

La cámara de registro, la lupa y el micromanipulador están colocadas sobre una mesa antivibratoria fabricada en el laboratorio.

3.3.3 Pipeta de Registro.

Para los experimentos de Patch Clamp, se utilizaron pipetas de vidrio de borosilicato (1B150F-4, WPI, Sarasota, FL, USA) que se estiraron con calor en un estirador horizontal (modelo P80-PC, Sutter Instruments Co., San Rafael, CA, USA). Para los experimentos de corriente macroscópica, se utilizaron pipetas de 2,5-4 M Ω .

3.3.4 Soluciones de registro.

Se utilizaron condiciones simétricas de la siguiente solución: 110 mM KOH, 10 mM HEPES, 2 mM KCl, 5 mM EGTA, titulada a $pH = 7.4$ utilizando $MeSO_3$. Las soluciones se almacenaron a 4°C. Para realizar los registros se esperó a que la solución alcanzara temperatura ambiente.

3.3.5 Adquisición y análisis

Las corrientes macroscópicas fueron registradas utilizando un protocolo de pulsos rectangulares de voltaje, de magnitud creciente y con una duración de 10 ms, desde -100 hasta +350 mV en incrementos de +10 mV. La corriente se filtró a 10 kHz. Los experimentos se controlaron utilizando el software de control y adquisición pCLAMP. La corriente de fuga y capacitiva se restaron (cuando fue necesario) usando un protocolo P/8 (Bezanilla y Armstrong, 1977).

Todos los análisis de datos se realizaron con Clampfit 11.0.3 (Molecular Devices), Python y Excel 2013 (Microsoft). La dependencia de voltaje de las corrientes de cola macroscópicas fue cuantificada usando una función de Boltzmann, obteniéndose la curva de conductancia macroscópica versus voltaje:

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{-z\delta F(V - V_{1/2})}{RT}\right)}} \quad (9)$$

Donde G_{max} es la conductancia máxima, $V_{1/2}$ el voltaje al cual $G/G_{max} = 0.5$, F la constante de Faraday, R la constante de los gases, T la temperatura en Kelvin y $z\delta$ la dependencia de potencial.

3.4 Criomicroscopía-electrónica

3.4.1 Clonación, expresión y Purificación

El canal BK humano (hBK) se clonó en el vector de expresión compatible con células de mamífero, pEG BacMam (Goehring et al., 2014). Posteriormente se expresó el canal en células HEK293S GnTI⁻ no adherentes mediante transducción con el virus recombinante BacMam (Goehring et al., 2014). Tras la expresión, las células se recolectaron y homogeneizaron para obtener las membranas. El equivalente en membrana a 1L de células infectadas con virus para producir hBK se extrajo utilizando el siguiente buffer: 20 mM Tris-HCl pH 8, 320 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM CaCl₂, 2 mM TCEP, 1% LMNG e inhibidores de proteasas. Se dejó mezclando por rotación a 4°C durante una hora. Posteriormente se centrifugó a 40000 RPM a 4°C por 30min. El sobrenadante se mezcló con 200 µL de resina (Sephorse)-nanobody y nuevamente se mezcló por rotación a 4°C por 2 horas. Se centrifugó a 13000RMP a 4°C por 3min, se pasó la muestra a una columna de lavado y se lavó con 10 veces el tamaño de la muestra con el siguiente buffer: 20 mM Tris-HCl pH 8, 320 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM CaCl₂, 2 mM TCEP, 1 µL/mL aprotinin, 1 µL/mL Pepstatin, 10 µL/mL soy trypsin y 100 µL/10mL PC:PE:PA disuelto el GDM. Cuando en la columna hay la misma cantidad de buffer de lavado que de resina se detiene el flujo de la columna y se agrega una alícuota de 200 µL de proteasa HRV 3C a 10mg/mL y se dejó encubando toda

la noche a 4°C. El día 2 se lavó con el buffer: 20 mM Tris-HCl pH 8, 320 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM CaCl₂, 2 mM TCEP, 1 μL/mL aprotinin, 1 μL/mL Pepstatin, 10 μL/mL soy trypsin y 50 μL/10mL PC:PE:PA, la muestra se recolectó en un falcon y se concentró a un volumen final de 1mL, posteriormente se filtró para eliminar burbujas y se inyectó en una columna Superose 6 10/300 previamente equilibrado con el mismo buffer de lavado para realizar una cromatografía de exclusión por tamaño. Finalmente se recolecto los volúmenes del pico del cromatograma correspondiente a hBK y se concentró la muestra obteniéndose 3.5 mg/mL de proteína

3.4.2 preparación de la grilla y obtención de imagen

Se colocó 3.5 μL de proteína purificada, a la que previamente se le agregó una concentración saturante de NS1619 (1mM), en grillas de microscopía electrónica (Quantifoil de 200 mallas con espaciado de 1,2/1,3 (Quantifoil)) recubiertas con una película continua de carbono. Las grillas se vitrificaron en un dispositivo Vitrobot al sumergirlas en etano líquido enfriado con nitrógeno líquido. Este proceso preserva la estructura nativa de las proteínas al evitar la formación de cristales de hielo.

Las imágenes de cryo-EM se adquirieron utilizando un microscopio electrónico Titan Krios operado a 300 kV, equipado con un detector de electrones directos Falcon 3EC utilizando un filtro de 20eV y una magnificación de 81000x. Los datos se recopilaban con enfoque automático y ajuste del voltaje utilizando el software EPU. Se tomaron en cuenta las siguientes especificaciones: dosis de electrones de 65 e/A², rango de desenfocando de -2 a -0.5 μm, 50 cuadros por películas, tamaño de pixel 1.068 Å- En total se adquirieron 5200 películas.

3.4.3 análisis

El procesamiento de imágenes y la reconstrucción de mapas tridimensionales se realizaron utilizando el programa cryoSPARC. Inicialmente, se seleccionaron las partículas individuales de las imágenes de cryo-EM y se alinearon y clasificaron en clases 2D. Luego, se llevó a cabo la

clasificación y refinamiento 3D para reconstruir el mapa de densidad coulombica. Finalmente se realizó un refinamiento no uniforme aplicando simetría C1 y C4 donde se obtuvo una resolución final de 3.83 Å y 3.44 Å respectivamente. En la Figura 4 se muestra un diagrama del procesamiento global y estrategia de refinamiento.

3.4.4 Modelo molecular y refinamiento

Con el mapa de densidad coulombica de alta resolución obtenido, se construyó un modelo de hBK en presencia de Ca²⁺ y NS1619, utilizando el programa Coot. Durante la construcción del modelo, se ajustaron y validaron las cadenas polipeptídicas y los residuos de aminoácidos para que encajaran en la densidad coulombica. El modelo se refinó utilizando el programa *real_space_refine* de Phenix para optimizar la geometría y el ajuste del modelo al mapa de densidad coulombica obtenido por cryo-EM. Validamos nuestro modelo utilizando Phenix, comparándolo con nuestra densidad coulombica. La puntuación obtenida fue de 0,76, lo que sugiere una buena concordancia entre el modelo y los datos experimentales. Asimismo, la calidad de los ángulos de torsión de los enlaces peptídicos en la estructura proteica fue de 96.4% lo cual es un indicador aceptable de la calidad del modelo.

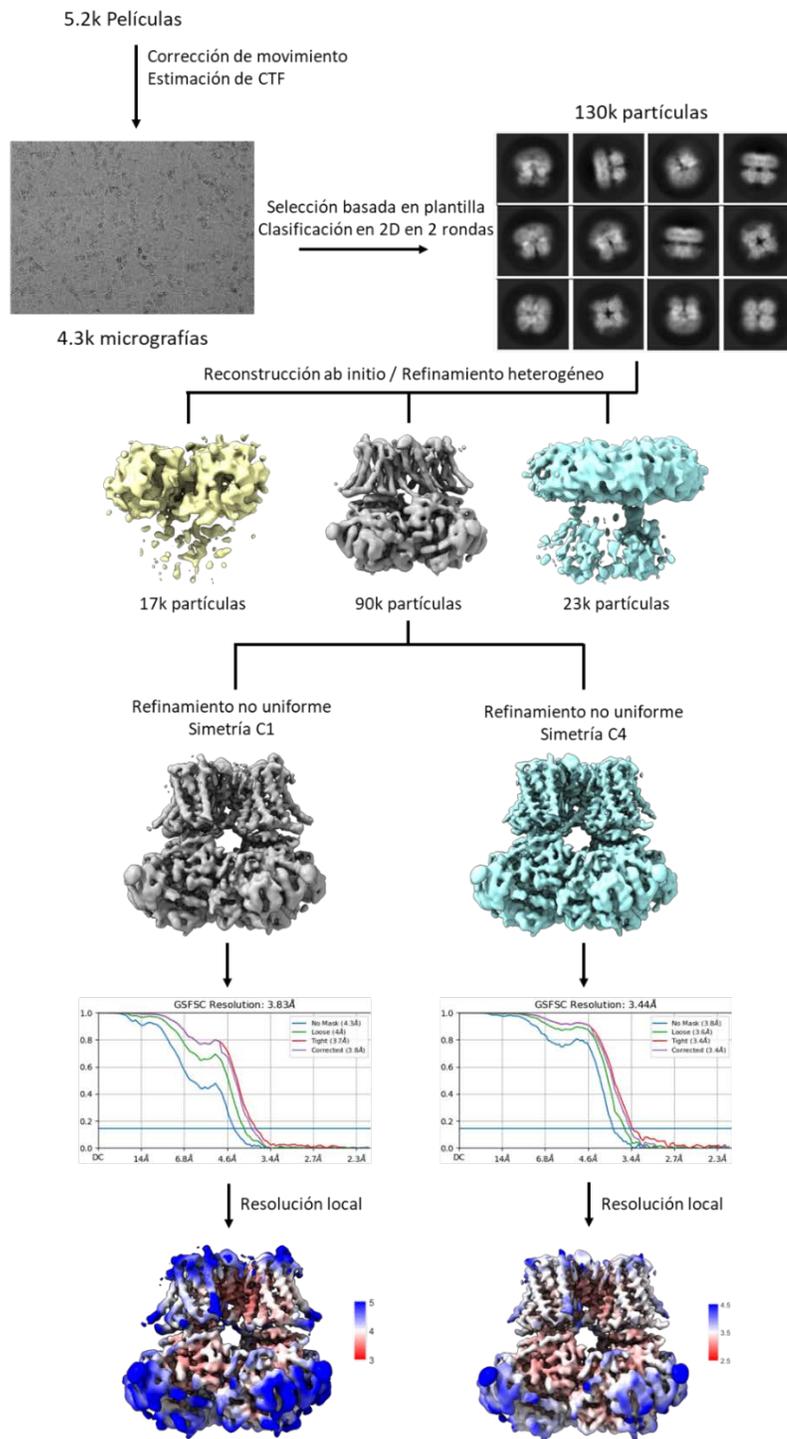


Figura 4. Diagrama del procesamiento global y estrategia de refinamiento.

RESULTADOS

Mecanismo de activación del canal BK por parte del NS1619

Teniendo en cuenta los experimentos de Gessner (2012) donde se reporta que el NS1619 no tiene ningún efecto sobre el VSD ni el dominio sensor de Ca^{2+} (CSD) (Gessner et al., 2012) y con base en nuestras observaciones, postulamos que el mecanismo de activación del BK por parte del NS1619 involucra el dominio del poro (PD). Una manera de corroborar si el PD está involucrado es evaluar la constante de equilibrio L , que, en el modelo alostérico (Fig. 1), es la constante de equilibrio entre el estado cerrado y abierto del canal, para ello empleamos el método de pendiente límite. Este método normalmente se utiliza para conocer la carga asociada a la apertura del canal, sin embargo, también sirve para conocer el valor de L .

Como se explicó en la metodología, se debieron seguir varios pasos para obtener la curva (P_o) vs V , a partir de la cual se obtuvo el valor de L . En la Figura 5 (panel A) se muestran 200 trazos de corriente superpuestos, evocados con un pulso repetido de 8 ms a 200mV, con una cola de -100 mV y un holding de -100mV. A partir de estos registros se calculó la varianza y la corriente promedio y se realizó el gráfico que aparece en la Figura 5 (panel B), a partir de los datos de corriente de cola, al cual se le ajustó la ecuación 5, obteniéndose un número de canales y una corriente unitaria de 384 y 19 pA respectivamente. Con estos valores se procedió a calcular el valor de $P_{o\text{max}}$ a 200mV (ecuación 6) y con dicho valor se escaló el valor de P_o para los puntos positivos de la curva de conductancia versus voltaje.

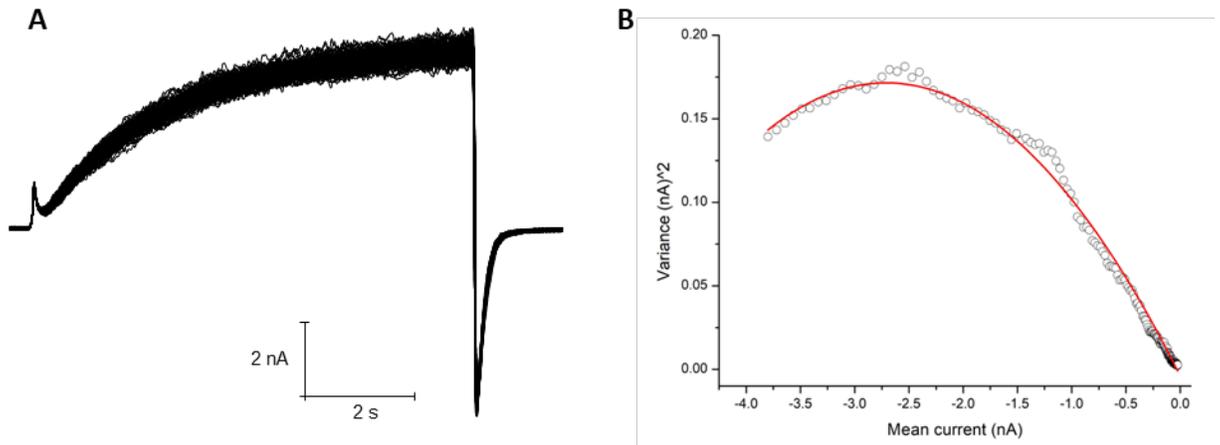


Figura 5. Análisis de ruido no estacionario. (A) 200 registros de corriente macroscópica evocados a 200 mV con una cola de -100 mV y un Holding de -100 mV. B) curva de varianza vs corriente promedio, se ajustó a $\sigma_i^2 = i \langle I \rangle - (\langle I \rangle^2 / N)$, donde σ_i^2 es la varianza, i la corriente unitaria, I la corriente promedio y N el número de canales. Del ajuste $N=384$ y $i=19$ pA.

Una vez realizado el protocolo de corriente vs voltaje y el de análisis de ruido no estacionario se procedió a realizar registros de corriente unitaria desde -20 mV hasta -200 mV en pasos de 20 mV por periodos entre 2s y 20s. A partir de cada registro se realizaron histogramas de corriente que fueron normalizados y evaluados usando la ecuación 7 para determinar el valor de NP_o . Posteriormente se dividió este valor entre el número de canales obtenido a partir del análisis de ruido no estacionario realizado en el mismo parche para establecer P_o . Una vez realizados el registro de corriente unitaria a -200mV para el canal BK sin activador, se procedió a perfundir la solución de registro con 30 μ M NS1619, y se realizó nuevamente el protocolo de corriente versus voltaje y los registros de corriente unitaria desde -20 mV hasta -200 mV.

Registros representativos de corriente unitaria a -60 mV sin activador (registro superior) y en presencia de 30 μ M NS1610 (registro inferior) (Figura 6A) muestran un claro incremento en la probabilidad de apertura del canal en presencia del activador. En el panel B, se muestran histogramas de todos los puntos normalizados de los respectivos registros (en negro el resultado del registro sin activador y en azul a aquel en presencia del NS1619). Las líneas rojas dibujadas

sobre los histogramas son ajustes a la ecuación 7, de donde se recupera el valor NPo para cada potencial.

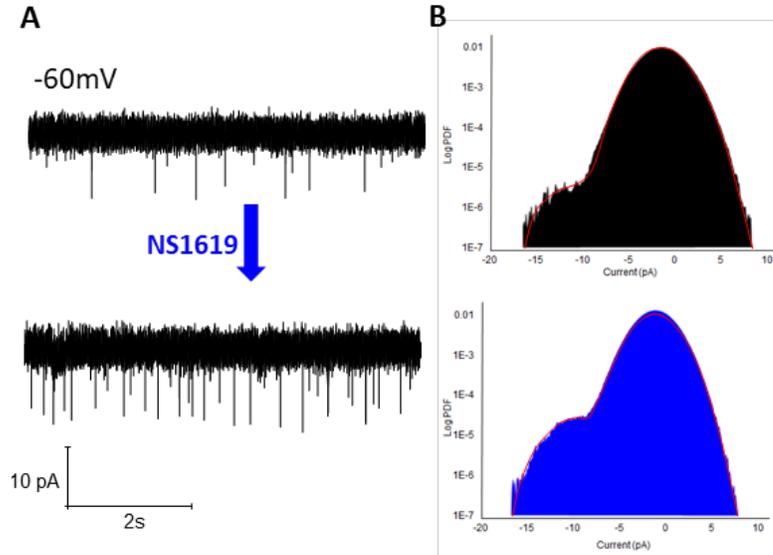


Figura 6. Corriente unitaria en ausencia y presencia de 30 μM NS1619. A) se muestran registros representativos de corriente unitaria a -60 mV sin activador (registro superior) y en presencia de 30 μM NS1610 (registro inferior). B) se muestran histogramas de todos los puntos normalizados de los respectivos registros (en negro el resultado del registro sin activador y en azul en presencia del NS1619). Las líneas rojas dibujadas sobre los histogramas son ajustes a la ecuación 7, de donde se recupera el valor NPo para cada potencial.

Se ajustó el modelo alostérico propuesto por Horrigan y Aldrich (Horrigan & Aldrich, 2002) a los resultados experimentales, en la Figura 7 se muestra el mejor ajuste obtenido (líneas continuas). Dado que los resultados obtenidos por Gessner y su equipo demuestran que el NS1619 no afecta el VSD (Gessner et al., 2012) decidimos mantener los valores de J_0 , $V_h(J)$ y z_J fijos en el ajuste a nuestros datos utilizando los valores reportados por Carrasquel-Ursulaez et al., 2022. En cuanto a los valores de L_0 y z_L utilizamos los obtenidos con el método de pendiente límite (Figura 7). Dado que nuestra solución de registro no contiene calcio, los datos se ajustaron a:

$$P_0 = \left(1 + \frac{(1+J)^4}{L(1+JD)^4}\right)^{-1} \quad (10)$$

Donde:

$$L = L_0 e^{\frac{z_L F V}{RT}} \quad (11)$$

y

$$J = J_0 e^{\frac{z_J F (V - V_h(J))}{RT}} \quad (12)$$

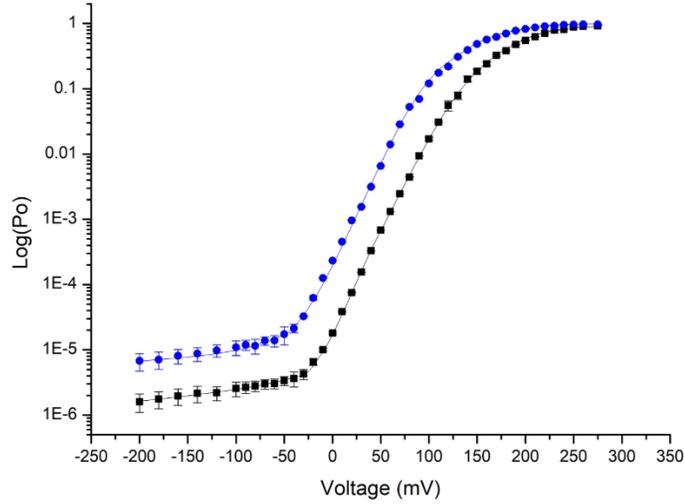


Figura 7. Pendiente límite en ausencia y presencia de 30 μM NS1619. En negro se muestran los datos de P_o vs V en escala logarítmica correspondientes al canal BK en ausencia del activador ($N=6$). En azul se muestra la curva de P_o vs V en escala logarítmica para el canal BK en presencia de 30 μM NS1619 ($N=5$). Las líneas continuas muestran el mejor ajuste del modelo HA, los valores del ajuste se encuentran en la tabla 1.

Como se muestra en la Figura 7 el modelo se ajusta bien a los datos experimentales obtenidos para el canal BK en ausencia del activador, con un valor de D igual a 15 ± 2 lo que coincide con lo reportado previamente (Orío & Latorre, 2005). Al realizar el mismo ajuste a los datos experimentales en presencia de 30 μM NS1619 el mejor ajuste (línea azul) se da cuando D es igual a 8.5 ± 1 .

Tabla 1. Ajuste al modelo HA en ausencia y presencia de 30 μM NS1619

	BK wt	BK + NS1619
V_h	150	150

z_j	0.62	0.62
J_o	0.015	0.015
z_L	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.01
L_o	$4 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-6}$
D	15 ± 2	8.5 ± 1

Finalmente se realizaron protocolos de activación y desactivación y se calculo la constante de tiempo, que viene dada por:

$$\tau(v) = \frac{1}{(\alpha(V) + \beta(V))} \quad (14)$$

donde α es la constante de rapidez de la activación del canal y β es la contante de rapidez de la desactivación y vienen dada por:

$$\alpha(V) = \alpha_0 e^{(z\delta FV/RT)} \quad (15)$$

$$\beta(V) = \beta_0 e^{(z(\delta-1)FV/RT)} \quad (16)$$

A potenciales muy negativos α se torna despreciable y τ viene dado por:

$$\tau(v) = \frac{1}{\beta(V)} \quad (17)$$

La Figura 8A muestra corriente macroscópica de BKwt en inside-out con un potencial de mantención de -100 mV, la corriente fue evocada por pulsos de voltaje desde -100 mV a 300 mV en pasos de 10 mV con un prepulso de -100 mV y retornando a -100 mV en condiciones simétricas de potasio 110 mM. El protocolo para evaluar la desactivación (Figura 8B) consiste en un pulso despolarizante de 150 mV seguido de los pulsos de prueba de 0 a -300 mV en pasos de 10 mV. Los trazos de corrientes tanto de la activación como los de la desactivación fueron cuantificados usando una exponencial simple a partir de la cual se obtuvo el valor de τ experimental para finalmente ajustarlo a la ecuación 14. En la Figura 8C la curva de corriente versus voltaje para el canal wt en ausencia (negro) y presencia (azul) de 30 μ M del activador NS1619 muestra un corrimiento hacia la izquierda propio de un activador, también se observa un cambio significativo

en la constante de tiempo en escala logarítmica versus el voltaje (respetando la paleta de colores). Se hace evidente que a potenciales negativos la τ del canal aumenta (se enlentece) en presencia del activador, teniendo en cuenta que a dichos potenciales τ viene dado por la ecuación 17, sabemos que un aumento en la constante de tiempo a potenciales negativos significa que la constante de rapidez de desactivación disminuye.

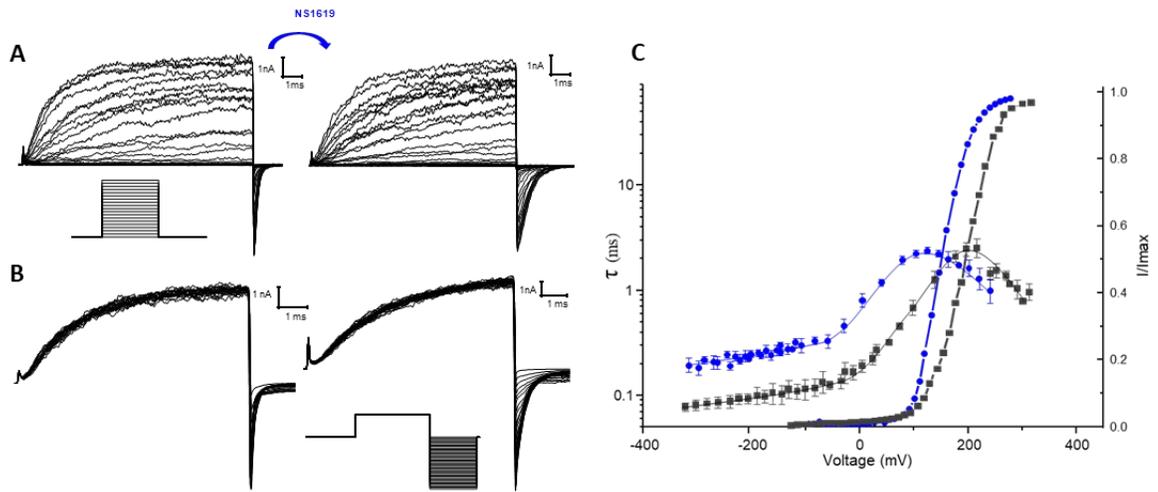


Figura 8. Efecto del activador NS1619 en el canal BK. A) Corriente macroscópica de BKwt en inside-out, holding -100 mV, la corriente fue evocada por pulsos de voltaje desde -100 mV a 300 mV en pasos de 10 mV con un prepulso de -100 mV y retornando a -100 mV en condiciones simétricas de potasio 110 mM. B) protocolo de desactivación, holding -100 mV, se aplicó un pulso despolarizante de 150 mV seguido de los pulsos de prueba que fueron de 0 a -300 mV en pasos de 10 mV. C) Curva I/I_{max} sin activador (negro) y en presencia de 30 μ M NS1619 (azul), Los datos fueron tomados en la cola y ajustados a una ecuación de Boltzmann $I/I_{max} = 1 / (1 + \exp((-z\delta F (V - V_{1/2}))/RT))$ donde I_{max} es la corriente máxima, $V_{1/2}$ el voltaje al que están abierto el 50% de los canales, F la constante de Faraday, R la constante de los gases, T la temperatura en grados Kelvin y $z\delta$ la dependencia de potencial. Resultados del ajuste BK: $z\delta = 0.90 \pm 0.01$ $V_{1/2} = 190\text{mV} \pm 6\text{mV}$. BK_{NS1619} : $z\delta = 0.91 \pm 0.02$ $V_{1/2} = 154\text{mV} \pm 7\text{mV}$. También se muestra la constante de tiempo en ausencia (negro) y presencia (azul) de NS1619. Los datos se tomaron de la activación y desactivación respectivamente, y se ajustaron a $\tau(v) = 1 / (\alpha(V) + \beta(V))$ donde $\alpha(V) =$

$\alpha_0 \exp(z\delta FV/RT)$ y $\beta(V) = \beta_0 \exp(z(\delta - 1)FV/RT)$ siendo α y β las constantes de rapidez para la activación y desactivación, respectivamente.

El sitio de unión del NS1619 en el canal BK

Usando el programa Maestro 11.8 para docking molecular, se evaluó el sitio de unión del NS1619 con la estructura abierta (PDB:6V38) y cerrada del canal BK (PDB:6V35). Para llevar a cabo los docking, se utilizó Glide (un módulo dentro del programa), el cual emplea una función de puntuación que toma en cuenta tanto la geometría como la energía de interacción entre las moléculas para evaluar los modelos de docking generados e incluye términos para la interacción entre los átomos, la solvatación y la entropía. En Glide, los modelos con valores de score más bajos se consideran de mayor calidad. Los resultados de todos los dockings realizados apuntan al lazo entre el S6 y el RCK1 como posible sitio de unión, en la figura 9A se muestra la ubicación de dicha región dentro del canal BK. En los paneles B y C de la misma figura se observan la existencia de una serie de aminoácidos: F223, R329, K330, K331, Y332 y K392. que se repiten tanto en el abierto como en el cerrado del canal (Figura 9 D, E), todo pertenecientes al lazo S6/RCK1 y al VSD. Precisamente estos aminoácidos fueron seleccionados para realizar mutagénesis y evaluar su contribución al sitio de unión del canal BK.

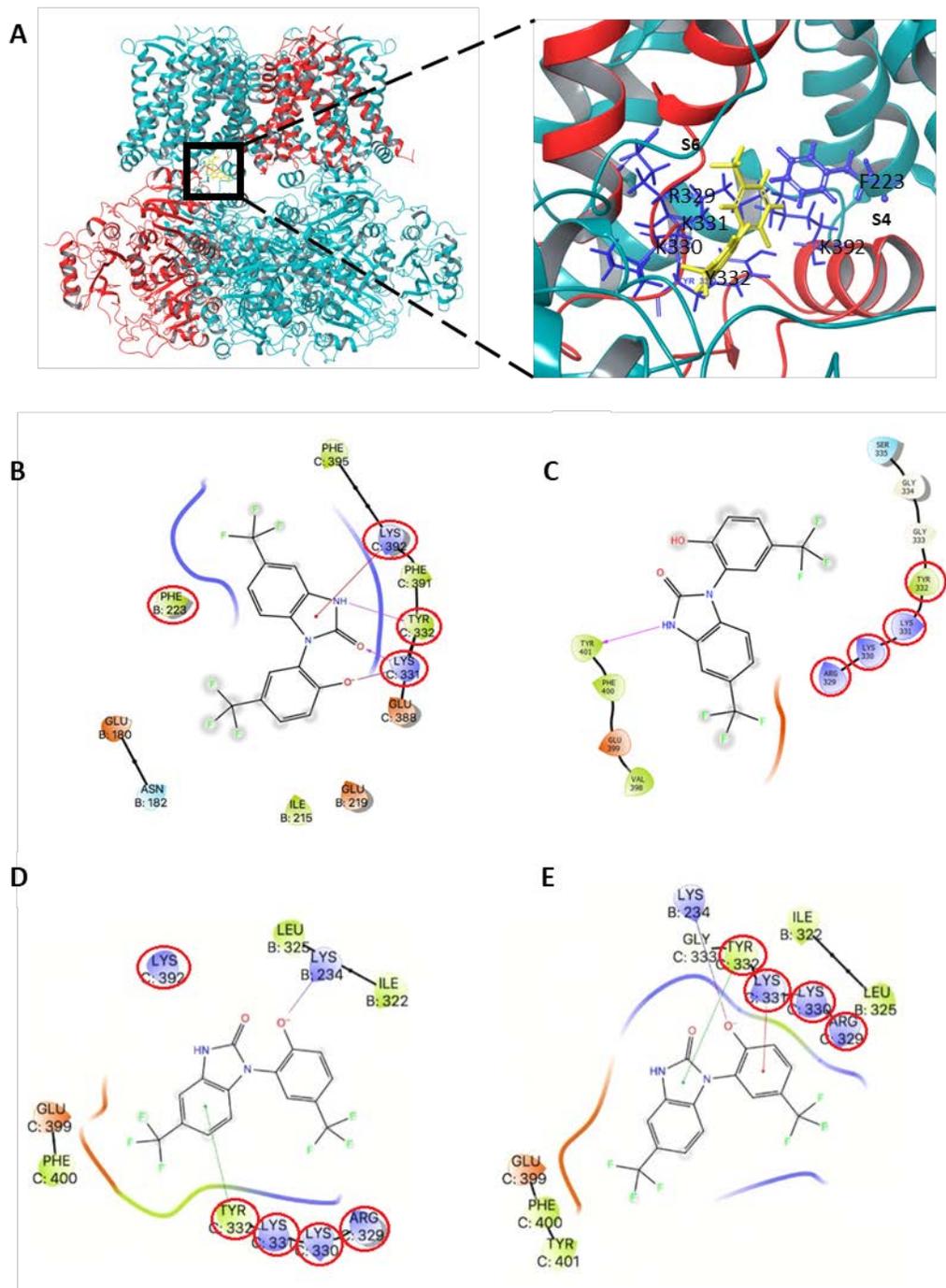


Figura 9. Sitio de unión del NS1619 en el canal BK de tipo silvestre. A) Ubicación del sitio de unión del NS1619 en el canal BK. B y C) Docking molecular utilizando la estructura abierta del

canal (6v38). D y E) Docking molecular empleando la estructura del cerrado del canal BK (6v35). Los círculos rojos señalan los aminoácidos elegidos para la mutagénesis.

Curvas de activación del NS1619

Antes de realizar una mutagénesis secuencial de alaninas, procedimos a realizar una curva de activación del NS1619 en el canal BK de tipo silvestre con la intención de corroborar si la concentración mínima saturante a utilizar en los experimentos es cercana a los 30 μM (Du et al., 2020; Gessner et al., 2012). Para ello procedimos a realizar registros de corrientes macroscópicas evocadas por pulsos de prueba desde -100 mV hasta 300mV en pasos de 10 mV volviendo a -100 mV y utilizando un holding de -100 mV. A partir de las corrientes de cola se crearon curvas I/I_{max} a las cuales se evaluaron usando una Boltzmann para estimar el valor de $V_{1/2}$. En primera instancia se registró el canal de tipo silvestre en solución de registro (110 mM KOH simétrico) posteriormente se procedió a perfundir distintas concentraciones de NS1619 partiendo por una concentración de 1 μM hasta llegar a 100 μM . Finalmente se graficó $V_{1/2}$ vs la concentración de NS1619 y se le ajustó la ecuación de Hill.

$$V_x = V_o + \frac{V_{\text{max}} - V_o}{1 + \left(\frac{K_x}{[X]}\right)^n} \quad (10)$$

Donde V_o corresponde al $V_{1/2}$ del canal en ausencia del activador, V_{max} al $V_{1/2}$ en concentraciones saturantes de NS1619, K_x corresponde a la constante de disociación, X la concentración de NS1619, n el coeficiente de Hill y V_x a los $V_{1/2}$ a concentraciones intermedias del compuesto entre V_o y V_{max} . El número de Hill, n , junto con K_x , V_{max} y V_o se obtuvieron a partir de un ajuste no-lineal de la curva. En la Figura 10 se muestra la curva de activación para el NS1619 en el canal BK de tipo silvestre, se reporta una K_d de $9,73 \pm 0.01 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de 4 sugiriendo una cooperatividad positiva.

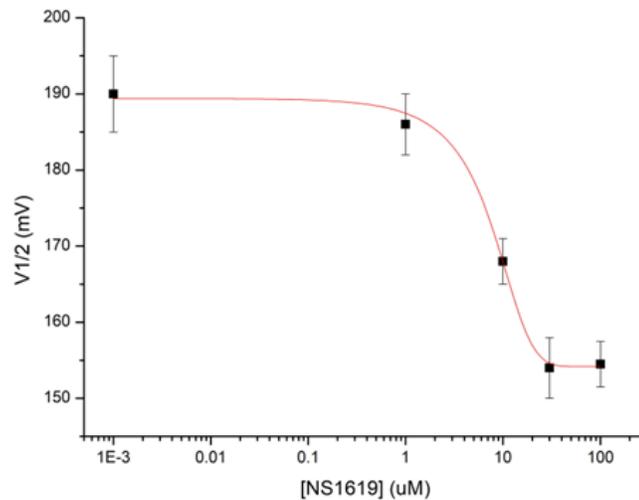


Figura 10. Curva de activación del NS1619 en el canal BK de tipo silvestre. Se reporta el $V_{1/2}$ obtenido a concentraciones de 0, 1, 10, 30 y 100 μM de NS1619. El n experimental fue de 10, 5, 7, 8 y 7 respectivamente. Se realizó el ajuste a la ecuación $V_x = V_o + ((V_{\text{max}} - V_o) / (1 + (K_x/[X])^n))$ arrojando un coeficiente de Hill de 4 y K_d de $9,73 \pm 0.01$.

Validación del Sitio de unión del NS1619 en el canal BK obtenido mediante docking molecular

A partir de los resultados del docking molecular se generaron mutaciones puntuales en los aminoácidos que, putativamente, conforman el sitio de unión del NS1619. Estos canales mutados se expresaron en ovocitos de *Xenopus laevis* y se midieron las corrientes macroscópicas utilizando la técnica de Patch-Clamp en la configuración “inside-out”, en presencia y ausencia de concentraciones saturante del activador NS1619. En una primera instancia, todos los aminoácidos de interés se mutaron por alanina. En la Figura 11 se muestran las curvas de conductancia versus voltaje para cada una de las mutaciones (curva de colores) y el canal BK silvestre (curva negra), sin el activador (líneas continuas) y en presencia de 30 μM NS1610 (líneas discontinuas). Los datos experimentales de I/I_{max} , obtenidos de las corrientes de cola, fueron ajustados usando una ecuación de Boltzmann (ecuación 9). Del ajuste se obtuvieron los

parámetros $V_{1/2}$ y $z\delta$. $V_{1/2}$ indica el valor de potencial al cual la mitad de los canales se encuentran en el estado abierto y el $z\delta$ hace referencia a la dependencia de potencial que presenta el canal. Los datos obtenidos del ajuste se muestran en la tabla 1.

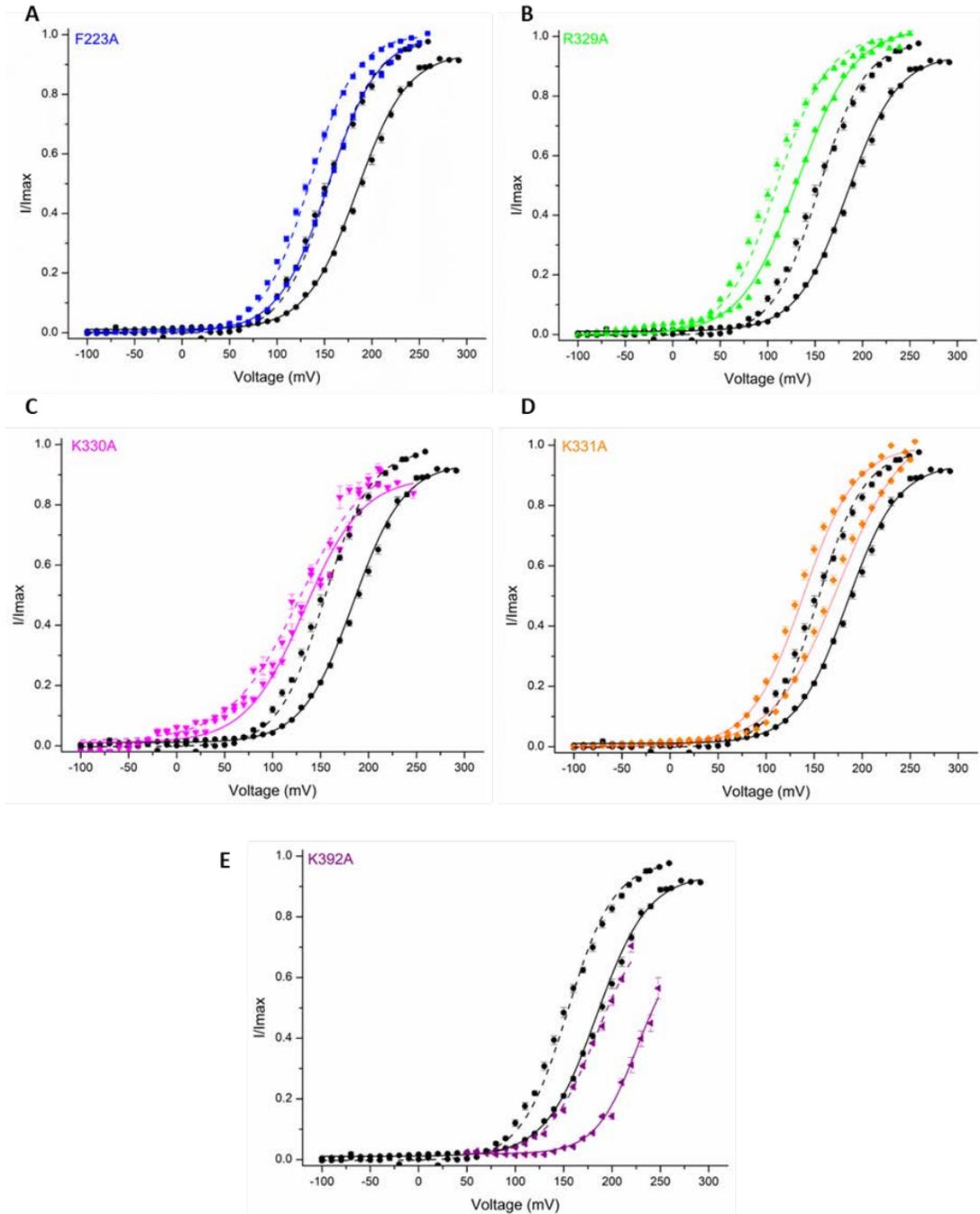


Figura 11. Escáner de alanina. Curvas I/I_{max} vs voltaje del canal de tipo silvestre (negro) y de las mutantes: A) F223A (azul), B) R329A (verde), C) K330A (Fucsia), D) K331A (naranja) y E) K392A (morado) en ausencia (líneas continuas) y presencia de 30uM NS1619 (líneas discontinuas), ver resultados del ajuste en tabla 2.

Tabla 2. Escáner de alanina, resultados del ajuste de los datos a una ecuación de Boltzmann

				NS1619 (30 μ M)			$\Delta V_{1/2}$ (mV)
	$V_{1/2}$ (mV)	$z\bar{d}$	N	$V_{1/2}$ (mV)	$z\bar{d}$	N	
BK wt	190 \pm 6	0.90 \pm 0.01	10	154 \pm 7	0.91 \pm 0.02	8	36
F223A	151 \pm 3	0.97 \pm 0.01	5	131 \pm 5	0.96 \pm 0.01	5	20
R329A	129 \pm 9	0.77 \pm 0.01	8	104 \pm 8	0.90 \pm 0.01	4	25
K330A	140 \pm 10	0.64 \pm 0.03	4	133 \pm 7	0.70 \pm 0.02	4	7
K331A	166 \pm 7	0.84 \pm 0.01	4	133 \pm 7	0.95 \pm 0.01	3	33
K392A	242 \pm 10	0.72 \pm 0.04	4	196 \pm 3	0.93 \pm 0.02	4	44

En esta investigación se buscó corroborar el sitio de unión del NS1619 en el canal BK. Para ello, se mutó uno a uno los aminoácidos que los resultados del docking molecular arrojaron como parte del sitio de unión. Se partió de la premisa de que, si el aminoácido en cuestión era efectivamente parte del sitio de unión, al mutar por una alanina, el efecto de activación debería verse afectado, bien sea eliminándose o disminuyendo, al perfundir la solución con el activador en el canal con la mutación.

Al perfundir 30 μ M NS1619 produce un corrimiento de la curva de conductancia versus voltaje hacia la izquierda de alrededor de 36 mV en BK silvestre. Este efecto se vio disminuido a la mitad al cambiar la fenilalanina en la posición 223 por una alanina y se perdió cuando se mutó la lisina

en la posición 330 por alanina. Estos resultados sugieren que ambos aminoácidos forman parte del sitio de unión del NS1619 en el canal BK. Además, en la mutante R329A el efecto disminuyó 25 mV, como se muestra en la Figura 10, mientras que la mutación K331A no causó ninguna variación en presencia de condiciones saturantes del activador, lo que sugiere que probablemente este aminoácido en esta posición no es parte del sitio de unión. Por otro lado, al mutar la lisina 392 por alanina se observó un corrimiento hacia la izquierda de 46 mV, siendo este mayor que el visto en el canal de tipo silvestre. Este resultado sugiere que, al eliminar tal carga, la molécula de interés puede acomodarse de mejor manera en el sitio de unión propuesto.

En la investigación, se evaluaron diversas mutaciones en el lazo S6/RCK1 del canal BK y se planteó la interrogante de si alguna de estas mutaciones afectaría la sensibilidad al calcio. Para responder a esta pregunta, se evaluó la corriente macroscópica en presencia de una concentración saturante de CaCl_2 (100 μM). Como se puede apreciar en la Figura 12, se observó que todas las mutaciones evaluadas son sensibles al calcio de la misma manera que el canal de tipo silvestre. Por lo tanto, se puede concluir que dichas mutaciones no afectan al dominio sensor de calcio del canal BK.

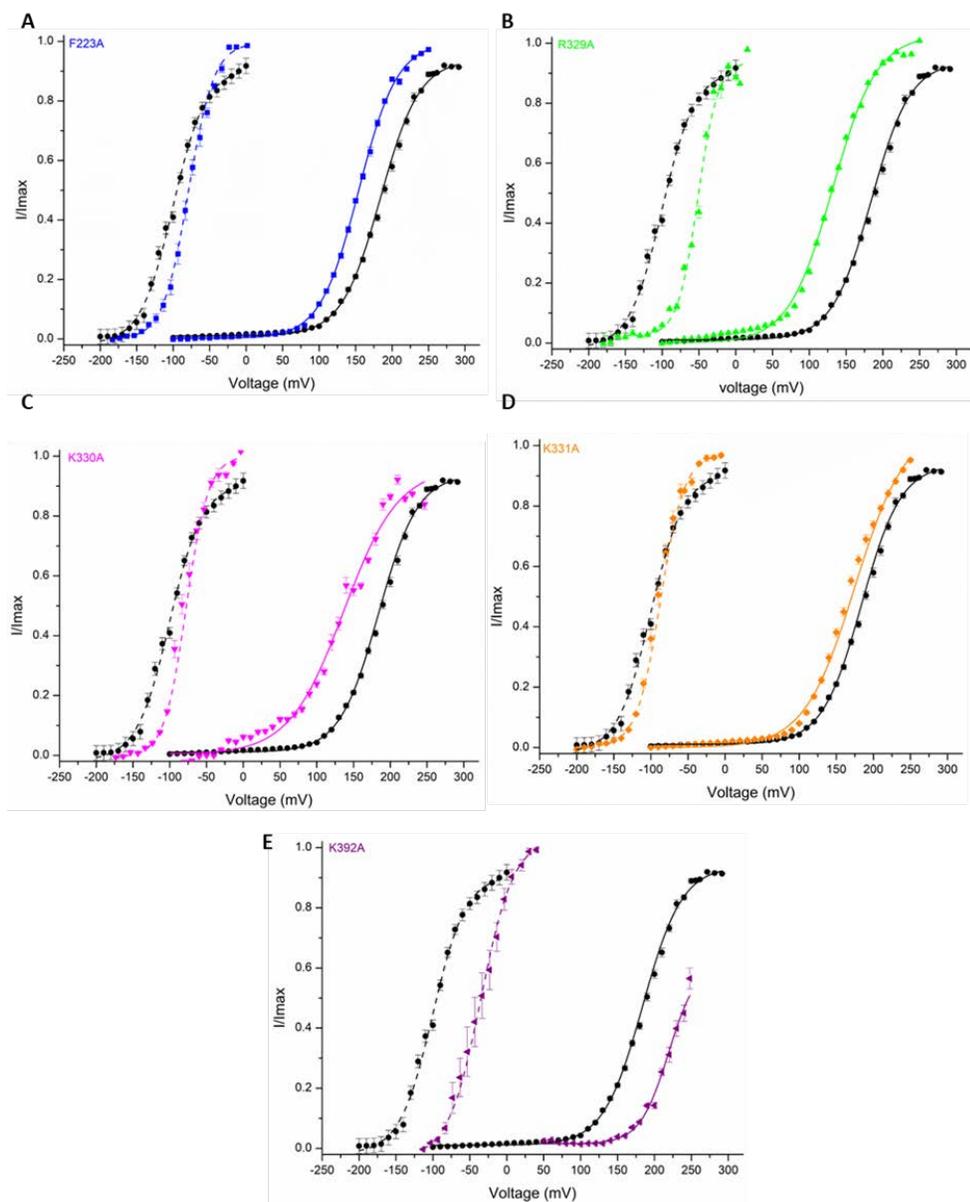


Figura 12. Sensibilidad a calcio de las mutantes del escáner de alanina. curvas conductancia vs voltaje del canal de tipo silvestre (negro) y de las mutantes: A) F223A (azul), B) R329A (verde), C) K330A (fucsia), D) K331A (naranja) y E) K392A (morado) en ausencia (líneas continuas) y presencia de 100 μ M CaCl₂ (líneas discontinuas). Ver resultados del ajuste en tabla 3.

Tabla 3. Sensibilidad a calcio de las mutantes del escáner de alanina, resultados del ajuste a una ecuación de Boltzmann

		CaCl ₂ (100 μ M)
--	--	---------------------------------

	$V_{1/2}$ (mV)	$z\delta$	N	$V_{1/2}$ (mV)	$z\delta$	N
BK wt	190 ± 6	0.90 ± 0.01	10	-92 ± 4	1.03 ± 0.06	4
F223A	151 ± 3	0.97 ± 0.01	5	-77 ± 5	1.4 ± 0.3	3
R329A	129 ± 9	0.77 ± 0.01	8	-49 ± 2	1.18 ± 0.1	3
K330A	140 ± 10	0.64 ± 0.03	4	-80 ± 1	1.61 ± 0.07	3
K331A	166 ± 7	0.84 ± 0.01	4	-88 ± 5	1.4 ± 0.05	4
K392A	242 ± 10	0.72 ± 0.04	4	-35 ± 10	1.21 ± 0.06	3

De modo complementario se decidió probar si se podía modular el efecto del NS1619 en las mutaciones candidatas a conformar el sitio de unión. Para ellos una vez realizado el escáner de alanina, se decidió probar otras mutaciones, donde por ejemplo se neutralizó la carga, o el en caso de la fenilalanina se favoreció la formación de puentes de hidrógenos al cambiar por una tirosina. Como se muestra en la Figura 13, en la mayoría de los casos evaluados, mutar los aminoácidos en cuestión, conlleva a una modulación del efecto del NS1619 en el canal BK, apoyando la idea de que estos aminoácidos son parte del sitio de unión para este activador en el BK. La sustitución F223Y implicó una mayor activación (corrimiento hacia la izquierda de 94 mV), lo que podría deberse a la creación de nuevos puentes de hidrógeno. En K331Q y K393Q el efecto en presencia del activador también fue mayor (134 mV y 88 mV respectivamente), por lo que se podría pensar que, al neutralizar la carga, el activador puede acomodarse de mejor forma al sitio de unión favoreciendo las demás interacciones. En el caso de Y332F no se vio ningún cambio en comparación con el canal de tipo silvestre, indicando que probablemente no sea parte del sitio de unión. Finalmente neutralizar la lisina 330 eliminó por completo el efecto del NS1619, ratificando la importancia de este aminoácido en el sitio de unión del NS1619 en el canal BK.

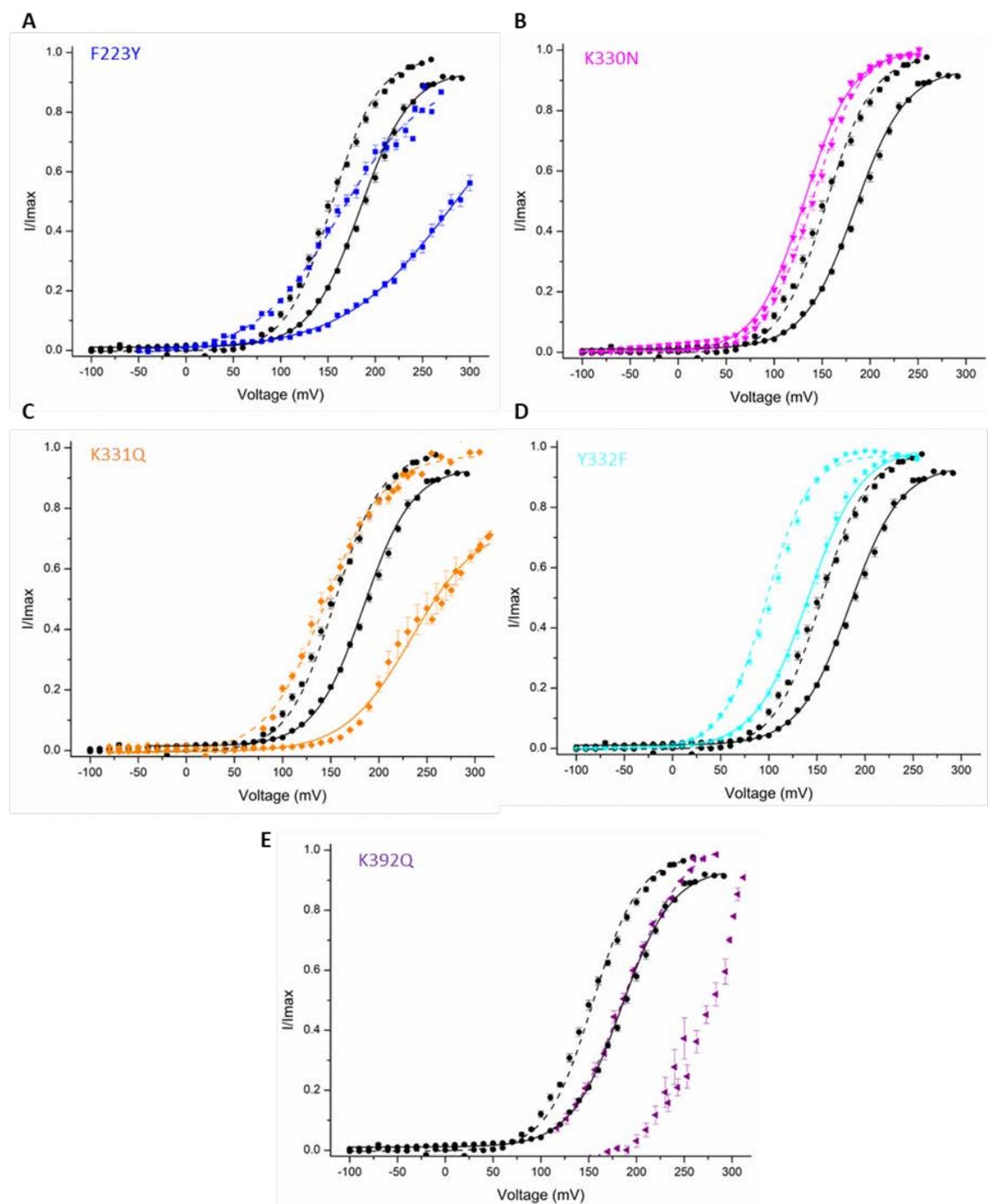


Figura 13. Modulación sitio de unión NS1619 en BK. Se muestran las curvas conductancia vs voltaje del canal de tipo silvestre (negro) y de las mutantes: A) F223Y (azul), B) K330N (fucsia), C) K331Q (naranja), D) Y332F (cian) y E) K392Q (morado) en ausencia (líneas continuas) y presencia de 30 μ M NS1619 (líneas discontinuas). Ver resultados del ajuste en tabla 4.

Tabla 4. Modulación sitio de unión NS1619 en BK, resultados del ajuste de ecuación de Boltzmann

				NS1619 (30 μ M)			$\Delta V_{1/2}$ (mV)
	$V_{1/2}$ (mV)	$z\delta$	N	$V_{1/2}$ (mV)	$z\delta$	N	
BK wt	190 \pm 6	0.90 \pm 0.01	10	154 \pm 7	0.91 \pm 0.02	8	36
F223Y	284 \pm 16	0.43 \pm 0.01	3	174 \pm 12	0.53 \pm 0.01	3	110
K330Q	131 \pm 5	1.05 \pm 0.02	10	139 \pm 8	1.04 \pm 0.01	4	-8
K331Q	246 \pm 10	0.65 \pm 0.02	3	112 \pm 9	1.03 \pm 0.02	3	134
Y332F	140 \pm 7	0.98 \pm 0.01	7	102 \pm 6	1.05 \pm 0.02	5	38
K392Q	273 \pm 25	1.08 \pm 0.09	8	185 \pm 10	0.81 \pm 0.02	3	88

También se evaluó la sensibilidad al calcio de las mutantes empleadas en esta última etapa de la verificación electrofisiológica del sitio de unión. Como se muestra en la Figura 14, todas las mutaciones evaluadas fueron sensibles a calcio saturante, por lo que podemos decir que estas mutaciones no afectan al dominio sensor de calcio del canal.

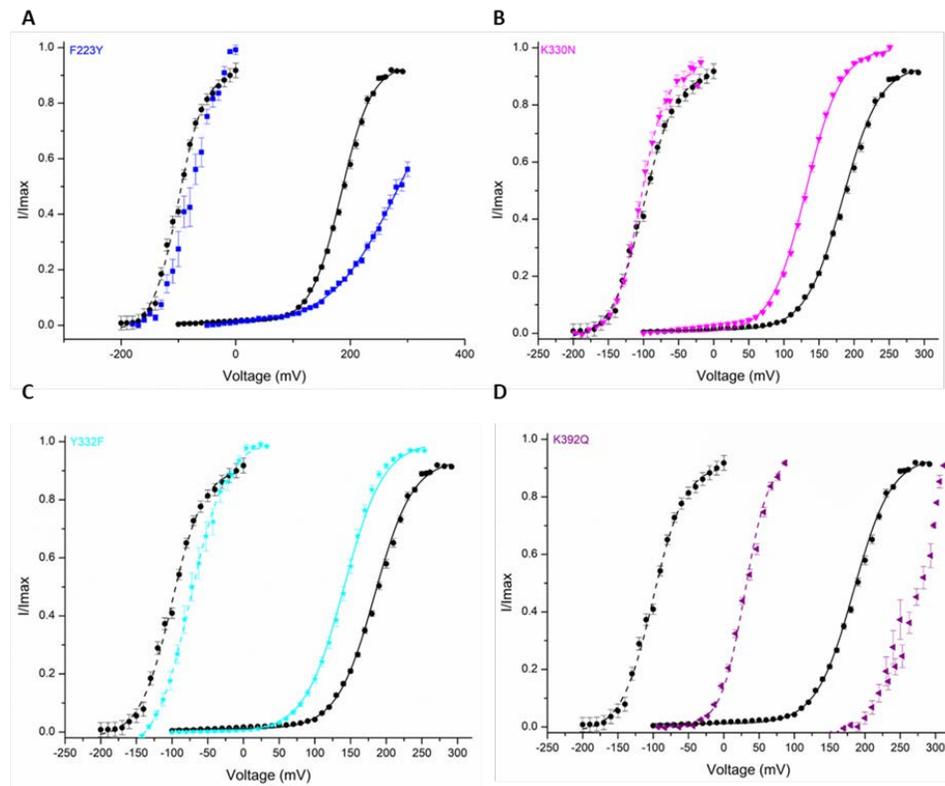


Figura 14. Sensibilidad a calcio de las mutantes. curvas conductancia vs voltaje del canal de tipo silvestre (negro) y de las mutantes: A) F223Y azul), B) K330N (funsia), C) Y332F (cian) y D) K392Q (morado) en ausencia (líneas continuas) y presencia de 100 μ M CaCl₂ (líneas discontinuas). Ver resultados del ajuste en tabla 5.

Tabla 5. Sensibilidad a calcio de las mutantes, resultados del ajuste de ecuación de Boltzmann

				CaCl ₂ (100 μ M)		
	$V_{1/2}$ (mV)	$z\delta$	N	$V_{1/2}$ (mV)	$z\delta$	N
BK wt	190 \pm 6	0.90 \pm 0.01	10	-92 \pm 4	1.03 \pm 0.06	4
F223Y	284 \pm 16	0.43 \pm 0.01	3	-75 \pm 16	1.06 \pm 0.04	3
K330Q	131 \pm 5	1.05 \pm 0.02	10	-99 \pm 10	1.18 \pm 0.06	4
Y332F	140 \pm 7	0.98 \pm 0.01	7	-68 \pm 8	1.12 \pm 0.04	4
K392Q	273 \pm 25	1.08 \pm 0.09	8	-33 \pm 4	1.22 \pm 0.03	3

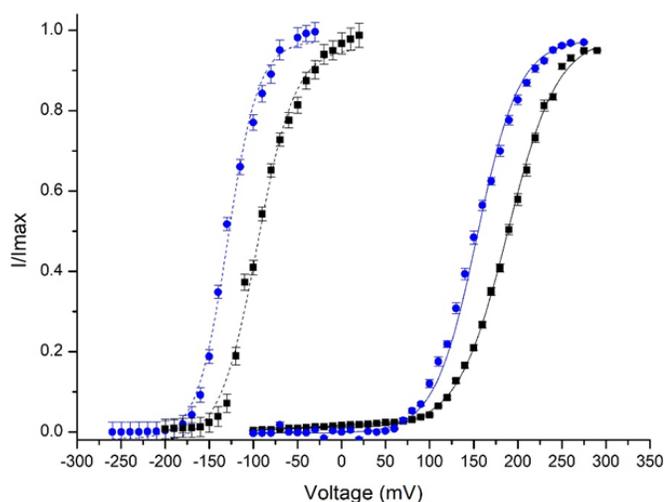


Figura 15. Efecto del NS1619 en ausencia y presencia de 100 μM CaCl_2 . Curvas conductancia vs voltaje del canal de tipo silvestre sin activador ni calcio en negro línea continua ($V_{1/2} = 190 \pm 6$, $z\delta = 0.90 \pm 0.01$). La línea azul continua corresponde a la curva conductancia vs voltaje en presencia de 30 μM NS1619 sin calcio ($V_{1/2} = 154 \pm 7$, $z\delta = 0.91 \pm 0.02$). Curva negra discontinua es en presencia de 100 μM CaCl_2 , pero sin activador ($V_{1/2} = -92 \pm 4$, $z\delta = 1.03 \pm 0.06$) y la línea azul discontinua está en presencia de NS1619 y CaCl_2 ($V_{1/2} = -129 \pm 5$, $z\delta = 0.99 \pm 0.02$).

Estructura del canal BK en complejo con el activador NS1619

Empleamos crio-microscopía electrónica para obtener la densidad coulombica del canal BK humano, en presencia de concentraciones saturantes del activador NS1619. Cabe destacar que el efecto de activación del canal BK por parte de NS1619 es independiente del calcio, según lo establecido por Gessner et al. en 2012. Basándonos en los resultados obtenidos por Gessner y en los resultados mostrados en la Figura 15, decidimos purificar el canal BK en detergente y en presencia de calcio, siguiendo el protocolo empleado por Tao y Mackinnon en 2019.

La Figura 16 (paneles A, B y C), una superposición de la estructura en ausencia (Tao y Mackinnon 2019) y en presencia de del activador NS1619, permite detectar una densidad adicional que coincide aproximadamente al sitio que proponemos como el lugar de unión para el NS1619 en el canal BK (basado en los cálculos de docking) y está ausente en la estructura obtenida por Tao y Mackinnon (Figura 16D), a pesar de que no se detectan grandes diferencias a nivel estructural

entre las densidades asociadas al BK. De esta manera, nuestro hallazgo nos permite validar el sitio de unión propuesto en esta tesis.

La densidad coulombica obtenida (Figura 16, panel A) es de suficientemente alta resolución (3.4 Å), para trazar la cadena polipeptídica y generar un modelo atómico basado en los programas Phenix1.20.1-4487 y WinCoot (Figura 17A y B). Con Phenix ajustamos un modelo inicial a la densidad coulombica, en nuestro caso ajustamos el modelo obtenido por Tao y Mackinnon (2019), 6v38 (Figura 17C y D). Subsecuentemente, se utilizó WinCoot para ajustes finos y manuales al modelo, corregir errores en el gráfico de Ramachandran y validar la calidad del ajuste. El modelo molecular final requiere un proceso iterativo de refinamiento y validación donde se utilizan ambos programas, lo que permite obtener un modelo molecular preciso y confiable de la estructura a partir de la densidad coulombica obtenida por crio-EM.

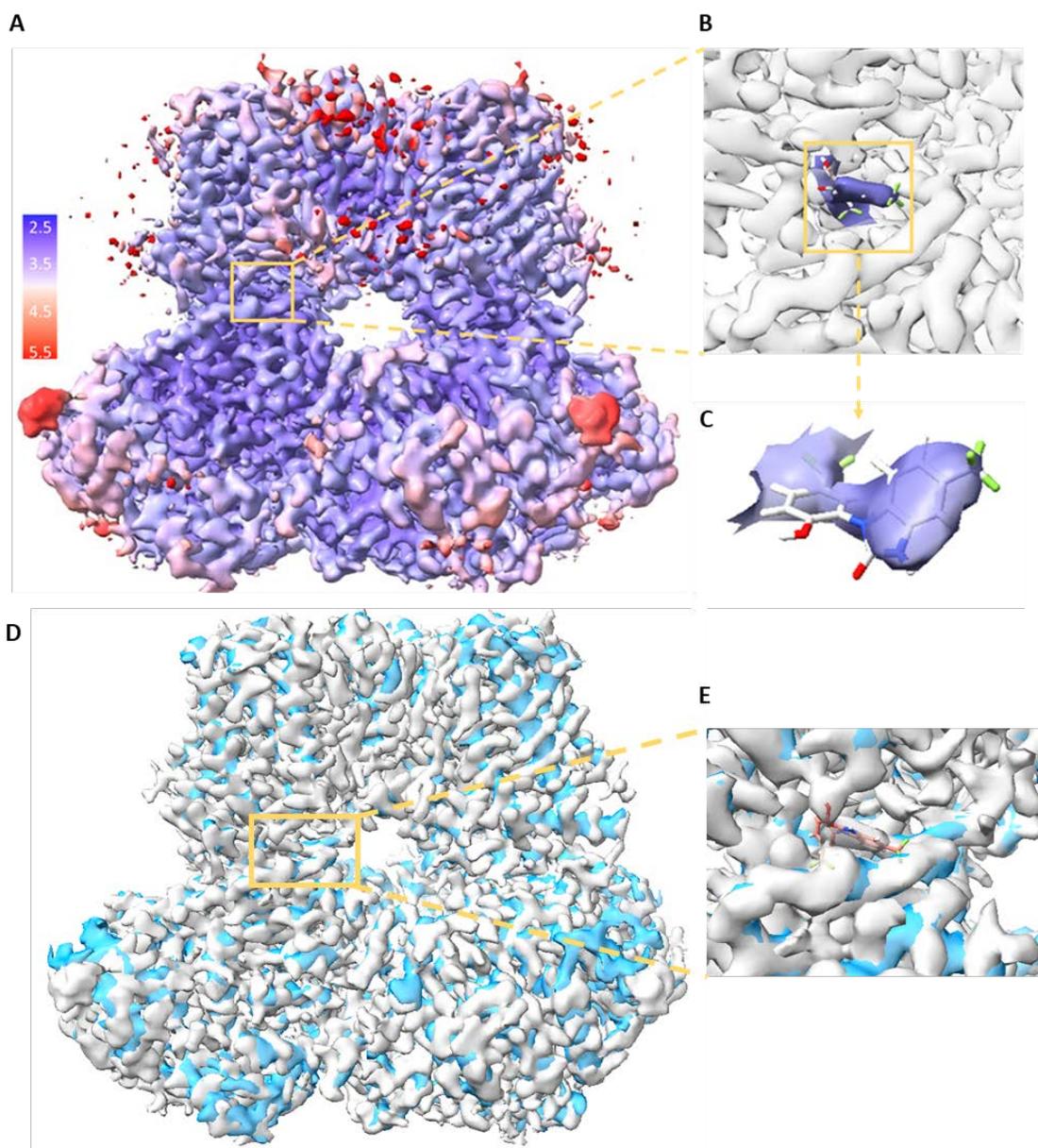


Figura 16. Densidad del canal BK en presencia de NS1619. A) se muestra la densidad del canal BK obtenido a partir de cryo-EM, el canal se purificó en detergente en presencia de calcio y se le agregó NS1619 justo antes de congelar la muestra, en colores se representa la resolución, siendo la resolución promedio de 3.5 Å. B) zoom al sitio de unión propuesto donde se observa la densidad correspondiente al NS1619. C) ampliación de la densidad correspondiente al NS1619. D) En azul se muestra la densidad 21029 obtenida por Tao y Mackinnon 2019 (PDB 6v38), en blanco se muestra la misma estructura que en A, nótese que la estructura en azul no posee la densidad que le atribuimos al NS1619, detalle que se observa mejor en el zoom realizado en E.

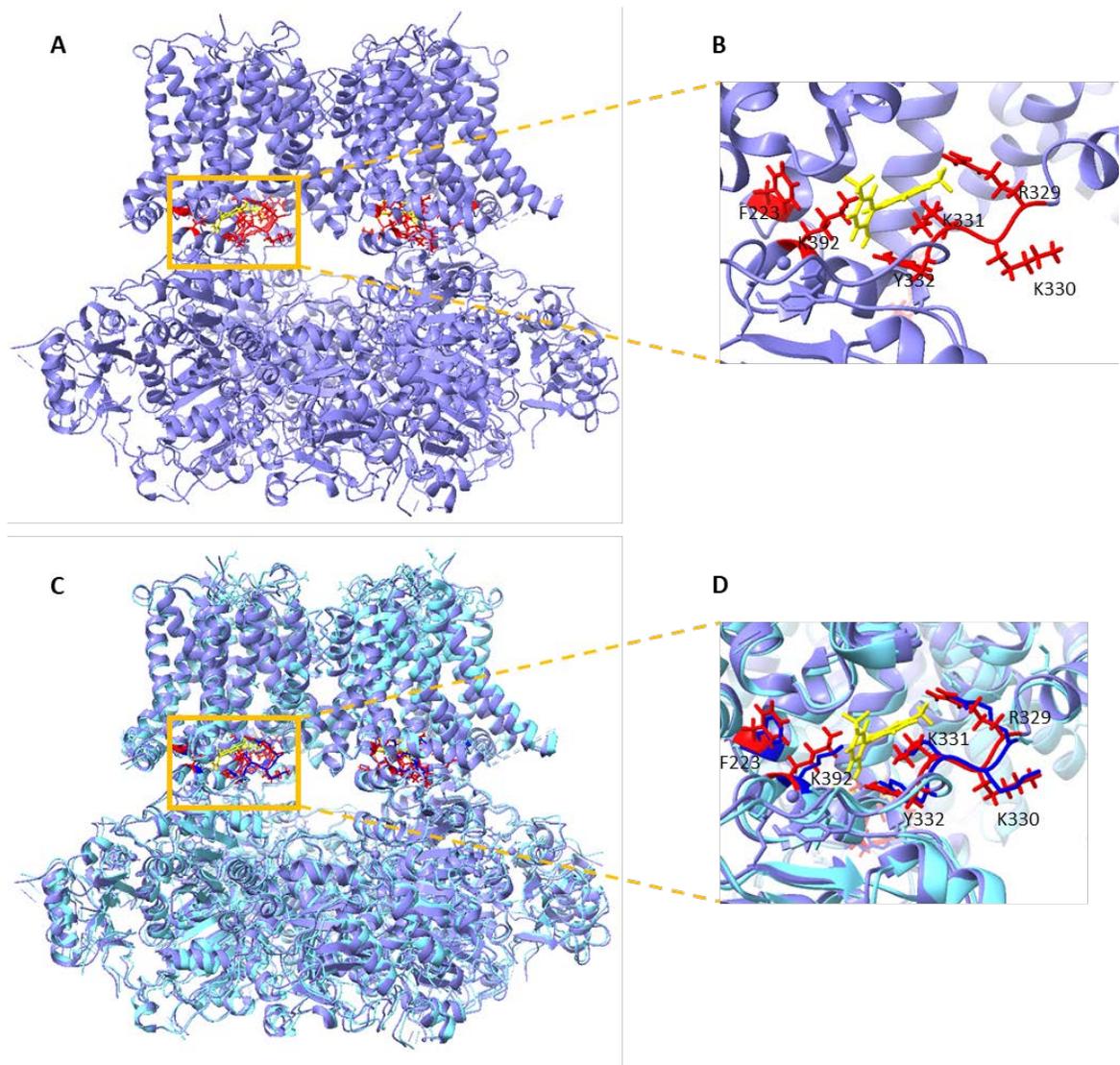


Figura 17. Modelo molecular del canal BK en presencia de NS1619. A) se muestra el modelo molecular obtenido a partir de la densidad coulombica mostrada en la Figura 16 A, se resaltan en rojo los aminoácidos del sitio de unión propuesto para el NS1619 (se muestra en amarillo). B) Zoom al sitio de unión propuesto. C) En azul claro se muestra el modelo molecular obtenido por Tao y Mackinnon 2019, en azul oscuro se resaltan los aminoácidos propuesto para el sitio de unión del NS1619 (amarillo), en morado se muestra el mismo modelo que en A con los aminoácidos del sitio de unión resaltados en rojo. D) Zoom al sitio de unión propuesto.

DISCUSIÓN

Mecanismo de activación del canal BK por el NS1619

El canal BK desempeña funciones fundamentales en la fisiología celular y es esencial para la regulación de diversos procesos fisiológicos, incluyendo la excitabilidad neuronal, la contracción muscular y la liberación de hormonas (Kshatri et al., 2018). Las investigaciones de los activadores del canal BK han revelado la diversidad de mecanismos de acción y la especificidad de diversos compuestos en la modulación de la actividad de los canales BK, lo que es crucial en procesos como la repolarización y relajación del músculo liso, la modulación de la excitabilidad neuronal y la protección contra la excitotoxicidad. Dada su importancia en la función celular, comprender cómo los activadores del canal BK modulan su actividad es esencial para desarrollar terapias específicas y eficaces en el tratamiento de enfermedades asociadas con disfunciones en este canal, como la hipertensión, la enfermedad de Alzheimer y el dolor neuropático. Además, el estudio de los activadores del canal BK ha contribuido a la identificación de nuevos blancos terapéuticos y a la generación de herramientas experimentales útiles para el análisis de la función y la fisiología de estos canales en diferentes sistemas celulares y modelos animales.

Particularmente nosotros centramos nuestra investigación en el NS1619, el activador del BK más utilizado y una diana terapéutica prometedora. Se ha demostrado que el NS1619 es capaz de relajar las células del músculo liso, especialmente en los vasos sanguíneos. La activación de los canales BK por NS1619 conduce a la hiperpolarización de la membrana celular, lo que resulta en una disminución de la entrada de calcio y, en consecuencia, en la relajación del músculo liso. Esto sugiere un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades vasculares, como la hipertensión. Por otro lado, también posee un efecto neuroprotector- Estudios en modelos

animales han mostrado que el NS1619 puede tener efectos neuroprotectores en condiciones como la isquemia cerebral y la excitotoxicidad. La activación de los canales BK por NS1619 en las neuronas puede contribuir a la protección neuronal al regular la excitabilidad y prevenir la sobrecarga de calcio intracelular recalándose la importancia de conocer como este activador actúa sobre el canal BK en aras de poder finalmente ser aplicado todo el potencial terapéutico que posee.

El modelo alostérico Horrigan y Aldrich (Horrigan & Aldrich, 2002), presupone tres grandes módulos que se comunican entre sí para controlar la activación del canal BK. Estos módulos son el dominio del poro (PD), el dominio sensor de potencial (VSD) y el dominio citoplasmático (CTD), donde se encuentran los sensores de Ca^{2+} . La naturaleza modular del canal ofrece una amplia gama de posibilidades para su la regulación. La unión de iones calcio afecta directamente la probabilidad de apertura del canal BK (Horrigan y Aldrich, 2002). Además, mutaciones que alteran la sensibilidad del sensor de voltaje al potencial de membrana pueden disminuir la P_o (Horrigan et al., 1999). Asimismo, mutaciones en la región del poro del canal BK pueden reducir la conductancia del canal y la P_o (Du et al., 2020). Además, la naturaleza alostérica del canal permite que cambios en un dominio afecten a otro. Haciendo notar aquí que el canal puede ser modulado de distintas maneras por la interacción con uno o más módulos a la vez.

Tanto estudios previos como nuestros resultados actuales (Figura 15) indican que el efecto de NS1619 es independiente del VSD y del CTD (Gessner et al., 2012). Al ver las corrientes macroscópicas en ausencia y presencia del NS1619 se hace evidente que las corrientes de cola se tornan más lentas (Figura 8A). Al aplicar protocolos de activación y desactivación encontramos que la constante de tiempo a potenciales negativos es mayor en presencia del activador, lo que quiere decir, que la constante de rapidez de desactivación se hace menor (Figura 8B). Este resultado explica el enlentecimiento de la cinética de desactivación en presencia del activador, y sustenta nuestra hipótesis de que el mecanismo de activación del BK por parte del NS1619 involucra el PD, estando el equilibrio entre el estado abierto y cerrado desplazado hacia el estado abierto.

Nuestra hipótesis se valida con los resultados de pendiente límite (Figura 7) donde se observa claramente un incremento en L_0 en presencia del activador ($4 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-7}$ en ausencia y $2 \times 10^5 \pm 1 \times 10^{-6}$ en presencia de $30 \mu\text{M}$ NS1619). Nuestros resultados sugieren que el incremento en la constante de equilibrio L puede explicarse a consecuencia de una disminución en la constante de rapidez de la desactivación. Resultados similares fueron reportados por Rockman et al. 2020 al evaluar el efecto del NS11021 en el canal BK (Rockman et al., 2020), quien demuestran que en presencia del NS11021 la cinética de desactivación de canal a -200mV se ralentiza 10 veces en comparación con la ausencia del activador en cuestión. Por otro lado, cuando el sensor de potencial está en reposo, la presencia del NS11021 aumenta la probabilidad de apertura (Rockman et al., 2020) lo cual apoya la hipótesis de que el fármaco desplaza principalmente el equilibrio de cerrado-abierto hacia el estado abierto.

El ajuste del modelo alostérico de Horrigan y Aldrich a los datos indica que el NS1619 modula tanto la constante de equilibrio L como el factor alostérico D , reduciendo el acoplamiento entre el sensor de potencial y el poro. La disminución del acoplamiento puede explicarse desde el punto de vista de la curva P_o vs V a potenciales límites. A potenciales negativos donde todos los sensores de potencial están en reposo, $D=1$ por lo que el equilibrio entre el cerrado y el abierto solo está descrito por la constante de equilibrio L . Por otro lado, al otro extremo de la curva, D alcanza su valor máximo D^4 , así que la diferencia entre las asíntotas del gráfico P_o vs V puede tomarse como D^4 . Esta diferencia efectivamente es menor en presencia del NS1619 (Figura 7), apoyando la idea de una disminución del acoplamiento alostérico entre el dominio del poro y el dominio sensor de potencial. Recientemente Sun y Horrigan reportaron que la F223 es parte del grupo de aminoácidos que conforman la palanca de compuerta "gating lever", y al mutar esta fenilalanina por alanina observan que disminuye D en comparación con el canal del tipo silvestre (Sun & Horrigan, 2022). Esto está de acuerdo con nuestros resultados, donde la F223 es parte importante en la interacción del NS1619 con el canal BK, y sugiere que el NS1619 podría activar el canal al promover la estabilización del estado abierto por una acción de la palanca de la compuerta.

El hecho de que NS1619 sea un modulador de la constante de equilibrio L y el factor alostérico D puede ser beneficioso en condiciones fisiológicas en las que se requiere la modulación de la actividad del canal BK. Al modificar estos parámetros, NS1619 puede aumentar la apertura del canal BK, lo que podría tener efectos positivos en ciertas condiciones patológicas. Los canales BK están involucrados en la regulación del tono vascular, la excitabilidad neuronal y la función muscular, entre otros procesos fisiológicos (Bentzen et al., 2014). Por lo tanto, la capacidad de modificar la función del canal BK podría tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, trastornos neurológicos, la epilepsia, y enfermedades musculares (tipo distrofia muscular). El NS1619 podría ser un candidato prometedor para el desarrollo de fármacos destinados a tratar enfermedades y trastornos en los que la modulación de la función del canal BK es deseable. Su capacidad para actuar específicamente sobre la constante de equilibrio L y el factor alostérico D, sin afectar los dominios sensor de potencial y de calcio, podría ofrecer una ventaja en términos de selectividad y reducción de efectos secundarios no deseados.

En el proyecto que dio origen a esta investigación (Du et al., 2020) estuvimos trabajando con una mutante del filtro de selectividad del canal BK de un paciente con ataxia cerebelosa, mientras realizamos la caracterización biofísica del canal encontramos que el activador NS1619 no activa a esta mutante, surgiendo inmediatamente dos interrogantes: Cómo actúa el NS1619 sobre el canal BK y por qué no activa a la mutante en cuestión. Con base en los resultados de esta tesis donde proponemos que el NS1619 es un modulador de la constante de equilibrio L y el factor alostérico D, podemos postular una posible explicación para la ausencia de efecto del activador sobre la mutante G354S. Precisamente al estar esta mutante en la región del poro, es posible que altere la conformación del dominio del poro o la dinámica alostérica del canal, lo que a su vez afectaría la capacidad de NS1619 para modular L. Esta falta de activación en el canal mutante sugiere que la interacción de NS1619 con el canal BK es altamente sensible a los cambios en la estructura del poro, especialmente en la región del filtro de selectividad.

El sitio de unión del NS1619 en el canal BK

En este estudio, investigamos el sitio de unión del activador NS1619 en el canal BK utilizando técnicas de docking molecular y patch-clamp en la configuración inside-out. El docking molecular se realizó tanto en las estructuras abiertas como cerradas del canal BK, y en ambos casos, se identificaron los mismos aminoácidos como posibles participantes en el sitio de unión: F223, R329, K330, K331, Y332 y K392 (Figura 9). Para investigar el papel de estos aminoácidos en la interacción con NS1619, realizamos un escáner de alanina y evaluamos las curvas de conductancia versus voltaje para cada una de las mutantes de alanina y el canal BK de tipo salvaje (wt) en presencia y ausencia de una concentración saturante de NS1619 (Figura 11).

Nuestros resultados demuestran que la presencia de NS1619 saturante en el canal BK wt producen un corrimiento hacia la izquierda en la curva corriente-voltaje de 36 mV. Al analizar las mutantes de alanina, encontramos efectos variables en la activación del canal en presencia de NS1619. La mutante F223A mostró una disminución a la mitad en la activación en comparación con el wt, sugiriendo la importancia de este residuo en la interacción con NS1619. La mutante K330A perdió completamente el efecto de activación, implicando a K330 como parte esencial en la interacción de NS1619 con el canal BK. La mutante R329A disminuye el efecto en 25mV y K331A no presentó diferencia en comparación con el wt, mientras que la mutante K392A exhibió una activación mayor (46mV).

Para explorar aún más la importancia de estos residuos en la interacción con NS1619, se realizaron mutaciones adicionales donde se neutralizó la carga o se facilitaron interacciones como puentes de hidrógeno. En todos los casos fuimos capaces de modular el efecto, observándose una mayor activación que en el wt en todos los aminoácidos evaluados (Figura 13), excepto en la mutante K330N, que no mostró ningún efecto de activación en presencia de NS1619. Estos resultados no solo apoyan la idea de que efectivamente estos aminoácidos interactúan con el NS1619, sino que también subrayan la importancia de K330 en tal interacción.

Finalmente, los resultados de criomicroscopía electrónica nos confirman el sitio de unión propuesto

con base a cálculos de docking. En la Figura 16 se observa la densidad coulombica del canal BK humano, purificado en detergente en presencia de calcio y con condiciones saturantes del NS1619. La densidad posee resoluciones que van desde 2.5 Å a 5.5 Å, y es precisamente la diferencia de resoluciones lo que nos ayudó a sustentar la idea de la densidad que corresponde al activador se corresponde a lo propuesto por el Docking y fue validado por electrofisiología. Una densidad coulombica como la que se muestra en la Figura 16 es el resultado del promedio de muchas películas, cada una con su respectivo ruido asociado, que fueron alineadas para formar un modelo 2D del que posteriormente surge el modelo 3D que se muestra en la Figura 16. Las zonas que más se repiten en dichas películas tendrán mejor resolución mientras que el ruido será de baja resolución porque a pesar de que cada película tendrá un ruido asociado no será exactamente el mismo para cada una, por lo que no arrojará un buen alineamiento y por ende una buena resolución. Si vemos la Figura 16 (panel A) podemos observar alrededor de la proteína densidades de color rojo correspondiente al mencionado ruido. Por otro lado, si observamos con detenimiento hay una densidad extra que no es parte del canal y que por la resolución que presenta no puede ser ruido (Figura 16, panel B, C). Al comparar con la densidad obtenida por Tao y Mackinnon la densidad en cuestión no está presente en esta última (Figura 16, panel D), lo que aunado al hecho que la densidad está en la vecindad del sitio propuesto por docking y que validamos por electrofisiología, no puede ser más que el NS1619.

Al comparar los resultados de crio-EM con los obtenidos a partir del docking molecular (Figura 18) observamos que efectivamente aminoácidos que fueron propuestos a partir del docking son parte del sitio de unión del NS1619 en el canal BK, como es el caso de la K392 y la Y332. Por otro lado, encontramos que aminoácidos de gran importancia en la interacción del activador con el canal, según lo indicado por los resultados electrofisiológicos y también reportados por el docking, como la F223 y la K330 se encuentran en la vecindad, pero no propiamente en el sitio de unión indicado por los resultados de criomicroscopía. Lo que podría significar que estos

aminoácidos son parte importante del camino alostérico entre el sitio de unión del NS1619 y el PD del BK participando en el acoplamiento y no en la unión directamente. Siguiendo este mismo criterio, la K331 y R329 también formarían parte de dicho camino alostérico.

Los resultados obtenidos en la primera sección de este trabajo sugieren que el NS1619 modula la constante de equilibrio L y el factor alostérico D en el modelo alostérico del canal BK, sin afectar directamente al dominio sensor de potencial ni al dominio sensor de calcio. Es interesante observar que F223, aminoácido que sería parte del camino alostérico entre el sitio de unión del NS1619 y el PD, está ubicado en el dominio sensor de potencial. La ubicación de F223 en el dominio sensor de potencial podría ser responsable de la modulación del acoplamiento alostérico D por parte del activador NS1619. Una posible explicación de este fenómeno es que el NS1619 estabilice la palanca de compuerta propuesta por Sun y Horrigan recientemente (Sun & Horrigan, 2022). Alternativamente, la interacción de NS1619 con F223 podría inducir cambios conformacionales en el dominio sensor de potencial, lo que a su vez afectaría la transición entre estados conformacionales en el canal. Estos cambios podrían alterar el acoplamiento entre el dominio sensor de potencial y otras regiones funcionales del canal, como el dominio del poro, influyendo así en la modulación alostérica.

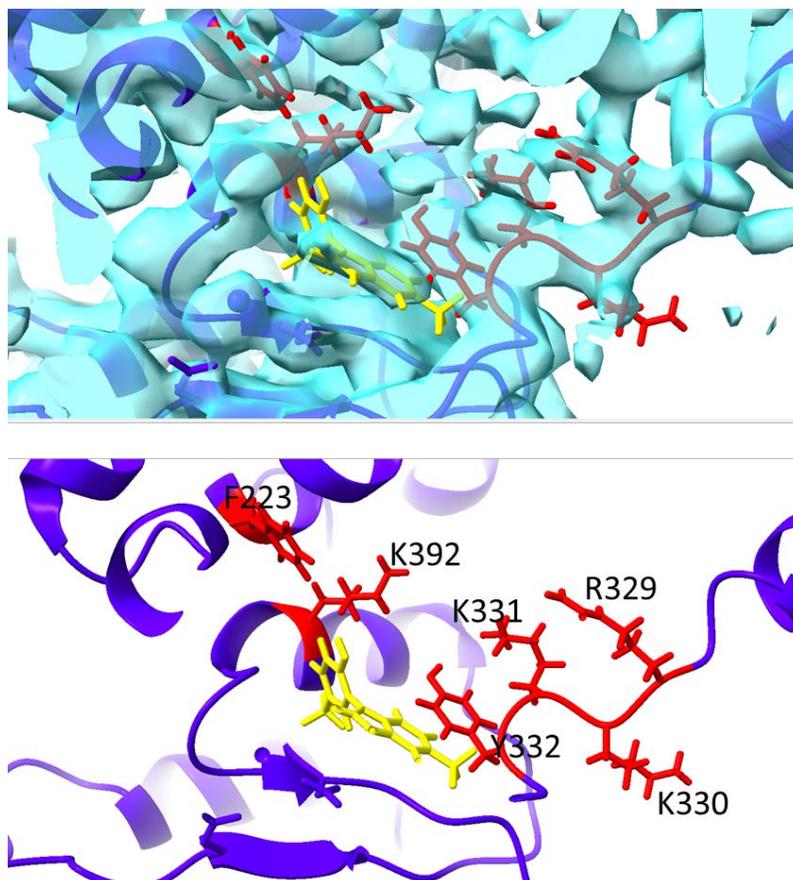


Figura 18. Aminoácidos del sitio de unión del NS1619 en el canal BK. En el panel superior se muestra en azul la densidad coulombica que obtuvimos en presencia del NS1619, en morado el modelo molecular realizado a partir de la mencionada densidad, se resaltan en rojo los aminoácidos propuestos por el docking molecular y en amarillo el NS1619 ubicado según la densidad correspondiente. En el panel inferior se muestran los mismos datos sin la densidad coulombica para facilitar la visualización, nótese que los aminoácidos K392 y Y332 son parte del sitio de unión del NS1619 en el canal BK.

La interacción del NS1619 con los residuos básicos R329, K330, K331 y K392 podría estabilizar una conformación que favorece la apertura del canal a partir de un mecanismo similar al llamado "pies en la puerta", facilitando la transición entre estados conformacionales y modificando la constante de equilibrio L . En resumen, dada su ubicación, los aminoácidos R329, K330, K331, Y332 y K392 podrían estar involucrados con la modulación de la constante de equilibrio L . Aunque

es plausible que la interacción entre F223 y NS1619 juegue un papel crucial en la modulación del factor alostérico D, se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis y entender en detalle cómo estas interacciones modulan la función del canal BK.

Finalmente, dado que no se observan mayor diferencia entre nuestro modelo molecular con el obtenido por Tao y Mackinnon (Figura 17), proponemos que los cambios conformacionales inducidos por la interacción de NS1619 con los residuos del canal BK son sutiles y no se detecten fácilmente al comparar las estructuras del canal en presencia y ausencia del activador, como efectivamente podemos ver en la Figura 17. Los cambios conformacionales no siempre son drásticos y pueden involucrar pequeños ajustes en la posición o la orientación de los aminoácidos que participan en la interacción. Esto estaría de acuerdo con la aparente sutileza en la energética de estabilización del estado abierto vía NS1619. También podría ser que los cambios conformacionales son dinámicos y transitorios, lo que dificulta su visualización en una estructura cristalográfica estática. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la unión de un modulador como NS1619 no necesariamente tiene que causar un cambio conformacional visible en la estructura global del canal para ejercer su efecto. Los cambios locales en la interacción entre residuos de aminoácidos o en la dinámica de la proteína podrían ser suficientes para alterar la función del canal y modificar la constante de equilibrio L y el factor alostérico D. Por lo tanto, aunque no se observan diferencias significativas en las estructuras del canal BK en presencia y ausencia de NS1619, esto no descarta la posibilidad de que existan cambios conformacionales sutiles o dinámicos que contribuyan a la modulación de la función del canal por el activador.

CONCLUSIONES

En este estudio, hemos investigado el mecanismo de activación del canal BK por parte del NS1619 y proporcionado evidencia sólida que sugiere que el NS1619 modula tanto la constante de equilibrio L como el factor alostérico D, afectando así el equilibrio cerrado-abierto y la cinética de desactivación del canal. Nuestros resultados apuntan a que el NS1619 actúa principalmente en el dominio del poro (PD) del canal BK, sin afectar los dominios sensor de potencial (VSD) y citoplasmático (CTD).

La capacidad del NS1619 para modular específicamente la constante de equilibrio L y el factor alostérico D podría tener aplicaciones terapéuticas en enfermedades y trastornos en los que la modulación de la función del canal BK es deseable, como enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos y enfermedades musculares. Además, la selectividad del NS1619 hacia el dominio del poro y su falta de interacción con los dominios VSD y CTD podría ofrecer ventajas en términos de reducción de efectos secundarios no deseados y una mayor especificidad de acción.

Nuestra investigación establece, explícitamente la naturaleza de la interacción entre el activador NS1619 y el canal BK, identificando los residuos Y332 y K392 como participantes putativos en el sitio de unión del NS1619 y a los aminoácidos F223, R329, K330, K331 como parte del camino alostérico entre el sitio de unión y el PD. Aunque la criomicroscopía electrónica no reveló cambios drásticos en la estructura del canal BK en presencia de NS1619, esto no descarta la posibilidad de que existan diferencias a nivel local en la interacción entre residuos de aminoácidos o en la dinámica de la proteína que podrían ser suficientes para alterar la función del canal y modificar la constante de equilibrio L y el factor alostérico D.

Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones que exploren más a fondo la relación entre la unión de NS1619 y la modulación de la función del canal BK, así como el diseño de

nuevos compuestos que interactúen con el sitio de unión propuesto y modulen la función del canal de manera más específica y eficiente. Estos avances podrían conducir al desarrollo de nuevas terapias farmacológicas basadas en la modulación del canal BK para tratar una amplia gama de enfermedades y trastornos en los que la función del canal BK está implicada.

BIBLIOGRAFIA

1. Akerman S, Holland PR, Lasalandra MP, Goadsby PJ. 2010. Inhibition of trigeminovascular dural nociceptive afferents by Ca²⁺ activated K [MaxiK/BK(Ca)] channel opening. *Pain* 151: 128–136.
2. Alvarez O., Gonzalez C. and Latorre R. 2002. Counting channels: a tutorial guide on ion channel fluctuation analysis. doi.org/10.1152/advan.00006.2002.
3. Armstrong C. and Bezanilla F. 1977. Inactivation of the Sodium Channel H. Gating Current Experiments II. VOLUME 70, 1977 • pages 567-590.
4. Attali, B.; Romey, G.; Honoré, E.; Schmid-Alliana, A.; Lagrutta, A.; Shen, K.Z.; North, R.A.; Adelman, J.P. J. Lazdunski, M. J. 1992. Cloning, Functional Expression, and Regulation of Two K⁺ Channels in Human T Lymphocytes *Biol. Chem* , 267, 8650-8657.
5. Bentzen, B. H., Olesen, S. P., Rønn, L. C. B., & Grunnet, M. (2014). BK channel activators and their therapeutic perspectives. *Frontiers in Physiology*, 5(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00389>
6. Brelidze TI, Niu X, Magleby KL. 2003. A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9017–9022. DOI:10.1073/pnas.1532257100.
7. Budelli G, Geng Y, Butler A, Magleby KL, Salkoff L. 2013. Properties of Slo1 K⁺ channels with and without the gating ring. *PNAS* 110:16657–16662. DOI:10.1073/pnas.1313433110.
8. Candia S, Garcia ML, Latorre R. 1992. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca²⁺ activated K channel. *Biophys J* 63: 583–590.

9. Carrasquel-Ursulaez, W., Segura, I., Díaz-Franulic, I., Echeverría, F., Lorenzo-Ceballos, Y., Espinoza, N., et al. (2022). Mechanism of voltage sensing in Ca²⁺- and voltage-activated K⁺ (BK) channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(25), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2204620119>
10. Coiret G, Borowiec AS, Mariot P, Ouadid-Ahidouch H, Matifat F. 2007. The antiestrogen tamoxifen activates BK channels and stimulates proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 71: 843–851.
11. Colquhoun, D., Hawkes, A. 1981. On the Stochastic properties of Single ion Channels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 211: 2205-235.
12. Colquhoun, D., Hawkes, A. 1995. The Principles of the Stochastic interpretation of Ion Channel Mechanism. Págs. 406-491 en: Sakmann, B., Neher, E. (eds.). *Single Channel Recording*. Segunda Edición. Springer, New York, USA.
13. Colwell CS. 2006. BK channels and circadian output. *Nat Neurosci* 9: 985–986.
14. Contreras G., Castillo K., Enrique N., Carrasquel-Ursulaez W., Castillo JP., Milesi V., Neely A., Alvarez O., Ferreira G., Gonzalez C., and Latorre R. 2013 A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology. <http://dx.doi.org/10.4161/chan.26242>.
15. Cosconati S., Forli S., Perryman A., Harris R., Goodsell D. and Olson AJ. 2010. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. doi:10.1517/17460441.2010.484460.
16. Cui J, Cox DH, Aldrich RW. 1997. Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca²⁺ activated K channels. *J Gen Physiol* 109: 647–673.
17. Dai, H., Wang, M., Patel, P. N., Kalogeris, T., Liu, Y., Durante, W., et al. (2017). Preconditioning with the BKCa channel activator NS-1619 prevents ischemiareperfusion-induced inflammation and mucosal barrier dysfunction: Roles for ROS and heme oxygenase-1. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 313(5), H988–H999. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00620.2016>
18. Denson DD, Wang X, Worrell RT, Eaton DC. 2000. Effects of fatty acids on BK channels in GH3 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1211–C1219.

19. Dopico AM, Bukiya AN, Jaggar JH. 2018. Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 470:1271–1289. DOI:10.1007/s00424-018-2151-y.
20. Du, X., Carvalho-De-Souza, J. L., Wei, C., Carrasquel-Ursulaez, W., Lorenzo, Y., Gonzalez, N., et al. (2020). Loss-of-function BK channel mutation causes impaired mitochondria and progressive cerebellar ataxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(11), 6023–6034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920008117>
21. El-Hachem N., Haibe-Kains B, Athar Khalil A., Kobeissy K, and Nemer G. 2017. AutoDock and AutoDockTools for Protein-Ligand Docking: Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1(BACE1) as a Case Study. DOI 10.1007/978-1-4939-6952-4_20.
22. Fersht A., Leatherbarrow R., and Wells T. 1986. Quantitative analysis of structure activity relationships in engineered proteins by linear free energy relationships. DOI [10.1038/322284a0](https://doi.org/10.1038/322284a0).
23. Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. 1990. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265: 11083–11090.
24. Gárdos G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *BBA - Biochim Biophys Acta* 30:653–654. DOI:10.1016/0006-3002(58)90124-0.
25. Geng Y., Deng Z., Zhang G., Budelli G., Butler A., Yuan P., Cui J., Salkoff L. and Magleby KL. 2020. Coupling of Ca²⁺ and voltage activation in BK channels through the α B helix/voltage sensor interface. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1908183117.
26. Gessner, G., Cui, Y. M., Otani, Y., Ohwada, T., Soom, M., Hoshi, T., et al. (2012). Molecular mechanism of pharmacological activation of BK channels. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 109(9), 3552–3557.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1114321109>

27. Goehring, A., Lee, C. H., Wang, K. H., Michel, J. C., Claxton, D. P., Bacongus, I., et al. (2014). Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Nature Protocols*, 9(11), 2574–2585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.173>
28. Gonzalez-Corrochano R, La Fuente J, Cuevas P, Fernandez A, Chen M, Saenz de Tejada I, Angulo J. 2013. Ca²⁺-activated K⁺ channel (KCa) stimulation improves relaxant capacity of PDE5 inhibitors in human penile arteries and recovers the reduced efficacy of PDE5 inhibition in diabetic erectile dysfunction. *Br J Pharmacol* 169: 449–461.
29. Granados S., Castillo K., Bravo-Moraga F., Sepúlveda R, Carrasquel-Ursulaez W., Rojas M., Carmona E., Lorenzo-Ceballos Y., González-Nilo F, González C., Latorre R. & Torres Y. 2019. The molecular nature of the 17β-Estradiol binding site in the voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel β1 subunit. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45942-1>
30. Grosman C., Zhou M. and Auerbach A. 2000. Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating. *Nature* volume 403, pages 773–776.
31. 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. *Pflugers. Arch.* 391:85-100.
32. Haug T, Olcese R, Toro L, Stefani E. Olcese R. 2004. Regulation of K⁺ flow by a ring of negative charges in the outer pore of BKCa channels. Part I: Aspartate 292 modulates K⁺ conduction by external surface charge effect. DOI: [10.1085/jgp.200308949](https://doi.org/10.1085/jgp.200308949)
33. Haug T, Olcese R, Toro L, Stefani E. Olcese R. 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. *J Gen Physiol* 124:185–197.

34. Heinemann, S. H., & Conti, F. (1992). Nonstationary Noise Analysis and Application to Patch Clamp Recordings. *Methods in Enzymology*, 207(1976), 131–148.
35. Hermann A, Erxleben C. 1987. Charybdotoxin selectively blocks small Ca-activated K channels in *Aplysia* neurons. *J Gen Physiol* 90: 27–47.
36. Hite RK, Tao X, MacKinnon R. 2017. Structural basis for gating the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Nature* 000:52–57. DOI:10.1038/nature20775
37. Holtzclaw JD, Grimm PR, Sansom SC. 2011. Role of BK channels in hypertension and potassium secretion. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20: 512–517.
38. Horrigan FT, Aldrich RW. 1999. Allosteric voltage gating of potassium channels II. Mslo channel gating charge movement in the absence of Ca²⁺. *J Gen Physiol* 114:305–336. DOI:10.1085/jgp.114.2.305
39. 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>
40. Hoshi T, Tian Y, Xu R, Heinemann SH, Hou S. 2013. Mechanism of the modulation of BK potassium channel complexes with different auxiliary subunit compositions by the omega-3 fatty acid DHA. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 4822–4827.
41. Hoshi T. and Heinemann S.H. 2016. Modulation of BK Channels by Small Endogenous Molecules and Pharmaceutical Channel Openers. *International Review of Neurobiology*, Volume 128 ISSN 0074-7742.
42. Hu H, Shao LR, Chavoshy S, Gu N, Trieb M, Behrens R, Laake P, Pongs O, Knaus HG, Ottersen OP, Storm JF. 2001. Presynaptic Ca²⁺ activated K channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci* 21: 9585–9597.
43. Huang CW, Huang CC, Wu SN. 2007. Activation by zonisamide, a newer antiepileptic drug, of large-conductance calcium-activated potassium channel in differentiated hippocampal neuron-derived H19-7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 98–106.

44. Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, Mackinnon R. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel 515–522.
45. Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2001. Structure of the RCK domain from the *E. coli* K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* 29:593–601. DOI:10.1016/S0896-6273(01)00236-7
46. Kimm T, Khaliq ZM, Bean BP. 2015. Differential Regulation of Action Potential Shape and Burst-Frequency Firing by BK and Kv2 Channels in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. *J Neurosci* 35:16404–16417. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5291-14.2015
47. Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LM, Sanchez M, Giangiacomo K, Reuben JP, Smith AB 3rd. 1994. Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 33: 5819–5828.
48. Krnjević K, Lisiewicz A. 1972. Injections of calcium ions into spinal motoneurons. *J Physiol* 225:363–390. DOI:10.1113/jphysiol.1972.sp009945
49. Kun A, Matchkov VV, Stankevicius E, Nardi A, Hughes AD, Kirkeby HJ, Demnitz J, Simonsen U. 2009. NS11021, a novel opener of large-conductance Ca₂⁺-activated K₊ channels, enhances erectile responses in rats. *Br J Pharmacol* 158: 1465–1476.
50. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., & Ferrin, T. E. (1982). *A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions*.
51. La Fuente JM, Fernandez A, Cuevas P, Gonzalez-Corrochano R, Chen MX, Angulo J. 2014. Stimulation of large-conductance calcium-activated potassium channels inhibits neurogenic contraction of human bladder from patients with urinary symptoms and reverses acetic acid-induced bladder hyperactivity in rats. *Eur J Pharmacol* 735: 68–76.
52. Latorre R, Castillo K, Carrasquel-Ursulaez W, Sepulveda R V., Gonzalez-Nilo F, Gonzalez C, Alvarez O. 2017. Molecular Determinants of BK Channel Functional Diversity and Functioning. *Physiol Rev* 97:39–87. DOI:10.1152/physrev.00001.2016

53. Latorre R, Miller C. 1983. Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol* 71:11–30. DOI:10.1007/BF01870671
54. Latorre R, Morera FJ, Zaelzer C. 2010. Allosteric interactions and the modular nature of the voltage- and Ca²⁺ activated (BK) channel. *J Physiol* 588: 3141–3148.
55. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:805–809. DOI:10.1073/pnas.79.3.805
56. Latorre R., Oberhauser A., Labarca P, and Alvarez O. 1989. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 1989.51:385-399.
57. Liu X, Chang Y, Reinhart PH, Sontheimer H, Chang Y. 2002. Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J Neurosci* 22: 1840–1849.
58. Liefller 1953. Parameters for the Description of Transition States. DOI:10.1126/science.117.3039.340
59. Lu R, Lukowski R, Sausbier M, Zhang DD, Sisignano M, Schuh CD, Kuner R, Ruth P, Geisslinger G, Schmidtko A. 2014. BKCa channels expressed in sensory neurons modulate inflammatory pain in mice. *Pain* 155: 556–565.
60. Ma Z, Lou XJ, Horrigan FT. 2006. Role of Charged Residues in the S1–S4 Voltage Sensor of BK Channels. *J Gen Physiol* 127:309–328. DOI:10.1085/jgp.
61. Marty A. 1981. Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291:497–500. DOI:10.1038/291497a0
62. Marty A. 1983. Ca²⁺-dependent K⁺ channels with large unitary conductance. *Trends Neurosci* 6:262–265. DOI:10.1016/0166-2236(83)90115-7
63. McManus OB, Harris GH, Giangiacomo KM, Feigenbaum P, Reuben JP, Addy ME, Burka JF, Kaczorowski GJ, Garcia ML. 1993. An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry* 32: 6128–6133.

64. Meech RW. 1978. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. *Ann Rev Biophys Bioeng* 7:1–18. DOI:10.1146/annurev.bb.07.060178.000245
65. Meera P., Wallner M., Jiang Z. and Toro L. 1996. A calcium switch for the functional coupling between a (hslo) and 13 subunits (Kr, ca) of maxi K channels. *FEES Letters* 382 (1996) 84--88
66. Meredith AL, Wiler SW, Miller BH, Takahashi JS, Fodor AA, Ruby NF, Aldrich RW. 2006. BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nat Neurosci* 9: 1041–1049.
67. Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺ activated K channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313: 316–318.
68. Nausch B., Rode F., Jorgensen S., Nardi A., Korsgaard M., Hougaard C., Bonev A., Brown W., Dyhring T., Strobæk D., Olesen SP., Christophersen P., Grunnet M., Nelson M. and Rønn L. 2014. NS19504: A Novel BK Channel Activator with Relaxing Effect on Bladder Smooth Muscle Spontaneous Phasic Contractions. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.113.212662>.
69. Nimigean CM, Chappie JS, Miller C. 2003. Electrostatic tuning of ion conductance in potassium channels. *Biochemistry* 42:9263–9268. DOI:10.1021/bi0348720
70. Niu X, Qian X, Magleby KL. 2004. Linker-gating ring complex as passive spring and Ca²⁺-dependent machine for a voltage- and Ca²⁺-activated potassium channel. *Neuron* 42:745–756.
71. Olesen SP, Munch E, Wätjen F, Drejer J 1994b. DOI: [10.1097/00001756-199404000-00037](https://doi.org/10.1097/00001756-199404000-00037) PMID: 7520298
72. Olesen SP, Munch E, Moldt P, Drejer J. 1994a. Selective activation of Ca²⁺ dependent K channels by novel benzimidazolone. *Eur J Pharmacol* 251: 53–59.

73. Orio, P., & Latorre, R. (2005). Differential effects of β 1 and β 2 subunits on BK channel activity. *Journal of General Physiology*, 125(4), 395–411. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409236>
74. Pallotta BS, Magleby KL, Barrett JN. 1981. Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K^{+} currents in rat muscle cell culture. *Nature* 293:471–474. DOI:10.1038/293471a0
75. Pallotta BS. 1985. N-bromoacetamide removes a calcium-dependent component of channel opening from calcium-activated potassium channels in rat skeletal muscle. *J Gen Physiol* 86: 601–611.
76. Pantazis A, Gudzenko V, Savalli N, Sigg D, Olcese R. 2010. Operation of the voltage sensor of a human voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Proc Natl Acad Sci* 107:4459–4464. DOI:10.1073/pnas.0911959107
77. Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
78. Raddatz, N., Castillo, J. P., Gonzalez, C., Alvarez, O., & Latorre, R. (2014). Temperature and voltage coupling to channel opening in transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8). *Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35438–35454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612713>
79. Revermann M, Neofitidou S, Kirschning T, Schloss M, Brandes RP, Hofstetter C. 2014. Inhalation of the BK(Ca)-opener NS1619 attenuates right ventricular pressure and improves oxygenation in the rat monocrotaline model of pulmonary hypertension. *PLoS One* 9: e86636.
80. Rockman, M. E., Vouga, A. G., & Rothberg, B. S. (2020). Molecular mechanism of BK channel activation by the smooth muscle relaxant NS11021. *Journal of General Physiology*, 152(6). <https://doi.org/10.1085/jgp.201912506>
81. Schreiber M, Salkoff L. 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J* 73:1355–1363. DOI:10.1016/S0006-3495(97)78168-2

82. Shi J, Cui J. 2001. Intracellular Mg²⁺ Enhances the Function of BK-type Ca²⁺ -activated K⁺ Channels. *J Gen Physiol* 118:589–605. DOI:10.1085/jgp.118.5.589
83. Stefani E, Ottolia M, Noceti F, Olcese R, Wallner M, Latorre R. 1997. Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺ sensitive K⁺ channel (hslo). *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5427–5431.
84. Sun, L., & Horrigan, F. T. (2022). A gating lever and molecular logic gate that couple voltage and calcium sensor activation to opening in BK potassium channels. 1–20.
85. 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>
86. Vandael DH, Marcantoni A, Mahapatra S, Caro A, Ruth P, Zuccotti A, Knipper M, Carbone E. 2010. Cav1.3 and BK channels for timing and regulating cell firing. *Mol Neurobiol* 42:185–198. DOI:10.1007/s12035-010-8151-3
87. Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., & Vivas-Reyes, R. (2013). Autodock–PM6 method to choose the better pose in molecular docking studies. *Revista Colombiana de Quimica*, 42(1), 1–8.
88. Vergara C, Moczydlowski E, Latorre R. 1984. Conduction, Blockade and Gating in a Ca²⁺ activated K Channel Incorporated into Planar Lipid Bilayers. *Biophys J* 45: 73–76.
89. Villarroel A, Alvarez O, Oberhauser A, Latorre R. 1988. Probing a Ca²⁺ activated K channel with quaternary ammonium ions. *Pflügers Arch* 413: 118–126.
90. Williams, S. E., Brazier, S. P., Baban, N., Telezhkin, V., Muller, C. T., Riccardi, D., et al. 2008. A structural motif in the C-terminal tail of slo1 confers carbon monoxide sensitivity to human BKCa channels. *Pflügers Archiv*, 456, 561–572.
91. Yang F., Xiao X., Lee B., Vu S., Yang W., Yarov-Yarovoy W. and Zheng J. 2018. The conformational wave in capsaicin activation of transient receptor potential vanilloid 1 ion channel. DOI: 10.1038/s41467-018-05339-6

92. Yang H, Shi J, Zhang G, Yang J, Delaloye K, Cui J. 2008a. Activation of Slo1 BK channels by Mg²⁺ coordinated between the voltage sensor and RCK1 domains. *Nat Struct Mol Biol* 15:1152–1159. DOI:10.1038/nsmb.1507
93. Ye S, Li Y, Chen L, Jiang Y. 2006. Crystal Structures of a Ligand-free MthK Gating Ring: Insights into the Ligand Gating Mechanism of K⁺ Channels. *Cell* 126:1161–1173. DOI:10.1016/j.cell.2006.08.029.