

**MODULACION DE LOS SENSORES DE VOLTAJE DEL CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR
CALCIO MEDIADA POR SUBUNIDADES BETA**

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

Gustavo Felipe Contreras Cáceres

Octubre, 2013

Dirigida por: Alan Neely

Co-Dirigida por: Ramón Latorre de la Cruz.

**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:

GUSTAVO FELIPE CONTRERAS CACERES

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 30 del Mes de Septiembre de 2013

Director de Tesis:

Dr. Alan Neely.

Co-Director de Tesis:

Dr. Ramón Latorre.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. David Naranjo.

Dr. Francisco Bezanilla.

Dr. Patricio Orio.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi familia en especial a mis padres Malvina y Víctor, y a mis hermanas Barbará y Elizabeth por su cariño y comprensión.

A mi compañera Alejandra por apoyarme y motivarme.

A mi tutor el Dr. Alan Neely quién me invitó a participar y me ha guiado desde entonces en el quehacer científico. Además participó en este trabajo como un compañero dedicando su tiempo completo a este trabajo.

Al mentor de nuestro grupo Dr. Ramón Latorre quién me encomendó este trabajo y me ha apoyado y guiado. Todos los premios y oportunidades que he obtenido desde entonces son un reconocimiento al privilegio de estar bajo su tutela.

A mi *coach* el Dr. Carlos González quién me heredo su proyecto y me ha motivado para conseguir todos los logros que este trabajo ha obtenido. Este trabajo no sería posible sin la participación de Carlos.

Al Dr. Osvaldo Álvarez quién apoyo este trabajo en el desarrollo las bases teóricas que permitieron explicar mis resultados.

Al equipo técnico que apoyo este y todos los trabajos del laboratorio: Victoria Prado, Luisa Soto y Nieves Navarro. Además aquellos que se fueron Katherine Stack y Eddy Rosenman.

A todos mis compañeros del laboratorio *Galvani* con quienes pase grandes momentos durante este periodo. Me gustaría agradecer especialmente a Karen Castillo y Willy Carrasquel, quienes han aportado de forma significativa a este trabajo.

Finalmente agradezco a las instituciones que financiaron mis estudios, estadías y viajes durante el desarrollo de esta tesis: **CONICYT (Beca de doctorado-21090331, Beca de realización de tesis doctoral-AT24110157 y beca asistencia a eventos y cursos cortos para estudiantes de doctorado- 81120405) MECESUP** (Beca para realización de estadías en el extranjero) **The Biophysical Society** (International Travel Grants).

CONTENIDO

RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Antecedentes generales de los canales BK	1
1.2.- Estructura de canales BK	2
1.2.1.- Dominio Sensor de Calcio	3
1.2.2.- Dominio del poro.....	6
1.2.3.- Dominio Sensor de Voltaje	8
1.3.- Mecanismos de <i>gating</i>	11
1.3.1.- Modelo Alostérico	11
1.3.2.- Restricciones cinéticas en canales BK.....	13
1.3.3.- Modelo de activación HA	15
1.3.4.- Interacciones Alostéricas entre dominios funcionales.....	24
1.4.- Modulación por subunidades β	26
1.4.1.- Modulación por $\beta 1$	28
1.4.2.- Modulación por $\beta 2$	29
1.4.3.- Modulación por $\beta 3$	30
1.4.4.- Modulación por $\beta 4$	30
1.4.5.- Mecanismos alostérico de la regulación por subunidades β	31
1.4.6.- Mecanismos físico-químicos de la regulación por subunidades β	32
MATERIALES Y METODOS.....	38
2.1.- Biología Molecular	38

2.1.1.- Bacterias	38
2.1.2.- Obtención y purificación de plásmidos de DNA	39
2.1.3.- Característica del clon utilizado	39
2.1.4.- Transcripción in vitro	40
2.2.- Animales de experimentación y microinyección	41
2.2.1.- Preparación de Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	41
2.2.2.- Expresión heteróloga de canales en ovocitos de X. laevis	42
2.3.- Electrofisiología	43
2.3.1.- Técnica de “ <i>patch-clamp</i> ”	43
2.3.2.- Adquisición y análisis	45
RESULTADOS	51
3.1.- Caracterización de las <i>gating currents</i> en la presencia de subunidades β	51
3.2.- Movimiento de carga lenta en canales BK.	60
3.3.- Modelo alostérico de tres pisos.	65
3.4.- determinantes estructurales de interacción α - β	71
DISCUSION	77
4.1.- Efecto de la subunidad β 1 sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2}	77
4.2.- Efecto de la subunidad β 2 sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2}	78
4.3.- Efecto de la subunidad β 3b sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2}	79
4.4.- Efecto de la subunidad β 4 sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2}	80
4.5.- Efecto de las subunidades β sobre la cinética de apertura	81
4.6.- Determinantes estructurales de la interacción β -VSD.	82

4.7.- Posible mecanismo de molecular de interacción de α - β 84

BIBLIOGRAFÍA 88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Características estructurales de los canales BK.....	3
Figura 2.- Estructura del dominio sensor de Ca^{+2}	5
Figura 3.- Estructura del dominio del poro.....	7
Figura 4.- Residuos cargados del dominio sensor de voltaje.....	10
Figura 5.- Parámetros que describen I_K en ausencia de Ca^{+2}	17
Figura 6.- Comparación de modelos secuencial y alostérico.....	18
Figura 7.- Relaciones energéticas entre dominios funcionales según el modelo HA.....	23
Figura 8.- Estructura primaria de las distintas subunidades β	26
Figura 9.- Ubicaciones de subunidad β , con respecto a α	32
Figura 10.- Esquema del sistema de registro para "Patch-clamp".....	43
Figura 11.- Protocolos de voltaje.....	45
Figura 12.- Sustracción de componentes lineales.....	46
Figura 13.- Desplazamiento en el eje de voltaje aplicado registros $G(V)$	48
Figura 14.- Corrientes I_K e I_g registradas del mismo macro parche.....	52
Figura 15.- Corrientes I_K e I_g de canales $(\alpha)BK$ $(\alpha/\beta_x)BK$	54
Figura 16.- Comparación entre Q_{ON} y Q_{OFF} evocadas por pulsos de voltaje de 1 ms.....	55
Figura 17.- Relaciones de carga-voltaje para canales $(\alpha)BK$ y $(\alpha/\beta_x)BK$	56
Figura 18.- decaimiento exponencial de I_{gON}	57
Figura 19.- Cinética de la compuerta de carga.....	59
Figura 20.- familia representativa de registros de I_{gOFF}	61
Figura 21.- Cinética del componente de carga lento.....	63
Figura 22.- Ajuste global de $(\alpha)BK$ y $(\alpha/\beta_1)BK$ al modelo alostérico.....	66
Figura 23.- Modelo alostérico de tres pisos.....	67
Figura 24.- Simulación y ajuste de resultados al modelo alostérico de tres pisos.....	68
Figura 25.- Esquema de construcción de las quimeras de β_1 - β_2 y β_1 - β_3	71

Figura 26.- Familia representativa de I_g registrada al co-expresión de quimeras $\beta 1$ - $\beta 2$ IR.	72
Figura 27.- Comparación del efecto de las quimeras $\beta 1$ - $\beta 2$ IR en la relación $Q(V)$	73
Figura 28.- Familia de I_g registrada al co-expresión de quimeras $\beta 1$ - $\beta 3b$	75
Figura 29.- Comparación del efecto de las quimeras $\beta 1$ - $\beta 3b$ en la relación $Q(V)$	76
Figura 30.- Los cambios en z_j y V_h explican la sensibilidad al Ca^{+2} en canales $(\alpha/\beta 4)$ BK.	80
Figura 31.- Comparación del efecto de las quimeras de dominios intracelulares $\beta 1$ - $\beta 3b$ en la relación $Q(V)$	85
Figura 32.- mecanismo hipotético de interacción α - β	86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema I	12
Esquema II	13
Esquema III	15
Esquema IV.....	16
Esquema V.....	19
Esquema VI.....	19
Esquema VII.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido.
A	amperes.
Å	Amstrong, 10^{-10} m.
α, β	constantes de rapidez hacia adelante y hacia atrás de la transición $R \leftrightarrow A$.
BK	Canal de potasio activado por calcio de gran conductancia.
COOVG	“Cut-open oocyte vaseline gap”.
C,O	configuración abierta y cerrada del canal.
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.
$[Ca^{+2}]_i$	Concentración interna de Ca^{+2} .
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
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.
Δt	retardo que precede la relajación exponencial de I_K .
δ, γ	constantes de rapidez hacia adelante y hacia atrás de la transición $C \leftrightarrow O$.
e	Carga elemental, 1.602×10^{-9} coulomb.
E	factor alostérico que describe el acoplamiento energético entre sensores de voltaje y la unión de Ca^{+2} .
g_K	conductancia de potasio.
HEPES	Ácido (N-2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano sulfónico.
HP	Potencial de mantención.
I_K	corriente macroscópica de potasio.
$I_{K(Ca)}$	corriente macroscópica de potasio dependiente de Ca^{+2} .
I_g	corrientes de compuerta.
I_{gON}, I_{gOFF}	componente de activación (ON) y desactivación (OFF) de la corriente de compuerta.

J	constante de equilibrio de la reacción R-A.
J_0, z_j	el valor de J a cero voltaje y la carga parcial.
K_D	constante de disociación de Ca^{+2} .
K	constante de equilibrio para la unión de Ca^{+2} ($K = [Ca^{+2}]/K_D$).
KMES	2-(N-morfolino)etanosulfonato de potasio.
L	constante de equilibrio de la reacción closed-open.
L_0, z_L	Valor de L a cero voltaje y su carga parcial.
MWC	Monod-Wyman-Changeux.
M	mol/litro de solución.
mV	Milivolt, 10^{-3} volt.
mRNA	RNA mensajero.
pB	pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Po	Probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto.
Q	Carga eléctrica.
Q_P	carga de compuerta desplazada por un pulso de voltaje.
Q_{fast}, Q_{slow}	componente rápido y lento del movimiento de carga.
Q_{ss}	carga de compuerta en estado estacionario.
Q_C, Q_O	carga de compuerta desplazada en estados cerrados ($C \leftrightarrow C$) y abiertos ($O \leftrightarrow O$).
RNA	Ácido Ribonucleico.
s	Segundo.
n	nano.
p	pico.
T	Temperatura absoluta (medida en grados Kelvin).
$\tau_{gfast}, \tau_{gslow}$	constante de tiempo del componente rápido y lento de la carga de <i>gating</i> .
$\tau[I_k]$	constante de tiempo de la relajación de I_k luego de un retardo.
V	Volt.

$V_h(P_O)$	Potencial al que se encuentra el 50% de los canales en estado abierto.
$V_h(J)$	Potencial al que se encuentra el 50% de los sensores de voltaje en estado activo.
Z	Carga equivalente aparente.
δ	fracción del campo eléctrico.
μm	Micrómetro, 10^{-6} metro.
μM	Micromolar, 10^{-6} molar.
τ	Constante de tiempo.
$\Delta\Delta G^*$	Diferencia de energía libre para la activación.
$\Delta\Delta G_o$	Diferencia de energía libre para el paso del estado de reposo de los sensores al estado activado.

RESUMEN

Los canales de potasio activados por voltaje y Ca^{2+} de alta conductancia (BK) son tetrámeros compuestos por cuatro subunidades (α). Cada subunidad α contiene siete segmentos transmembranales (S0-S6) y al menos tres módulos funcionales separados: (i) el dominio del poro; (ii) el dominio sensor de voltaje (VSD); y (iii) el sensor de calcio. Los canales BK se pueden activar de forma independiente por despolarización de la membrana o por un aumento del Ca^{2+} intracelular. La subunidad α puede formar complejos con subunidades moduladoras β . En particular, la presencia de la subunidad $\beta 1$ modula varios aspectos de la actividad del canal, incluyendo la sensibilidad aparente a $[\text{Ca}^{+2}]$, la velocidad de activación y desactivación. En esta tesis, a través de mediciones de las corrientes de compuerta y utilizando parches gigante de membrana de ovocitos de *Xenopus* en configuración parche escindido “*inside-out*”, se exploró el efecto de subunidades β sobre el dominio sensor de voltaje del canal BK. Cuando comparamos corrientes de compuerta de canales (α)BK con canales ($\alpha/\beta 1$)BK, se aprecia un desplazamiento de -70 mV hacia la izquierda de la curva carga de compuerta vs. voltaje ($Q(V)$) en estos últimos. Un cambio apreciable hacia la izquierda de la curva $Q(V)$ (-40 mV), se encontró también en canales ($\alpha/\beta 2\text{IR}$)BK. En los canales ($\alpha/\beta 3\text{b}$)BK y ($\alpha/\beta 4$)BK no se observaron cambios significativos en la curva $Q(V)$, comparado con canales formados por la subunidad α sola. Para identificar los determinantes moleculares de la subunidad β que participan en la modulación el sensor de voltaje de la subunidad α , construimos quimeras en que se intercambiaron los segmentos transmembranales, los terminales NH_2 -y COOH , y el lazo extracelular entre las subunidades $\beta 1$ - $\beta 2$ y $\beta 1$ - $\beta 3\text{b}$. Nuestros resultados muestran que $\beta 1$ y $\beta 2\text{IR}$ estabilizan la configuración activada del sensor de potencial y que sus dominios citoplasmáticos y el lazo extracelular de la subunidad β son necesarios para provocar dicho efecto.

ABSTRACT

The large conductance Ca^{2+} and voltage-activated Potassium channels (BK) are tetramers composed of four subunits (α). Each α subunit contains seven transmembrane segments (S0-S6) and at least three separate functional modules: (i) the pore domain, (ii) the voltage sensing domain (VSD), and (iii) calcium sensor. BK channels can be activated independently by membrane depolarization or an increase in intracellular Ca^{2+} . The α subunit can form complexes with β modulatory subunits. In particular, the presence of the $\beta 1$ subunit modulates many aspects of channel activity, including the apparent sensitivity to $[\text{Ca}^{2+}]$, the rate of activation and deactivation. In this thesis by measuring gating currents using giant membrane patches of *Xenopus* oocytes in "inside-out" excised patches, we explored the effect of β subunits on the voltage sensor domain of the BK channel. When comparing gating currents from (α)BK and ($\alpha/\beta 1$) BK channels, we find a -70 mV shift to the left of charge movement vs voltage curves ($Q(V)$). A significant shift to the left of the $Q(V)$ curve (-40 mV) was also observed in ($\alpha/\beta 2\text{IR}$) BK channels. In ($\alpha/\beta 3\text{b}$) and BK ($\alpha/\beta 4$) BK channels no significant changes were observed on the curve $Q(V)$, compared to channels formed by the α subunit alone. To identify the molecular determinants which confer to β the ability to modulate the voltage sensor of the α subunit, chimeras were constructed by exchanging the transmembrane segments, NH_2 - and COOH -terminus and the extracellular loop between $\beta 1$ - $\beta 2$ and $\beta 1$ - $\beta 3\text{b}$ subunits. Our results show that $\beta 1$ and $\beta 2\text{IR}$ stabilize the active configuration of the voltage sensor and that their intracellular domains and the extracellular loop are necessary to cause this effect.

INTRODUCCIÓN

1.1.- Antecedentes generales de los canales BK

La mayoría de los procesos celulares se caracterizan por mantener un estado estacionario específico. Esta tendencia de las células de regular sus condiciones internas se denomina homeostasis (Cannon, 1929). Para realizar esta tarea el sistema requiere de mecanismos de realimentación negativa que permiten al sistema responder en dirección opuesta a la perturbación. En el caso específico de procesos fisiológicos, en los cuales la señal de interés es el potencial de membrana (V_M), las conductancias de K^+ pueden ejercer esta tarea debido a que el potencial de reversión del K^+ esta siempre cerca o bajo el potencial de reposo de las células excitables.

El rol del Ca^{+2} como modulador de conductancias de K^+ (g_K) fue reportado por primera vez por Gardos (1958), en estudios realizados en eritrocitos. La primera evidencia electrofisiológica acerca de canales K^+ (Ca), viene de estudios en neuronas de molusco, en los cuales al remover el Ca^{+2} externo se observó una disminución de las corrientes de K^+ dependientes de voltaje (I_K) (Meech, 1974). Para entonces ya era clara la existencia de corrientes de K^+ dependientes de Ca^{+2} ($I_{K(Ca)}$) distintas de las corrientes de K^+ encontradas por Hodgkin y Huxley (1952).

El canal de K^+ activado por Ca^{+2} de alta conductancia (BK) es finalmente descubierto mediante registros de canal único en células de musculo esquelético y cromafines (Marty, 1981; Pallotta y col., 1981) y por reconstitución del canal BK de células de musculo esquelético en bicapas (Latorre y col., 1982). Una característica relevante del canal es su conductancia, cercana a 200

pS (Latorre y Miller, 1983), mucho mayor que otros canales dependientes de voltaje selectivos a K^+ (Gutman y col., 2005). Este aspecto da origen al nombre del canal, BK del inglés *Big-K* (también se conoce como *Maxi-K* y *Slo1*). La activación del canal BK es otro aspecto destacado debido a que la apertura y cierre del canal están gobernados por aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) y/o por voltaje (Latorre y col., 1982). Esta naturaleza mixta determina que el canal BK sea un componente esencial en funciones celulares en que la excitabilidad eléctrica está ligada a las variaciones en la $[Ca^{+2}]_i$ tal como ocurre en el músculo liso (Nelson, 1993), el cerebro, músculo esquelético, corteza adrenal, células ciliadas cocleares, células de los islotes pancreáticos, riñón y epitelio del colon.

1.2.- Estructura de canales BK

El canal BK es codificado por el gen *Slo1* (KCNMA1), llamado así por haber sido clonado a partir del mutante de *Drosophila Slowpoke* (Atkinson y col., 1991; Adelman y col., 1992). El gen *Slo1* codifica la subunidad α . Esta forma homotetrámeros (Shen y col., 1994) que dan origen a un canal BK funcional. Cada subunidad α incluye los determinantes estructurales críticos a la función del canal: de permeación, de modulación por iones y del proceso de apertura y cierre del poro (desde ahora *gating*). La subunidad α tiene ~1100 aminoácidos, 2/3 de los cuales forman el carboxilo terminal orientado hacia el lado citoplasmático de la membrana (fig 1). Los cuatro C terminales forman una estructura conocida como "*gating ring*" que incluye sitios de unión a Ca^{+2} de alta afinidad (Schreiber y Salkoff, 1997). El resto de la proteína la constituyen segmentos helicoidales de transmembrana unidos por lazos intra y extracelulares. Los segmentos S1-S6 tienen una organización similar a los canales Kv, un dominio sensor de voltaje (VSD) formado por segmentos S1 a S4 y un dominio del poro (PD) formado por los segmentos S6 y S6 de cada subunidad α . La subunidad α del canal BK tienen además un séptimo segmento llamado S0, que determina que el amino terminal del canal BK esté en el espacio extracelular (fig 1; Wallner y col., 1996; Meera y col., 1997).

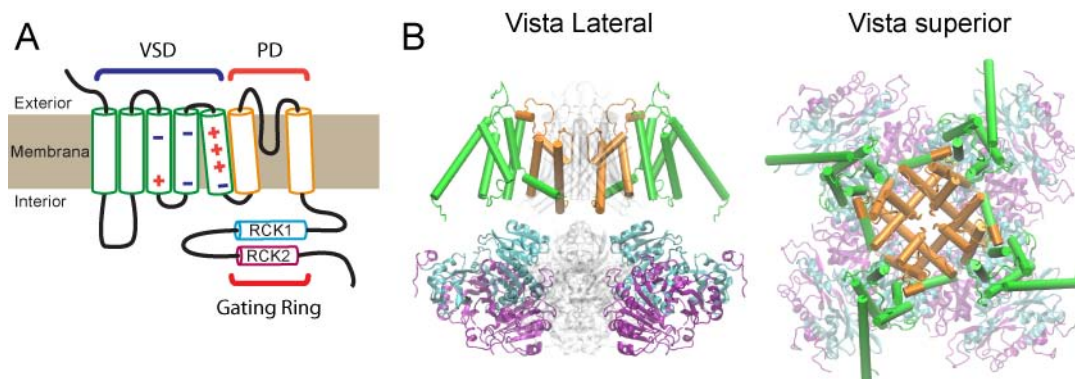


Figura 1.- Características estructurales de los canales BK.

A Topología de membrana predicha para canales BK. Brevemente la subunidad α formada por 7 segmentos de transmembrana con el terminal NH_2 hacia el lado extracelular. La subunidad se divide en tres dominios funcionales: el VSD formado por los segmentos S1-S4 además de S0 (verde); el PD formado por los segmentos S5-S6 (naranja) y el “gating ring” formado por el terminal COOH (RCK1/RCK2, cyan/magenta).

B Modelo molecular de un canal BK funcional, formado por cuatro subunidades α . El modelo de la subunidad α (implementado en el laboratorio del Dr. Danilo González, CBIB UNAB) se construyó por homología tomando como templado el canal Mthk (un canal de K^+ activado por Ca^{+2} de *Methanobacterium autotrophicum*, estructura PDB: 2AEJ resuelta por (Dong y col., 2005)). El “gating ring” corresponde a la estructura cristalográfica (PDB: 3NAF) resuelta por (Wu y col., 2010).

1.2.1.- Dominio Sensor de Calcio

La parte soluble de la subunidad α correspondiente al extremo carboxilo terminal de la proteína, está formada por dos dominios reguladores de conductancia de K^+ (RCK) en serie, RCK1 y RCK2. Cada RCK es capaz de unir Ca^{+2} en el rango micro molar 0,1-300 μM (Xia y col., 2002; Yusifov y col., 2008; Yusifov y col., 2010), lo que concuerda con la alta homología estructural observada entre los dominios RCK1 y RCK2 (Wu y col., 2010; Yuan y col., 2010; Yuan y col., 2012). Se han identificado tres sitios de unión a Ca^{+2} en el extremo COOH-terminal. El primero en ser descrito es un sitio de alta afinidad formado por cinco residuos aspartatos ubicados en el RCK2 que inicialmente fue llamado tazón de calcio ó “calcium bowl” (fig 2; Schreiber y Salkoff, 1997; Bian y col., 2001; Bao y col., 2002). La constante aparente de disociación de Ca^{+2} del “calcium bowl”, obtenida por registros electrofisiológicos, es de $\sim 3,1$ para el canal en estado

abierto (K_o) y $\sim 0,88 \mu\text{M}$ para el canal cerrado (K_c) (Sweet y Cox, 2008). El segundo sitio también de alta afinidad se ubica en el RCK1 y está formado por los aminoácidos: Asp367, Glu535, Arg514 y Met513 (Bao y col., 2002; Xia y col., 2002; Zeng y col., 2005; Yusifov y col., 2010). La constante aparente de disociación Ca^{2+} para este sitio es de $\sim 23 \mu\text{M}$ para el canal abierto y de $4.9 \mu\text{M}$ para el cerrado (Sweet y Cox, 2008). El tercer sitio es un sitio de baja afinidad que puede unir Ca^{+2} y Mg^{+2} en concentraciones 1-100 mM. En la formación de este sitio contribuyen residuos de RCK1 (Glu374 y Glu399), del lazo intracelular S0-S1 (Asp99) y del lazo intracelular S2-S3 (Asn172) (Shi y col., 2002; Xia y col., 2002; Yang y col., 2007). La estructura encargada de convertir la señal de Ca^{+2} en corriente de K^+ ó el “transductor de energía” sería una estructura en forma de anillos llamada “*gating ring*” formada por ocho dominios RCK, un par RCK1-RCK2 por cada subunidad α . Esta estructura posiblemente facilita la apertura de poro conductor a través del lazo RCK1-S6 (Niu y col., 2004). La transducción de energía ocurre porque la unión de Ca^{+2} en los dominios RCK provoca cambios en la forma del “*gating ring*” (fig 2 C-F; Yuan y col., 2010; Miranda y col., 2013). Se calcula que por cada ion Ca^{2+} la probabilidad de encontrar abierto el dominio del poro que aumenta $\sim 4,7$ veces y con todos los sitios activados este aumento alcanzaría ~ 487 veces ($4,7^4$) (Sweet y Cox, 2008).

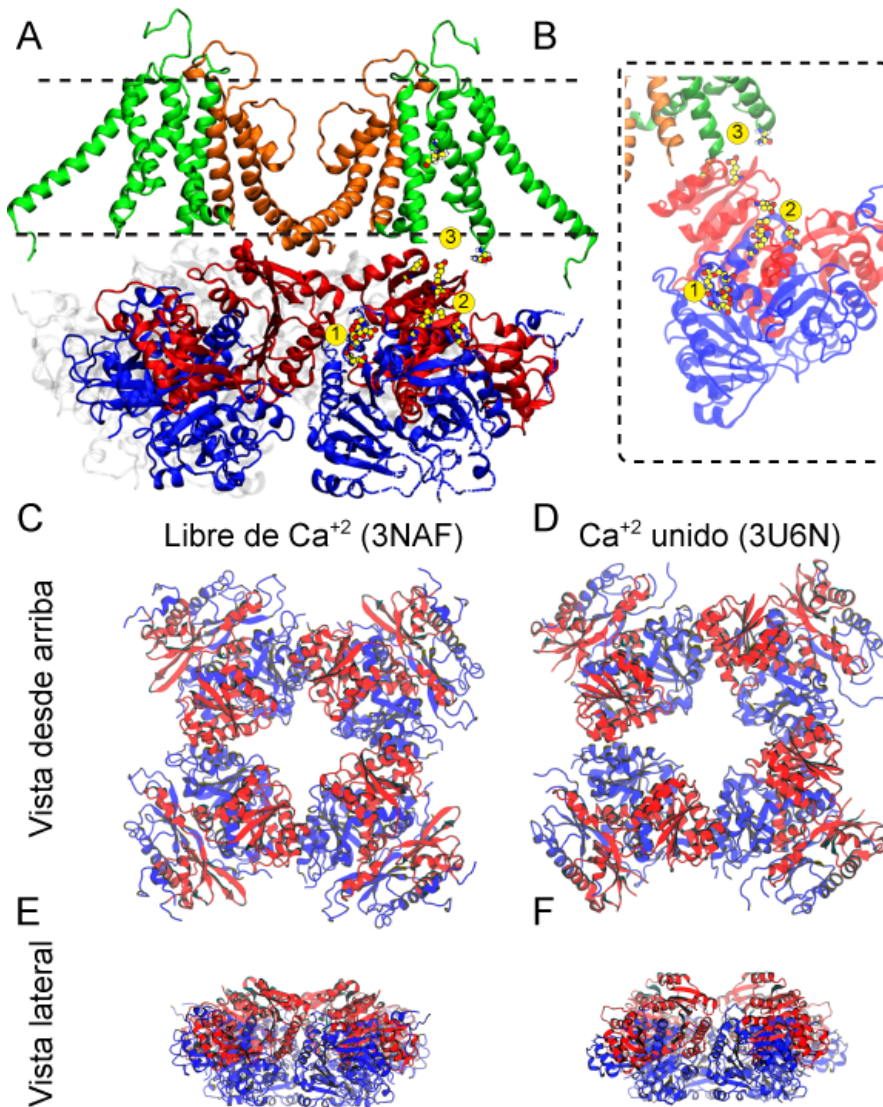


Figura 2.- Estructura del dominio sensor de Ca^{+2} .

A-B Modelo molecular de la subunidad α y el "gating ring" de BK humano (AP 3NAF), en el que se destacan con círculos amarillos numerados los tres sitios de unión a Ca^{+2} y los aminoácidos involucrados, estos son: 1 el "calcium bowl" en el RCK2; 2 el sitios de alta afinidad a Ca^{+2} en RCK1; 3 el sitio de unión a $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ en el RCK1.

C-F Una comparación entre estructuras atómicas del "gating ring" de BK humano (AP 3NAF) obtenidos sin Ca^{+2} nominal (pero sin tampón de Ca^{+2} ; Wu y col., 2010) y de BK de pez cebra cristalizado con Ca^{+2} (PDB 3U6N; Yuan y col., 2012).

1.2.2.- Dominio del poro

El dominio del poro del canal BK está formado por los segmentos S5-S6 que convergen en el centro de simetría de la proteína y forman un poro acuoso que permite el paso de los iones. Su arquitectura puede ser dividida desde el espacio extracelular hacia el intracelular en: vestíbulo externo, filtro de selectividad y vestíbulo interno. Debido a las similitudes con otros canales selectivos a K^+ , la comparación de este dominio con el de otros canales Kv es ineludible, con particular interés en los componentes moleculares que determinan la alta conductancia del canal BK. Es así como, el vestíbulo externo tiene un anillo de cargas negativas localizadas en las cercanías de la entrada externa del filtro de selectividad (Asp292), que incrementan el flujo hacia adentro de K^+ , a través de un efecto electroestático que permite acumular K^+ en el vestíbulo externo aumentando la tasa de entrada de iones al filtro de selectividad (Haug y col., 2004). El filtro de selectividad no presenta mayores diferencias con otros canales Kv y contiene la secuencia "GYGD" altamente conservada en canales selectivos a K^+ en la que los aminoácidos GYG son críticos para la conducción de K^+ (Heginbotham y col., 1992). Finalmente, el vestíbulo interno tiene un anillo de ocho cargas negativas localizadas en la base del segmento S6 (E321 y E324) que permiten doblar la corriente de salida respecto del mutante sin estas cargas, aparentemente por incremento en la concentración de K^+ en este vestíbulo (Brelidze y col., 2003; Nimigean y col., 2003; Carvacho y col., 2008).

Otra diferencia importante del dominio del poro de BK con el de los canales Kv es el tamaño del vestíbulo interno y la compuerta que controla el flujo de iones. Para estimar el tamaño del vestíbulo interno, se utilizaron compuesto bloqueadores de canales Kv (Miller, 1982). Cuando los canales BK son expuestos por el lado intracelular a compuestos amonios cuaternarios de gran tamaño como deciltriethylamonio (C10) o tetrabutylamonio (TBA) la cinética de bloqueo es más rápida (Li y Aldrich, 2004) que la encontrada para los mismos bloqueadores en los canales Kv (Choi y col., 1993). Estudios de accesibilidad realizados con canales BK con cisteínas introducidas en el vestíbulo interno, mostraron que residuos ubicados en lo profundo de la cavidad pueden reaccionar con agentes modificadores (thiol, MTS) sin impedir el paso de iones

por estos canales (Zhou y col., 2011). Utilizando la misma técnica se determinó que BK tiene una baja resistencia de entrada a la cavidad interior (Geng y col., 2011). Todos estos datos sugieren que el vestíbulo interno del canal BK es más grande que el de canales Kv.

Compuestos modificadores (thiol, MTS) y bloqueadores de gran tamaño (C10 y TBA) pueden ingresar al vestíbulo interno incluso cuando el canal está cerrado (Wilkins y Aldrich, 2006; Tang y col., 2009; Zhou y col., 2011) sugiriendo que la compuerta que controla el flujo de iones se encuentra por sobre el vestíbulo interno. Es más, se ha visto que la interacción entre estos bloqueadores y el canal depende del ion permeante, indicando que el estado del filtro afecta el sitio de unión de estos bloqueadores (Thompson y Begenisich, 2012). Esto ha llevado a plantear la hipótesis de que un mecanismo similar a la inactivación tipo-C subyace controla la apertura y cierre del canal BK.

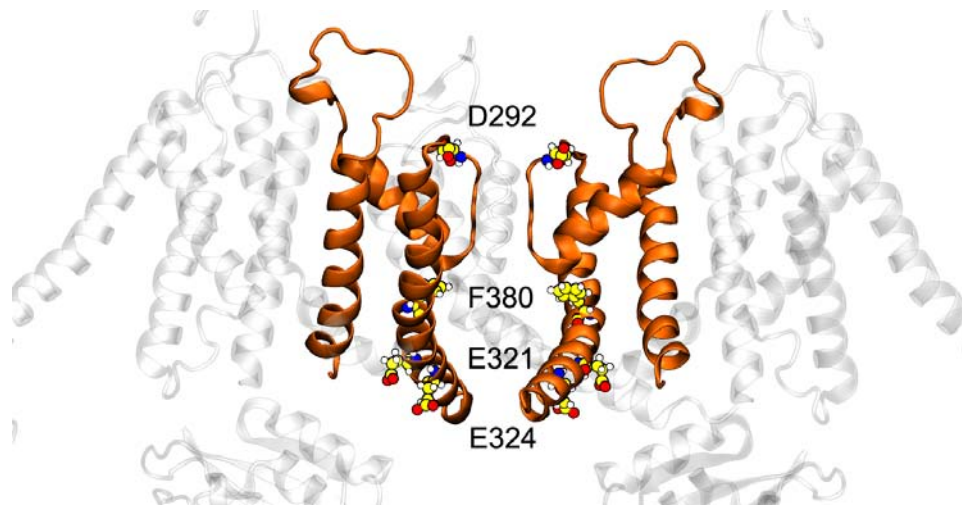


Figura 3.- Estructura del dominio del poro.

Modelo molecular de la subunidad α (implementado en el laboratorio del Dr. Danilo González, CBIB UNAB) construido por homología tomando como template el canal Mthk. En el modelo se destaca la estructura del poro formada por los segmentos S5-S6 y los distintos residuos implicados en la alta conductancia del canal: el anillo del vestíbulo externo formado por D292 (Haug y col., 2004), y el anillo del vestíbulo interno formado por E321 y E324 (Brelidze y col., 2003). Además se destaca el residuo F380 que ha sido postulado como compuerta de conducción del canal (Wu y col., 2009b).

1.2.3.- Dominio Sensor de Voltaje

El dominio sensor de voltaje del canal BK está formado los segmentos transmembranales S1-S4 y el segmento S0. Estos segmentos tienen residuos cargados distribuidos en el segmento S2 (R167 y D153), S3 (N186) y S4 (R207, R210, R213). Los residuos con cargas positivas del segmento S4 están separados por dos residuos hidrófobos, esta disposición es similar a la de otros canales sensibles a voltaje como canales de K^+ , Na^+ y Ca^{+2} .

Las primeras evidencias electrofisiológicas que sugieren que las cargas del VSD experimentan cambios de conformación durante la despolarización de la membrana fueron las mediciones de corrientes de compuerta o "*gating currents*" (Stefani y col., 1997). Las corrientes de compuerta (I_g) fueron medidas en ausencias de corrientes iones y restando la respuesta capacitiva de la membrana plasmática mediante un protocolo de sustracción de componentes lineales (Armstrong y Bezanilla, 1974). Las corriente resultantes, capacitivas, reflejan el movimiento de cargas del VSD que está embebido en la membrana plasmática. Esto implica que los VSD se distribuyen entre dos estados energéticos: el estado de reposo y el estado activo. La carga desplazada (Q) se obtiene integrando las I_g y al graficarlas en función del voltaje de membrana puede describirse usando una distribución de probabilidad de Boltzmann de dos estados:

$$Q(V) = \frac{Q_{MAX}}{1 + e^{\frac{-zF(V-V_H)}{RT}}} \quad (1)$$

Donde z es la dependencia de voltaje de la activación, V_h es el potencial al que se encuentra el 50% de los sensores de voltaje en estado activo, T es la temperatura absoluta (típicamente 295 K), F es la constante de Faraday y R es la constante universal de los gases. Las mediciones realizadas por Stefani y col. (1997) determinaron que a bajas $[Ca^{+2}]_i$, cada VSD desplaza una carga aparente de 0.6 cargas elementales (e_0) durante la activación y que el voltaje medio de activación es de 150 mV. El bajo número de cargas sensibles a voltaje encontrados en canales

BK contrasta con las $\sim 13 e_0$ por canal encontradas en las cuatro subunidades del *Shaker Kv* (Aggarwal y MacKinnon, 1996; Seoh y col., 1996; Schoppa y Sigworth, 1998). Esta diferencia se debe a que en canales K_v cuatro cargas del segmento S4 contribuyen a la sensibilidad a voltaje (Seoh y col., 1996), en tanto que en BK solo una de las cargas del segmento S4 (R213) aportaría a la dependencia de voltaje del *gating* (Diaz y col., 1998; Ma y col., 2006). De acuerdo a experimentos de mutagénesis, residuos de los segmentos S2 (D153, R167) y S3 (D186) también contribuirían de manera significativa al *gating* del canal indicando que la distribución de residuos sensibles a voltaje en VSD de BK difiere del de los canales K_v (Ma y col., 2006).

Para seguir cambios de conformación local durante el funcionamiento de la proteína y probar cambios de conformación en el VSD de canales BK se ha utilizado la técnica de fluorimetría bajo condiciones de voltaje controlado (VCF; Mannuzzu y col., 1996; Cha y Bezanilla, 1997). Introduciendo cisteínas en los extremos extracelulares de los segmentos S2 y S4, se mostró que los segmentos S2 y S4 experimentan cambios de conformación provocados por la reorganización de sus cargas sensibles a voltaje en respuesta a cambios en el campo eléctrico de membrana. Además ambos segmentos interactúan de forma recíproca y cooperativa, ya que la neutralización de cargas en un segmento afectan el movimiento del otro (Pantazis y col., 2010a). La relación de fluorescencia voltaje ($F(V)$) se ajusta a una función de Boltzmann de dos estados y la carga obtenida es similar a la obtenida de la curva $Q(V)$. También en experimentos de VCF, pero introduciendo apagadores (*quenchers*) de fluorescencia por colisión en otro segmentos para reportar los reordenamientos relativos entre segmentos con fluoróforo y extintores, se encontró que después de la despolarización, S4 diverge de S0, S1 y S2, mientras que S2 se aproxima a S1 (Pantazis y col., 2010b; Pantazis y Olcese, 2012). Estos resultados indican que la activación de los VSD está acompañada de cambios de conformación importantes.

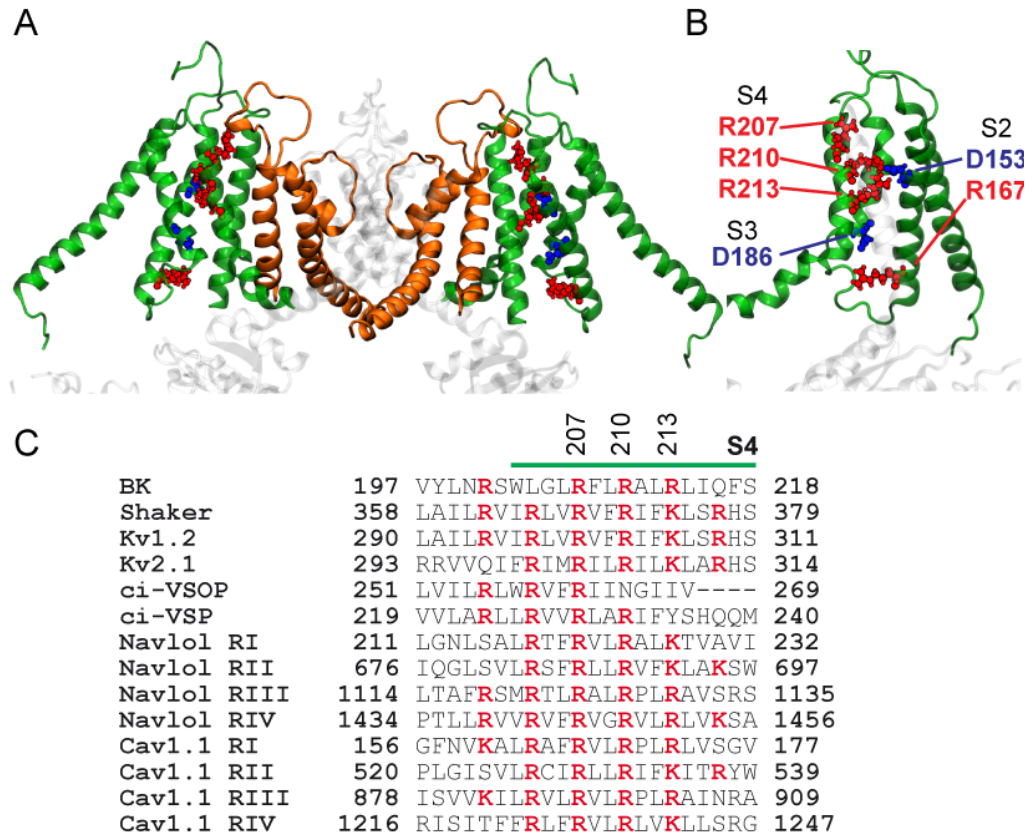


Figura 4.- Residuos cargados del dominio sensor de voltaje.

A-B utilizando el modelo por homología de la subunidad α del canal BK humano, se destacan los dominios sensores de voltaje en verde. Dentro de estos dominios, los residuos con carga positiva se colorearon con rojo y los con carga negativa en azul. De los residuos del segmento S4: R207, R210 y R213; solo el residuo R213 contribuye a la dependencia de voltaje del canal (Ma y col., 2006). **C** Alineamiento de segmentos S4 que incluye: BK (uniprot.org; N° de acceso Q12791), *Shaker* (P08510), Kv1.2 (P63142), Kv2.1 (P15387), ci-VSOP (Q1JV40), ci-VSP (Q4W8A1), Cav1.1 (O57483) y Navlol (Q25377).

1.3.- Mecanismos de “gating”

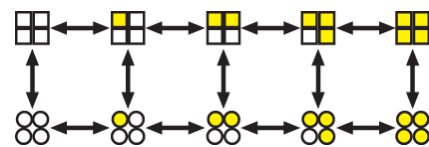
Determinar cuál es el mecanismo molecular por el cual dos estímulos independientes modulan el “gating” del canal BK, ha sido una de los principales desafíos a los investigadores desde que el canal fue descrito. Las primeras propuestas en esta materia, sugerían que la unión de Ca^{+2} por sí misma era voltaje dependiente (Moczydlowski y Latorre, 1983), este modelo predecía que el voltaje medio de activación (V_h) tendría una dependencia lineal con la $[\text{Ca}^{+2}]_i$. La evidencia experimental mostró que esto no era así (Meera y col., 1996). Para resolver esta pregunta fue necesario recurrir al modelo alostérico propuesto por Monod, Wyman y Jacob (Monod y col., 1965).

1.3.1.- Modelo Alostérico

El modelo alostérico es una construcción teórica que permite explicar el funcionamiento de proteínas altamente cooperativas. El desarrollo de este modelo tiene dos vertientes una estructural y otra farmacológica. El término alostérico (del griego: $\alpha\lambda\lambda\omicron\varsigma$ = otro, diferente; $\sigma\tau\epsilon\rho\epsilon\acute{o}\varsigma$ = sólido) fue introducido por Monod y Jacob (Monod y Jacob, 1961) para explicar la inhibición de la síntesis de un precursor del triptófano por triptófano que no es un análogo estérico del substrato. Los autores designan este mecanismo como “inhibición alostérica”. Por otro lado la hemoglobina, que es una proteína con estructura homotetrámerica, cuenta con múltiples sitios de unión a ligando. Cada subunidad existe en al menos dos conformaciones, cada una con una afinidad distinta por el ligando (Perutz, 1949). Estas propiedades de la hemoglobina fueron explicadas por Wyman y Allen (1951), postulando que la unión del ligando está acompañado por cambios concertados de estructura y afinidad por el ligando. En la misma década, esta idea aparece en estudios de receptores de acetilcolina en la placa neuromuscular. Del Castillo y Katz (1957) describen a los distintos derivados de la colina como agonistas parciales proponiendo un mecanismo de dos pasos: el primero de unión de ligando seguido del cambio de conformación de la proteína.

La hipótesis de Wyman y Allen (1951) fue retomada por Monod y col. (1963) quienes trabajaban en cooperatividad e inhibición retrograda de enzimas, como la inhibición por isoleucina de la treonina desaminasa que es la primera enzima en la vía de la síntesis de este amino ácido. Monod y col. (1963) señalan que la unión cooperativa del sustrato, y la modificación de la actividad enzimática por metabolitos que no tienen ninguna relación estereoquímica con el sustrato y producto, es posible en proteínas con dos o más estructuras en equilibrio, haciendo una clara alusión a proteínas oligoméricas como la hemoglobina. Monod y col. (1963) postularon que el mecanismo que subyace esta reacción es una “inhibición alostérica” y que es el resultado de un cambio de conformación (al que nombraron “transición alostérica”) inducido por la unión de un ligando. Finalmente concluyen que las transiciones alostéricas con frecuencia implican alteraciones en la estructura cuaternaria. El mecanismo es formalizado dos años después y es la base para entender el comportamiento de enzimas cooperativas (Monod y col., 1965). Se define como “efecto alostérico”: al cambio funcional que resulta de la interacción indirecta entre distintos sitios de unión específicos. Las principales características de un sistema alostérico definidas por Monod y col. (1965) son:

- 1) Las proteínas alostéricas son oligómeros con varios protómeros idénticos (entidad molecular identificable dentro de la proteína).
- 2) Los protómeros tienen al menos un sitio de alta afinidad para el ligando específico.
- 3) Las proteínas alostéricas tienen al menos dos estado conformacionales accesibles.
- 4) La afinidad de un protómero por su ligando correspondiente es alterada como resultado de cambios en la estructura de la proteína.
- 5) Cuando la proteína pasa de un estado a otro estado, su simetría molecular se conserva.



Esquema I

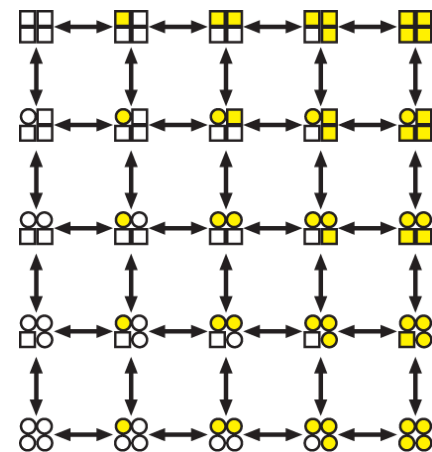
Estas características son descritas en el esquema I, definido para una proteína tetramérica formadas por

cuatro subunidades idénticas con un sitio de unión para un ligando específico (cuadro y círculo

blanco). La unión del ligando, representada como el cambio de blanco a amarillo, favorece el cambio de conformación cuaternario de la proteína que ocurre de manera concertada, y que en el esquema corresponde a transiciones verticales. De igual forma el cambio de conformación de la proteína afecta la afinidad de la proteína por el ligando.

La comparación de datos experimentales de saturación de hemoglobina y el modelo alostérico llevó a Koshland y col. (1966) a eliminar la restricción de que los cambios de conformación sean concertados. Eigen (1968) plantea la visión extendida del modelo MWC, resumida en el esquema II, donde a cada subunidad se le permite cambiar su estructura terciaria cuando un sustrato y de ese modo afecta actividad de las subunidades vecinas. Esta extensión del modelo incrementa el número de estados posibles. Como se espera que los cambios de conformación y la unión de ligando no ocurran simultáneamente, como ocurre en el receptor de nicotina (Del Castillo y Katz, 1957), no están consideradas transiciones diagonales que conecten distintos estados.

El canal BK encaja dentro de estas características. Por ejemplo el canal BK es un homotetrámero cuyo monómero (subunidad α) cuenta con tres protómeros que contribuyen al "gating" del canal. Sin embargo antes de definir un mecanismo de activación del canal BK en estos términos, es necesario revisar las restricciones que tiene el proceso.



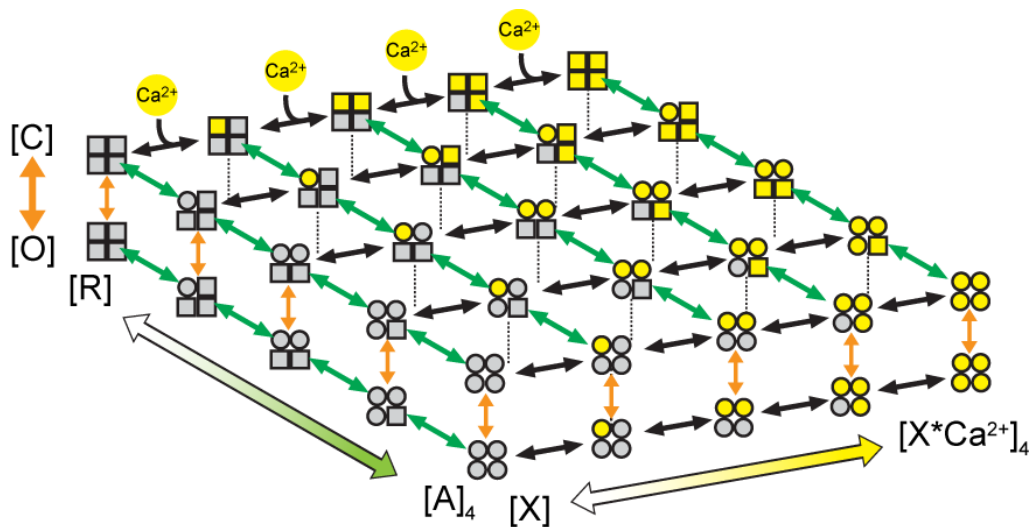
Esquema II

1.3.2.- Restricciones cinéticas en canales BK

Históricamente los primeros intentos de obtener un modelo cinético se realizaron en registros de canal único analizados por un modelo de Markov, que implica que la probabilidad de encontrar a un canal un estado determinado no depende de la actividad previa (Moczydlowski y Latorre, 1983; McManus y Magleby, 1989). El número mínimo de estados discretos de un modelo de

Markov se obtiene ajustando la distribución de duración de intervalos abiertos y cerrados del canal a una suma de funciones exponenciales (Colquhoun y Hawkes, 1981).

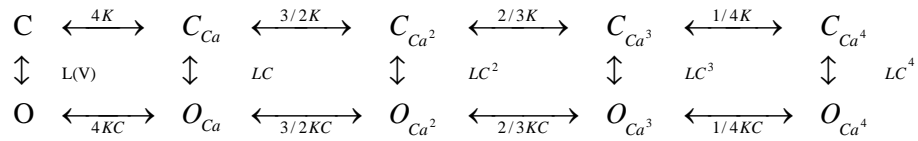
En ausencia de Ca^{+2} , el número estimado de estados cinéticos de BK es de 6-9, divididos en 2-3 estados abiertos y 4-5 cerrados (Rothberg y Magleby, 2000; Talukder y Aldrich, 2000). Esto es consistente con la disminución del retardo en la instalación de las corrientes macroscópicas a medida que el voltaje que precede al de activación (pre-pulso) se torna cada vez más positivo (Stefani y col., 1997). La idea es que el retardo corresponde al tránsito de los canales por múltiples estados cerrados. Durante el pre-pulso se redistribuyen los canales de manera que se puebla una mayor fracción de estados cerrados más cercanos al abierto de manera que se acorta el trayecto hacia el estado abierto. Este fenómeno se usa como diagnóstico para la existencia de más de un estado cerrado en la vía de activación (Cole y Moore, 1960). Lo mismo ocurre en condiciones de $[\text{Ca}^{+2}]$ saturante, donde se distinguen un total 8-10 estados discretos con 3-4 estados abiertos y 5-6 cerrados (Rothberg y Magleby, 1999). Cuando se analizaron las duraciones entre intervalos adyacentes en $[\text{Ca}^{+2}]$ saturante, se observa que los intervalos abiertos breves tienden a estar adyacentes a cerrados largos, en tanto que abiertos prolongados se encuentran junto con cerrados breves (McManus y col., 1985; Rothberg y Magleby, 1998, 1999). Ello implica que deben existir al menos dos caminos entre estados cerrados y abiertos. Los estudios de Rothberg y Magleby (1999, 2000) establecieron un modelo mínimo para la activación del canal BK que está basado en el esquema II, al que se agrega un segundo piso. El primer piso de estados cerrados, cada uno de estos estados posibles está conectado con un piso de canales abiertos como muestra el esquema III. A pesar de que este modelo describe muy bien los resultados, es el modelo de Horrigan y Aldrich (HA)(Horrigan y Aldrich, 2002,) el que describe mejor la relación entre estructura y función del canal BK, es por ello, que lo utilizaremos como base para explicar nuestros resultados.



Esquema III

1.3.3.- Modelo de activación HA

La P_o de los canales BK suele tener una marcada dependencia de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, con coeficientes de Hill que están en el rango de 2-4 (Barrett y col., 1982; Oberhauser y col., 1988; Cui y col., 1997). Coeficientes de Hill > 1 indican una acción cooperativa del Ca^{2+} y la P_o asociadas a la modulación alostérica de la actividad (Colquhoun 1973). Además los canales BK son activados por incrementos de voltaje en ausencia de Ca^{2+} (Pallotta, 1985; Cox y col., 1997b). Estas observaciones impulsan la idea que el mecanismo de activación de los canales BK es de naturaleza alostérica. El primer modelo planteado en estos términos y que intenta explicar el efecto del Ca^{2+} sobre las corrientes macroscópicas (I_K) y la activación por voltaje en ausencia de Ca^{2+} , fue propuesto por Cox y colaboradores (1997a) y es una versión adaptada del modelo MWC (Monod y col., 1965). El modelo supone que la activación del canal BK ocurre mediante una sola transición dependiente de voltaje ($G \rightarrow O$) y que la unión de Ca^{2+} regula esta transición de manera alostérica.



Esquema IV

Esta suposición implica que la activación del VSD y la apertura del canal ocurren de manera concertada, a través de una transición alostérica que modifica la afinidad de los sitios de unión de Ca^{+2} y la sensibilidad a voltaje. A pesar de que esta aproximación es una sobre simplificación del proceso, puesto que existían varias evidencias que sugerían un mayor número de estados en ausencia de Ca^{+2} , el modelo incorpora la idea que la apertura del canal modifica la afinidad de la proteína por Ca^{+2} .

Para dilucidar el mecanismo que gobierna la activación por voltaje del canal BK, Horrigan y colaboradores (1999) analizaron en detalle el comportamiento de I_K en ausencia de Ca^{+2} y observaron que las corrientes macroscópicas se desarrollan siguiendo un curso exponencial luego de un breve retardo. Tanto la constante de tiempo de I_K como el retardo que la precede dependen del voltaje (fig 5 A, B y C) (Horrigan y col., 1999). La dependencia de voltaje del retardo de la corriente ($\Delta t(V)$) y la constante de tiempo ($\tau[I_K](V)$) se ajustan a un modelo de dos estados (fig 5 B-C), pero, el número de cargas aparentes obtenido del ajuste de dicho modelo a cada curva es distinto en cada caso sugiriendo que $\Delta t(V)$ y $\tau[I_K](V)$ evidencian mecanismos distintos. La apertura del canal es limitado por la rapidez de activación de I_K , por tanto, la curva $\tau[I_K](V)$ es el paso limitante del proceso de apertura del canal. Este paso es precedido por transiciones rápidas dependientes de voltaje ($\Delta t(V)$) en las que no se observa corriente, de ahí que la dependencia de voltaje de $\Delta t(V)$ está relacionada con la activación de los sensores de voltaje.

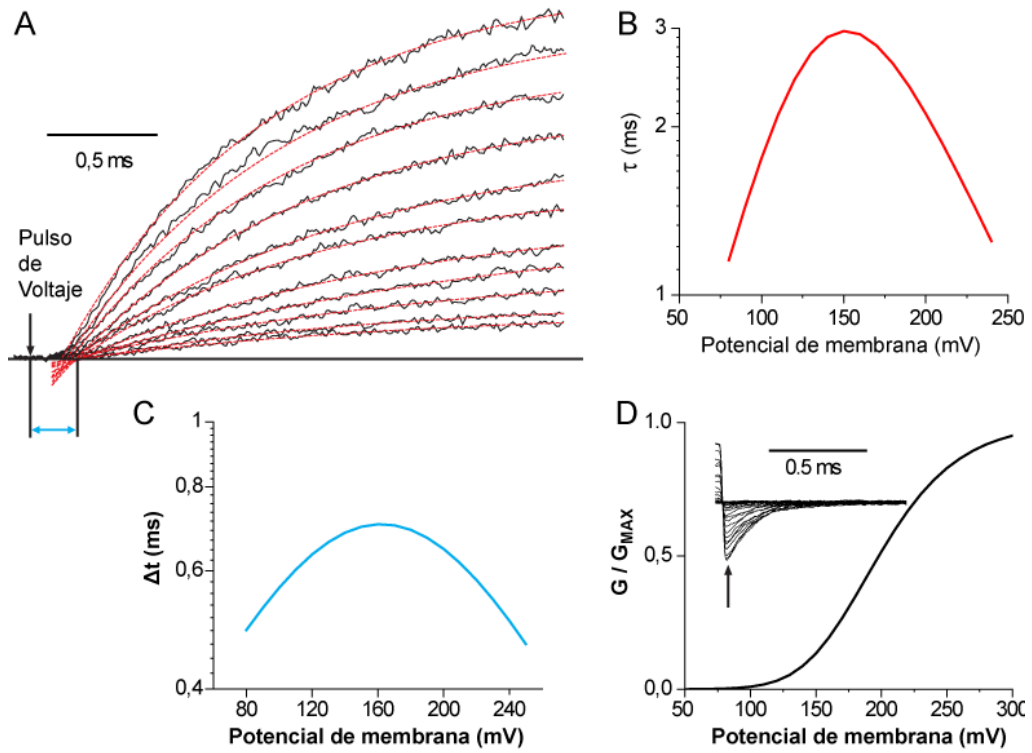


Figura 5.- Parámetros que describen I_K en ausencia de Ca^{+2} .

- (A) Familia de trazos I_K evocados por pulsos de 160 a 250 mV, con intervalos de 10 mV. La flecha negra indica el inicio del pulso de voltaje. Cada trazo se ajusta a una función exponencial con retardo: $I[k]=I_{max}*[1-\exp(-(\Delta t-t)/\tau)]$. La línea punteada roja representa curso exponencial: $I_{max}*[1-\exp(-t/\tau)]$.
- (B) Constante de tiempo del curso exponencial de I_K , graficada a partir de los valores del ajuste a un modelo de dos estados obtenido por Horrigan y col. (1999-FIG5A): $\tau(V)=(a+b)^{-1}$ donde $a=a_0*\exp(z_a*V/kT)$ y $b=b_0*\exp(z_b*V/kT)$. Con los valores $a_0=0,024 \text{ ms}^{-1}$; $z_a=0,37 \text{ e}$; $b_0=6,5 \text{ ms}^{-1}$; $z_b=-0,67 \text{ e}$.
- (C) Retardo del curso exponencial de I_K , graficada a partir de los valores del ajuste obtenido por Horrigan y col. (1999-FIG3D), a un modelo de dos estados: $\tau(V)=(a+b)^{-1}$ donde $a=a_0*\exp(z_a*V/kT)$ y $b=b_0*\exp(z_b*V/kT)$. Con los valores $a_0=0,12 \text{ ms}^{-1}$; $z_a=0,28 \text{ e}$; $b_0=4,25 \text{ ms}^{-1}$; $z_b=-0,28 \text{ e}$.
- (D) Curva $G(V)$ graficada a partir de los valores del ajuste obtenido por Horrigan y col. (1999-FIG6B), a una función de Boltzmann de dos estados:

$$G(V) = \left(\frac{G_{MAX}}{1 + e^{\frac{-zF(V-V_h)}{RT}}} \right)^n \quad (2)$$

Con valores de ajuste $V_h=145 \text{ mV}$, $z=0,69 \text{ e}$ y $n=3,2$. Los valores experimentales son obtenidos de la corriente instantánea al final del pulso de voltaje y normalizados por el máximo (G_{MAX}).

El comportamiento de I_K puede ser ajustado a un modelo secuencial del tipo H-H como se muestran (fig 6A) (Horrigan y col., 1999). Sin embargo, esto ocurre voltajes en que la P_O es significativa ($P_O > 10^{-3}$; área amarilla fig 6 A y B). Mientras que a voltajes más negativos (<-50 mV) la dependencia de voltaje de $\tau(I_K)$ y de la P_O disminuyen (fig 6B). En el caso de la P_O , la pendiente límite es menor que la pendiente máxima, lo que sugiere que el canal BK debe tener múltiples estados abiertos y deben existir transiciones dependientes de voltajes entre esos estados abiertos (Sigg y Bezanilla, 1997).

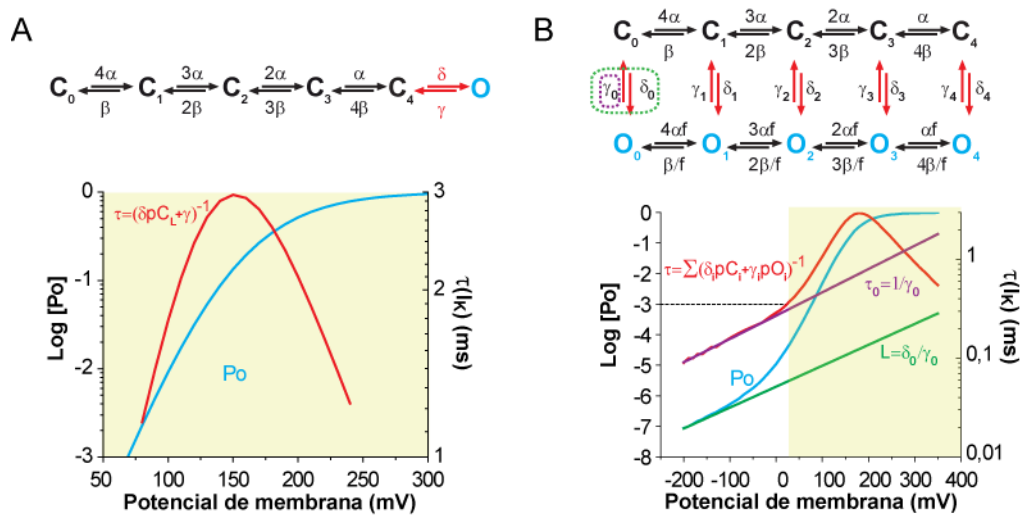
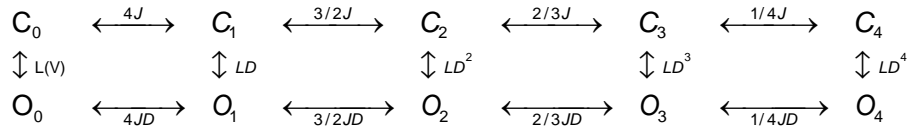


Figura 6.- Comparación de modelos secuencial y alostérico.

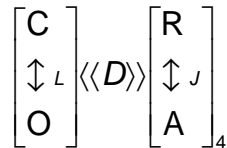
- (A) Descripción de $\tau(I_K)(V)$ y P_O utilizando un modelo de activación secuencial tipo H-H, en el que la dependencia de voltaje de las constantes cinéticas están dadas por $x = x_0 \exp(z_x V/kT)$ con $x = \alpha, \beta, \delta$ y γ . Los valores graficados corresponden a $z_\alpha = 0,28$ e, $\alpha_0 = 244$ s $^{-1}$, $z_\beta = 0,28$ e, $\beta_0 = 8,670$ s $^{-1}$, $z_\delta = 0,155$ e, $\delta_0 = 49,4$ s $^{-1}$, $z_\gamma = 0,155$ e, $\gamma_0 = 134$ s $^{-1}$.
- (B) Descripción de $\tau(I_K)(V)$ y P_O utilizando un modelo alostérico, definido en el esquema sobre las curvas con los siguientes valores: $z_\alpha = 0,28$ e, $\alpha_0 = 1276$ s $^{-1}$, $z_\beta = 0,28$ e, $\beta_0 = 35370$ s $^{-1}$, $z_\delta = 0,262$ e, $\delta_{00} = 0,0074$ s $^{-1}$, $\delta_{10} = 0,12$ s $^{-1}$, $\delta_{20} = 2,14$ s $^{-1}$, $\delta_{30} = 25,7$ s $^{-1}$, $\delta_{40} = 49,3$ s $^{-1}$, $z_\gamma = -0,138$ e, $\gamma_{00} = 3700$ s $^{-1}$, $\gamma_{10} = 3700$ s $^{-1}$, $\gamma_{20} = 3700$ s $^{-1}$, $\gamma_{30} = 2612$ s $^{-1}$, $\gamma_{40} = 295$ s $^{-1}$. Según Horrigan y col. (1999).

Para explicar estos resultados Horrigan y col. (1999) proponen el siguiente mecanismo de activación que incorpora interacciones alostéricas:



Esquema V

En el esquema V la activación de los VSD es representada por transiciones horizontales ($C \leftrightarrow C$ y $O \leftrightarrow O$), las transiciones verticales ($C \leftrightarrow O$) corresponden a la apertura del PD. Los subíndices de cada estado cerrado y abierto (C_i y O_i) corresponden al número de VSD activados ($i=0-4$). El paso limitante de la apertura del canal, corresponde a las transiciones verticales $\langle C \leftrightarrow O \rangle$ cuya constante de equilibrio depende de la cantidad de VSD activados. Este esquema se puede colapsar en el siguiente mecanismo:



Esquema VI

El esquema VI sintetiza el principal resultado de Horrigan y col. (1999) que es que la activación de VSD y la apertura del canal son procesos separados. El esquema precisa que el canal puede transitar entre la conformación abierta (O de "open") y cerrada (C de "closed") gobernada por la constante de equilibrio (L). Este equilibrio es regulado de forma alostérica por el estado de cada VSD. Horrigan y col. (1999) suponen que el VSD se puede desplazar desde una conformación de reposo (R) a una activada (A) y su dependencia de voltaje es gobernada por la constante de equilibrio (J). Con la activación de cada VSD la tasa de transición al estado abierto ($C \leftrightarrow O$) incrementa D veces. Asimismo cuando el canal se encuentra en su conformación abierta, la activación de los VSD es favorecida por el mismo factor D, que define las

interacciones alostéricas entre los dominios PD y VSD. A voltajes en que todos los VSD se encuentran en estado de reposo, la transición ($C_0 \leftrightarrow O_0$) tiene una baja dependencia de voltaje ($z_L=0,3 e$) y constante de equilibrio intrínseca ($L_0 \sim 10^{-6}$). Esto sugiere que el canal se puede abrir mediante un proceso que no requiere la activación de VSD (fig 7A) y que estaría gobernado por la constante de equilibrio:

$$L(V) = L_0 e^{\left(\frac{z_L V}{kT}\right)} \quad (3)$$

El que la transición ($\ominus O$) tenga una dependencia de voltaje se concilia con la alta dependencia de voltaje de la activación del canal porque en respuesta a un incremento de voltaje la activación de cada VSD ($C \leftrightarrow C$) favorece la apertura del canal ($C \leftrightarrow O$) por un factor D (fig 7A).

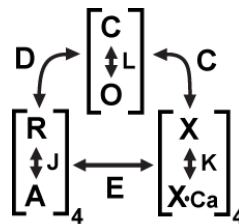
Para determinar la naturaleza de la activación del VSD, Horrigan y Aldrich (1999) midieron las corrientes de compuerta (I_g), de manera similar a Stefani y col. (1997). Horrigan y Aldrich (1999) encontraron que la relajación de las I_g se ajusta a una curva exponencial sin fase ascendente y que la relación de carga-voltaje ($Q(V)$) se ajusta a una función de Boltzmann. Esto es consistente con un modelo de dos estados para describir la transición del VSD desde un estado de reposo (R) a un estado activado (A). La dependencia de voltaje de esta transición es de $0,55 e_0$ (z) y el voltaje medio de activación es de 155 mV ($V_h(J)$), ambos valores restringen la constante de equilibrio para la activación de los VSD que está definida por:

$$J(V) = J_0 e^{\left(\frac{z_J V}{kT}\right)} \quad (4)$$

La relajación de I_g es muy rápida y la mayoría del movimiento de carga ocurre cuando los canales están cerrados. El curso temporal de la carga, analizado mediante la integración de I_g al final del pulso de voltaje (Q_{OFF}), muestra un aumento a medida que los canales se abren. Utilizando este análisis se puede separar las I_g en dos componentes, un componente rápido (Q_{fast}) como resultado de la activación de los VSD en los primeros $\sim 200 \mu\text{s}$ del pulso de voltaje y

un componente lento (Q_{slow}) con cinética similar a la activación del canal. Este resultado concuerda con la predicción que las transiciones horizontales $C \leftrightarrow O$ y $O \leftrightarrow C$ y verticales ($C \leftrightarrow O$) son dependientes de voltaje. Los resultados de Horrigan y col. (1999) ajustados al esquema V, obtienen un valor de acoplamiento alto $D=17$, así la activación de los cuatro VSD favorece $\sim 84000 (D^4)$ el estado abierto ($C \leftrightarrow O$).

Debido a que la activación del sensor de voltaje y la apertura del canal están altamente acopladas fue necesario determinar si el efecto alostérico del Ca^{+2} sobre la activación del canal ocurre por efectos en el PD, los VSD o ambos. Horrigan y Aldrich (2002) extienden el esquema V y analizan el comportamiento de las constantes de equilibrio J y L en distintas concentraciones de Ca^{+2} .



Esquema VII

El Esquema VII incorpora el efecto de la unión de Ca^{+2} , descrita por la transición $X \leftrightarrow X \cdot Ca^{+2}$ gobernada por la constante de equilibrio K:

$$K = \frac{[Ca^{+2}]}{K_D} \quad (5)$$

Donde K_D es la constante de disociación del Ca^{+2} cuando el canal está cerrado y los VSD en estado de reposo. Para develar los factores alostéricos D, E, C del esquema VII, Horrigan y Aldrich (2002) midieron la relación entre I_g y I_k en 0 y 70 μM de Ca^{+2} ; la última concentración debería saturar los sitios de unión a Ca^{+2} de alta afinidad. La relación $Q_{fast}(V)$ se desplaza -37 mV hacia la izquierda con concentraciones saturantes de Ca^{+2} (Fig 7D). Este desplazamiento es

mucho menor a los que desplazamiento de la curva $G(V)$ que es de ~ -166 mV. Esta observación sugiere que el efecto de la unión de Ca^{+2} sobre la activación de los VSD es menor y no da cuenta del desplazamiento de la $G(V)$ (fig 7B). Para aislar el efecto alostérico de la unión de Ca^{+2} sobre la apertura del canal ($G \rightarrow O$), la P_o fue medida a voltajes muy negativos (entre -120 y -160 mV; sensores de voltaje en reposo). A estos voltajes (< -80 mV) la P_o incrementa cerca de ~ 1000 veces en respuesta al aumento de Ca^{+2} , alcanzando una saturación sobre los $100 \mu\text{M}$ de Ca^{+2} . La K_D que se obtiene del la razón de $nP_o(R_o)$ en distintas concentraciones de Ca^{+2} ($\sim 11 \mu\text{M}$) es similar a las mediciones anteriores (Cox y Aldrich, 2000). A partir de los ajustes de los datos al esquema VII, se obtiene que la unión de Ca^{+2} está vinculada de manera alostérico con la apertura del canal ($G \rightarrow O$). Este cambio de conformación está acompañado de un cambio de afinidad de ~ 8 veces por cada Ca^{+2} unido.

Finalmente, Horrigan y Aldrich (2002) determinaron cómo la apertura del canal afecta la dependencia de voltaje del VSD (fig 7C), separando la carga de activación de VSD cuando el canal está abierto (Q_o ; $O \rightarrow O$) con respecto a la del canal cerrado (Q_c ; $C \rightarrow C$). Usando una extensión del análisis de pendiente límite (Sigg y Bezanilla, 1997) determinaron que la carga de activación está determinada por:

$$\langle q_a \rangle = kT \frac{d(\ln[P_o])}{dV} = (Q_o - Q_c) * (1 - P_o) \quad (6)$$

En un rango de voltajes negativos en que $P_o \ll 1$ y $Q_c \ll Q_o$, la relación $Q_o(V)$ puede determinarse únicamente a partir de la dependencia de voltaje de P_o . La relación $Q_o(V)$ encontrada es similar en forma a $Q_c(V)$, pero desplazada a voltajes más negativos, lo que consistente con un aumento en la constante de equilibrio de la transición $R \leftrightarrow A$ por la apertura del canal y la naturaleza alostérica de la interacción entre VSD y PD (Horrigan y Aldrich, 2002).

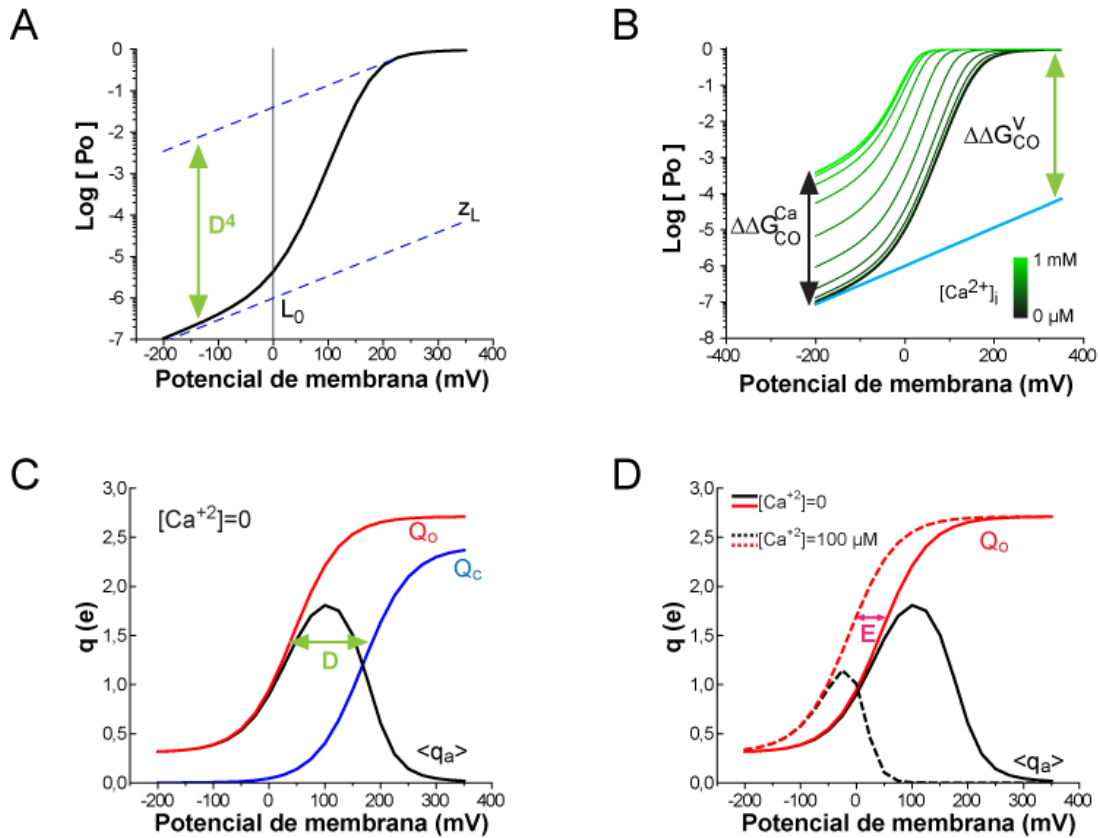


Figura 7.- Relaciones energéticas entre dominios funcionales según el modelo HA.

- (A) Relación $\text{Log}[P_o](V)$ (línea negra) graficada a partir de modelo HA (Horrigan y Aldrich, 1999). De esta grafica se pueden determinar L y LD^4 , La línea punteada azul inferior y superior, con dependencia de voltaje es z_L .
- (B) Relación $\text{Log}[P_o](V)$ (línea negra) a partir de modelo HA, muestra el incremento en $\text{Log}(P_o)$ en respuesta aumento de $[Ca^{+2}]$ de 0 a 1000 μM a -200 mV (todos los VSD están en reposo). Esto refleja el acoplamiento energético $\Delta\Delta G_{Co}(Ca^{+2})$. Además, a 0 $[Ca^{+2}]$, $\text{Log}(P_o)$ incrementa con el voltaje desde -200 a +350 mV (todos los VSD activados) equivalente a acoplamiento $\Delta\Delta G_{Co}(V)$.
- (C) Relación $Q_c(V)$ obtenida de la integración de la activación de I_g , la relación $Q_o(V)$ se obtiene ajustando el pie de $\langle q_a \rangle(V)$ ($\langle q_a \rangle = kT \cdot d(\ln[P_o])/dV$) a una función de Boltzmann. La diferencia entre la energía media de activación de $Q_c(V)$ y $Q_o(V)$ ($\Delta V/Q_{Co}$) permite obtener el factor D .
- (D) Relación $Q_o(V)$ y $\langle q_a \rangle(V)$ graficadas a 0 $[Ca^{+2}]$ (líneas continuas) y a 100 μM $[Ca^{+2}]$ (línea punteada). La diferencia entre la energía media de activación ($\Delta V_h(J)$) de la curva $Q_o(V)$.

1.3.4.- Interacciones Alostéricas entre dominios funcionales.

Una vez evaluados los distintos dominios funcionales con el modelo alostérico HA es posible develar cómo estos dominios se conversan en términos energéticos. A partir de las mediciones de pendiente limite se obtiene que la constante intrínseca que gobierna la apertura del canal (L_0) es de 10^{-6} (fig. 7A), equivalente a una estabilización del estado cerrado de ~ 8 kcal/mol (32.5 kJ/mol); y no mucho mayor a la energía libre de un puente de hidrogeno (5-30 kJ/mol). La activación de los VSD y la unión de Ca^{+2} desplazan el equilibrio hacia el estado abierto incrementando la energía libre de la transición $C \leftrightarrow O$ ($\Delta G_{C \leftrightarrow O}$) de manera independiente y aditiva. La constante de acoplamiento D ($=25$) refleja la contribución energética de cada VSD al equilibrio de la transición $C \leftrightarrow O$, desplazándolo en ~ 1.9 kcal/mol hacia los abiertos (fig. 7B) de acuerdo con:

$$\Delta \Delta G_{C \leftrightarrow O}^V = -kT \ln[D] \quad (8)$$

La constante de acoplamiento entre la unión de Ca^{+2} y el "gating" del canal C ($=8$), determina que la unión de un Ca^{+2} desplaza el equilibrio de la transición $C \leftrightarrow O$ en $\sim 1,2$ kcal/mol hacia el abierto (fig. 7B) de acuerdo con:

$$\Delta \Delta G_{C \leftrightarrow O}^{Ca} = -kT \ln[C] \quad (9)$$

La apertura del canal también modifica la dependencia de voltaje de la activación de VSD, las transiciones de los VSD en estado abierto ($O \rightarrow O$) tienen una constante de equilibrio que es D veces mayor, y la diferencia en el voltaje medio de activación entre la curva Q_O y Q_C (fig. 7C) está determinada por:

$$\Delta V(Q_{CO}) = \frac{kT}{z_j} \ln[D] \quad (10)$$

La constante de acoplamiento alostérico E gobierna las interacciones entre la unión de Ca^{+2} y la activación de los VSD. El acoplamiento entre estos sensores es débil con un valor de $E=2,4$, que se traduce en una contribución energética por cada Ca^{+2} unido de $\sim 0,47$ kcal/mol, a favor

de la configuración activada de los VSD. (fig. 7B) El desplazamiento de la constante de equilibrio de la transición $R \leftrightarrow A$ está dado por:

$$\Delta V(J) = \frac{kT}{z_J} \ln[E] \quad (11)$$

El modelo alostérico establecido por Horrigan y Aldrich (2002) provee el marco teórico conceptual que mejor resume tanto las características biofísicas como estructurales de los canales BK. Sin embargo, según los parámetros descritos por el modelo es muy poco probable encontrar actividad significativa de un canal BK en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, en las células excitables el voltaje de membrana varía entre -90 y 30 mV y la $[Ca^{+2}]_i$ oscila entre 0,1 y 20 μ M (en la vecindad de un canal de Ca^{+2} dependiente de voltaje); así a $[Ca^{+2}]_i$ de 20 μ M y a voltajes bajos (-90 mV) ó a voltajes de 30 mV y $[Ca^{+2}]_i$ de 0,1 μ M la activación de un canal BK es irrelevante ($P_0 < 10^{-3}$). Uno podría concluir de esto que el funcionamiento un canal BK en su ambiente nativo está restringido a condiciones extremas. Sin embargo Las $I_{K(Ca)}$ nativas encontradas en distintos tipos celulares tienen comportamientos divergentes a los predichos por la conducta de los canales formados solamente por la subunidad α . Por ejemplo se han encontrado $I_{K(Ca)}$ activadas a potenciales de reposo (Gessner y col., 2005) mientras otras son activadas a altos voltajes (Horrigan y col., 1999); además de $I_{K(Ca)}$ que son rápidamente inactivadas (Xia y col., 1999). La gran variabilidad de fenotipos de $I_{K(Ca)}$ se debe a que la subunidad α tiene una enorme variedad de moduladores como: variantes de empalme (ver tabla I, Johnson y col., 2011), moléculas endógenas (Hou y col., 2009), proteínas kinasas (Schubert y Nelson, 2001) y subunidades auxiliares.

1.4.- Modulación por subunidades β .

Los canales BK en su ambiente nativo (ver Tabla I) son un complejo formado la subunidad α y por subunidades auxiliares β . Esta diversidad en la composición podría explicar la diversidad de fenotipos de $I_{K(Ca)}$ en los distintos tipos celulares. Hasta la fecha se han clonado cuatro subunidades β : $\beta 1$ (codificada por el gen KCNMB1), $\beta 2$ (KCNMB2), $\beta 3$ (KCNMB3) y $\beta 4$ (KCNMB4)(Knaus y col., 1994; Xia y col., 1999; Behrens y col., 2000; Brenner y col., 2000; Meera y col., 2000, revisado en Orio y col., 2002). Las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ son las que comparten mayor homología. La similitud entre $\beta 1$ y $\beta 2$ es de 53% y 37% entre $\beta 3$ y $\beta 1$. La más divergente es $\beta 4$, con menos de un 20% de similitud con $\beta 1$ (fig 8) (Wallner y col., 1999; Xia y col., 1999; Brenner y col., 2000). Sin embargo, todas las subunidades β adoptan una topología de membrana similar con dos segmentos transmembranales (TM1 y TM2) un lazo extracelular largo (116-128 aa) y terminales NH_2 y $COOH$ citoplasmáticos y de pequeño tamaño (Knaus y col., 1994; Brenner y col., 2000). Cada una de las subunidades β modifica las características biofísicas del canal BK para llevar a cabo su función celular específica.

		Terminal NH₂		TM1	
hbeta1	1	--MVKKLVMAQKRGETRALCLGVTMVVCAVITYYILVTTVLPYQKS			45
hbeta2-IR	12	LLDKRKTVTALKAGEDRAILLGLAMMVCSIMMYFLLGITLLRSYMQS			58
hbeta3b	42	PLDVHKRLPS-STGEDRAVMLGFAMMGFSVLMFFLLGTTIILKPFMLS			87
hbeta4	1	-MAKLRVAYEYTEAEDKSIRLGLFLIISGVVSLFIFGFCWLSPALQD			46
Lazo Extracelular					
hbeta1	63	ELKGKKVPQYPCL--WVNVSAAGRWAFLYHTEDTRDQDQCSYIPGS			109
hbeta2-IR	84	GPDCWKLSQYPCLQVYVNLTSSEKLLLYHTEETIKINQKCSYIPKC			130
hbeta3b	114	GVHCHGQKYPCLQVFNLSHPGQKALLHYNEEAVQINPKCFYTPKC			160
hbeta4	73	GADCRGTSQYPCVQVYVNNSESNSRALLHSDEHQLLTNPKCSYIPPC			119
				TM2	
hbeta1	151	LYGPQALLFSLFWPTFLLTGGLLIAMVKSNOYLSILAAQK-----			191
hbeta2-IR	172	LYSSNVLFHSLFWPTCMMAGGVAIVAMVKTQYLSLLCERIQRINR-			217
hbeta3b	204	KYDQMAIFHCLFWPSLTLGGALIVGMVRLTQHLSLLCEKYSTVVRD			250
hbeta4	164	THDEIVLLHCFLWPLVTFVVGVLIVVLTICAKSLAVKAEAMKKRKF			210

Figura 8.- Estructura primaria de las distintas subunidades β .

El alineamiento entre las distintas subunidades β se realizó utilizando Blast (www.uniprot.org).

Canal o subunidad	Gen (Humano)	Localización	Tejido en que se expresa
BK	KCNMA	10q22.3	<p>Zero: cerebro, riñón, timo, estómago, músculo, intestino delgado, testículos, glándula adrenal, útero, próstata, pituitaria, mama*, embrión(9.5d, 12.5d, 19d).</p> <p>STREX (e21): cerebro, corazón, riñón, bazo, timo, estómago, músculo, intestino delgado, pulmón, testículo, glándula suprarrenal, páncreas, útero, próstata, pituitaria, mama* embrión.(8.5d, 9.5d,12.5d, 19d).</p> <p>e22: bazo, hígado, músculo, intestino delgado, piel, útero, próstata, mama*, embrión (9.5d,12.5d, 19d).</p> <p>Δe23: cerebro, corazón, riñón, bazo, timo, hígado, estómago, músculo, intestino delgado, pulmón, testículos, piel, glándula suprarrenal, páncreas, útero,próstata, pituitaria, mama*, embrión.(8.5d, 9.5d, 12.5d, 19d).</p>
β 1	KCNMB1	5q34	músculo liso, la aorta, la tráquea, riñón.
β 2	KCNMB2	3q26.32	bazo, placenta, páncreas, corazón, riñón, útero.
β 3	KCNMB3	3q26.3-q27	<p>β 3a: bazo, placenta, páncreas, corazón, riñón;</p> <p>β 3b: bazo, páncreas, riñón, corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, testículos.</p> <p>β 3c: bazo, próstata, placenta, hígado, riñón, páncreas, ovario, cerebro, pulmón.</p> <p>β 3d: bazo, testículos, placenta, riñón, páncreas, cerebro, pulmón.</p>
β 4	KCNMB4	12q	cerebro, tejido neuronal.

Tabla 1.- Variantes de empalme alternativo de canales BK y subunidades β.

1.4.1.- Modulación por $\beta 1$.

La subunidad $\beta 1$ se expresa principalmente en músculo liso (Knaus y col., 1994), y su co-expresión en sistemas heterólogos aumenta la sensibilidad aparente a Ca^{+2} del canal BK. Así ante un aumento $[\text{Ca}^{+2}]_i$ la energía media de activación del canal disminuye a voltajes cercanos al de reposo, condición en la cual la activación del canal tiene una dependencia lineal con el Ca^{+2} a concentraciones de relevancia fisiológica 1-10 μM (Meera y col., 1996). Qian y col. (2002) demostraron que $\beta 1$ también incrementa la P_o de canales BK cuyo dominio de unión a calcio no funcional, sugiriendo que el incremento de la sensibilidad aparente al Ca^{+2} no está relacionada con el mecanismo de activación por Ca^{+2} . Registros de canal único demostraron que $\beta 1$ incrementa ~ 10 veces la P_o en ausencia de Ca^{+2} (Nimigeon y Magleby, 2000). Este incremento de la P_o fue inicialmente asociado a un incremento de la constante de equilibrio para la apertura del canal que corresponde a L_o en el modelo HA (Cox y Aldrich, 2000; Nimigeon y Magleby, 2000). Si bien las mediciones se realizaron en ausencia de Ca^{+2} , los voltajes medidos (0 a 100 mV) no aseguran que los VSD se encuentren en estado de reposo lo que es un requisito fundamental para determinar L_o (Horrigan y col., 1999). Una medición más exhaustiva, determinó que la subunidad $\beta 1$ disminuye L_o a voltajes bajos (< -50) y que el aumento de la P_o observado a voltajes entre 0 y 100 mV está asociado a una disminución de la dependencia de voltaje de las corrientes macroscópicas ($z_j=0,5$ a $z_j=0,3$ e; Orio y Latorre, 2005), sugiriendo que la subunidad $\beta 1$ está modificando el equilibrio del sensor de voltaje. Esta hipótesis fue rápidamente validada por (Bao y Cox, 2005) quienes midieron corrientes de compuerta y demostraron que la subunidad $\beta 1$ estabiliza el estado activado del sensor de voltaje. En presencia de $\beta 1$ también se observa un enlentecimiento de la cinética macroscópicas (Cox y Aldrich, 2000; Bao y Cox, 2005; Orio y Latorre, 2005) que coincide con un incremento de los intervalos abierto y cerrado observados en canal único (Nimigeon y Magleby, 2000).

La subunidad $\beta 1$ también modifica las propiedades farmacológicas del canal como la sensibilidad a alcoholes (Feinberg-Zadek y Treistman, 2007), estrógenos (Valverde y col., 1999), y ácidos grasos omega-3 (Hoshi y col., 2013). La afinidad de las toxinas de escorpión a canal BK incrementa en presencia de $\beta 1$ (Meera y col., 2000).

1.4.2.- Modulación por $\beta 2$.

La subunidad $\beta 2$ forma parte del complejo BK que produce $I_{K(Ca)}$ rápidas y transitorias. Este fenotipo se encuentra en células cromafines de la glándula adrenal (Solaro y Lingle, 1992) y neuronas del área CA1 de hipocampo (Hicks y Marrion, 1998). La inactivación de la $I_{K(Ca)}$ depende de los primeros aminoácidos del amino terminal (aa 1-45) de $\beta 2$ que bloquean la vía de conducción del canal una vez que se abre. Esta inactivación se puede eliminar tratando el lado intracelular con tripsina (Wallner y col., 1999). La estructura 3D del amino terminal resuelta por NMR, muestra que los primeros 17 residuos (aa 1-17) adquieren forma de “bola” y que los siguientes 25 (aa 20-45) residuos se enlazan como una “cadena” flexible (Bentrop y col., 2001). Este tipo de arquitectura es la que encontramos en el dominio de inactivación de canales *Shaker* y algunos *Kv*. El análisis del mutante de $\beta 2$ sin dominio de inactivación ($\beta 2IR$) muestra que, de manera similar a $\beta 1$, $\beta 2IR$ produce un incremento aparente de la sensibilidad a Ca^{2+} y la dependencia de voltaje de las corrientes macroscópicas, aun cuando el análisis de pendiente limite no muestra diferencias en la carga asociada al movimiento del sensor de voltaje (Orio y Latorre, 2005). Sin embargo, estudios de fluorescencia marcando el segmento S4 de la subunidad α mostraron que la curva $F(V)$ y $G(V)$ se desplazan a la izquierda en canales ($\beta 2/\alpha$)BK (Savalli y col., 2007). Estos datos sugieren que al igual que $\beta 1$, la subunidad $\beta 2$ podría estar modulando el sensor de voltaje. Además de lo anterior, $\beta 2$ induce una rectificación de salida que es instantánea. Esta alteración de la conducción de iones podría explicarse si el lazo externo de $\beta 2$ se aproxima al de poro de la subunidad α (Uebele y col., 2000).

1.4.3.- Modulación por $\beta 3$.

La subunidad $\beta 3$ fue clonada por tres grupos distintos quienes encontraron cuatro variantes de empalme $\beta 3a$ - $\beta 3d$ (Behrens y col., 2000; Brenner y col., 2000; Uebele y col., 2000). A diferencia de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, ninguna de las variantes de $\beta 3$ altera la sensibilidad aparente a Ca^{2+} ni la dependencia de voltaje, pero con $\beta 3b$ las corrientes a bajas concentraciones de Ca^{2+} se aceleran (Xia y col., 2000). La rapidez aparente de la activación aumenta de dos a tres veces en presencia de $\beta 3b$, esto es equivalente a un aumento de más de 10 veces en la concentración efectiva de Ca^{2+} (Cui y col., 1997). Las variantes de empalme $\beta 3a$, $\beta 3b$ y $\beta 3c$ inducen una inactivación parcial e incompleta, que es más rápida que la producida por $\beta 2$ (Uebele y col., 2000; Xia y col., 2000; Lingle y col., 2001). El estudio detallado de este mecanismo inactivación, mostró que este proceso ocurre en dos pasos: Primero se produce una unión estereoespecífica de la partícula de inactivación con la boca interna del canal en su estado abierto y luego se produce la inactivación de la canal (Gonzalez-Perez y col., 2012). $\beta 3b$ también produce una rectificación de entrada de $I_{K(Ca)}$ (Xia y col., 2000) efecto que se relaciona normalmente a una interacción de la subunidad con el poro del canal.

1.4.4.- Modulación por $\beta 4$.

La subunidad $\beta 4$ se expresa casi exclusivamente en el cerebro (ver Tabla I). Esta subunidad es responsable de algunas de las características únicas de los canales BK neuronales tales como la baja afinidad por toxinas de escorpión y tolerancia al etanol (Meera y col., 2000; Gan y col., 2008). Se ha propuesto que la subunidad $\beta 4$ es un "supresor" de canales BK, debido a que enlentece la cinética de las corrientes macroscópicas y desplaza la curva $G(V)$ hacia la derecha (Weiger y col., 2000). Esto se debe a que $\beta 4$ altera la sensibilidad aparente a Ca^{2+} de una forma compleja. A concentraciones de $Ca^{2+} < \sim 6 \mu M$, $\beta 4$ disminuye la constante de equilibrio para la apertura del canal (L_0) (Wang y col., 2006) lo que se traduce en el desplazamiento hacia la derecha de la curva $G(V)$ y predice una disminución de la probabilidad de apertura (Brenner y col., 2000; Wang y col., 2006). A concentraciones $Ca^{2+} > \sim 10 \mu M$, la curva $G(V)$ se desplaza

hacia la izquierda, o sea que la probabilidad de apertura aumenta (Wang y col., 2006). De manera similar a β_1 y β_2 , la subunidad β_4 enlentece las $I_{K(Ca)}$.

1.4.5.- Mecanismos alostérico de la regulación por subunidades β .

El rol modulador de las subunidades β ha sido sometido al marco conceptual del modelo HA a fin de develar el mecanismo molecular que subyace la interacción entre α - β . Dado que los principales efectos de las subunidades β se dividen en cambios de la sensibilidad aparente a Ca^{+2} y cambios en la cinética de I_K , concuerdan con una modulación del tipo alostérica. En otras palabras la subunidad β interactúa con uno o más de los dominios funcionales, modificando su constante de equilibrio y/o la constante de acoplamiento de este dominio. La subunidad β más estudiada hasta ahora es la β_1 . Los registros de corrientes de compuerta muestran que el principal efecto sobre el canal es disminuir la energía necesaria para activar los VSD ($V_h(J)$), estabilizando su conformación activa (Bao y Cox, 2005). La subunidad β_2 que ejerce un efecto regulador similar a β_1 enlentece I_K y aumentando la sensibilidad a Ca^{+2} , sin embargo no existe claridad acerca del mecanismo. Los estudios de Savalli y col. (2007) le adjudican a β_2 un efecto modulador del equilibrio de activación de VSD, pero contrario a lo predicho por estos estudios, Yang y col. (2008) encontraron que el efecto sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2} es independiente de la presencia de residuos cargados del VSD. El análisis de estado estacionario y cinético de I_K y su posterior ajuste al modelo HA genera muchas veces resultados divergentes. Un ejemplo de esto es analizado por Orio y Latorre (2005), quienes demuestran que la mayoría de los efectos de β_1 se pueden explicar económicamente cambiando la carga asociada a la transición $R \leftrightarrow A$, lo que se contradice con los resultados de Bao y Cox (2005) que demuestran que esta carga no cambia con β_1 . Creemos que una posible razón es que las mediciones experimentales no son suficientes para restringir el número de parámetros que definen el modelo. Para obtener una correcta determinación de los parámetros del modelo es necesario disminuir los parámetros libres del ajuste y evitar la reciprocidad entre las constantes alostéricas

y esto se logra midiendo la contribución de cada dominio por separado como lo demuestra Horrigan y Aldrich (2002).

1.4.6.- Mecanismos físico-químicos de la regulación por subunidades β

La interacción funcional entre la subunidad α y las distintas β depende de la presencia del segmento S0 de la subunidad α (Wallner y col., 1996). Se ha demostrado que el segmento (S0) formar parte del VSD tanto funcional como estructuralmente. La contribución funcionalmente del S0 a VSD fue probado mediante la introducción de residuos voluminosos como el triptófano que alteraron la dependencia de voltaje de la activación del canal (Koval y col., 2007). Estudios

estructurales con la técnica de entrecruzamiento de puentes de disulfuro para determinar las proximidades relativas entre regiones de una proteína mostraron que S0 está flanqueando al VSD y su extremo extracelular está en contacto físico con el segmento S4 (Niu y col., 2013). Diversos estudios funcionales coinciden en que todas las subunidad β también rodean VSD adyacentes y establecen un contacto físico entre los extremo extracelulares (S0) α con (TM2) β , y (TM1) β con (S1 y S2) α (fig. 9) (Liu y col., 2008; Wu y col., 2009a; Liu y col., 2010; Morera y col., 2012; Wu y col., 2013).

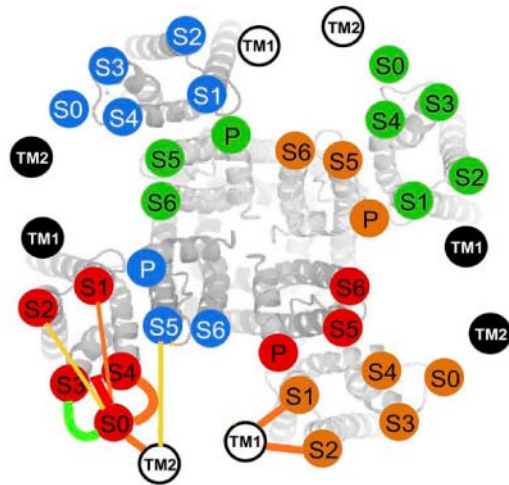


Figura 9.- Ubicaciones de subunidad β , con respecto a α .

Ubicaciones de los extremos extracelulares TM1 y TM2 de β con respecto a los extremos extracelulares de α S0-S6. Las posiciones de las subunidades β 1, β 2, β 3a y β 4 son similares y fueron determinadas por (Liu y col., 2008; Wu y col., 2009a; Liu y col., 2010; Wu y col., 2013)

Varias evidencias sugieren que diferentes partes de la subunidad β están involucradas en la modulación de funciones específicas de BK interactuando con los distintos dominios funcionales de la subunidad α . Aún cuando, uno de los principales efectos de las distintas β es el

incremento en sensibilidad aparente Ca^{+2} , este cambio se puede explicar por el efecto directo sobre VSD (Cox y Aldrich, 2000; Qian y col., 2002; Bao y Cox, 2005). Por lo tanto el efecto regulador de las subunidad β se debe a una interacción entre β y los VSD y el PD de la subunidad α sin involucrar a los sitios de unión a Ca^{+2} en los dominios RCK.

Los lazos extracelulares de (β)BK por su parte parecen tener un rol más importante modulando la propiedades de conducción de BK. Esto explicaría la rectificación instantánea hacia el exterior y la protección contra la unión de la toxina sugiriendo que el lazo interactúa con el poro de (α)BK. Sin embargo también se ha involucrado al lazo extracelular en la modulación de la unión de Ca^{+2} y la sensibilidad a voltaje de (α)BK. Por ejemplo, la mutación natural en el lazo de $\beta 1$ (E65R) implicada en la protección contra la disfunción diastólica, desplaza la curva $G(V)$ del complejo ($\alpha/\beta_{\text{E65R}}$)BK mas a la izquierda que con $\beta 1$ silvestre (Fernandez-Fernandez y col., 2004). Un efecto semejante pero opuesto, ocurre con la mutación del lazo de $\beta 1$ (R140W) implicada con la exacerbación del asma. Esta mutación está asociada a una pérdida de función de $\beta 1$; la curva $G(V)$ del complejo ($\alpha/\beta_{\text{R140W}}$) BK se desplaza más a la derecha comparado con $\beta 1$ (Seibold y col., 2008). Además la substitución de diversos residuos en el lazo de $\beta 1$ por alanina provocan desplazamiento y cambio en la sensibilidad de voltaje de la curva de $G(V)$ (Gruslova y col., 2012).

Finalmente los terminales intracelulares están involucrados en los efectos en la sensibilidad aparente Ca^{+2} y la sensibilidad de voltaje. Usando quimeras entre $\beta 1$ y $\beta 2$, (Orio y col., 2006) demostraron que la modulación de las curvas de $G(V)$ y la cinética de corrientes macroscópicas inducidas por $\beta 1$ y $\beta 2$ tipos dependen principalmente de los terminales NH_2 -y COOH -. Esto es consistente con la idea de que existe una fuerte interacción entre los dominios intracelulares de ambas subunidades α y β , evidenciada por experimentos en que se cambio una porción del terminal COOH - de (α)BK por la misma porción de Slo3, canal BK activado por pH, lo cual previene el efecto de $\beta 1$ (Qian y col., 2002).

Los antecedentes presentados muestran que el comportamiento del canal BK en situaciones fisiológicas varía considerablemente comparado con el modelo HA. La co-expresión de la subunidad α con distintas subunidades β , afecta el equilibrio la activación de los sensores de voltaje ($C \leftrightarrow C$ y $O \leftrightarrow O$) así como la apertura del canal ($C \leftrightarrow O$), aun cuando el canal no tiene Ca^{+2} unido. La modulación del canal BK por $\beta 1$ se debe principalmente a que estabiliza la configuración activada de los VSD, desplazando el $V_h(J)$ hacia la izquierda (Bao y Cox, 2005). Sin embargo, Bao y Cox (2005) no reportan si la desaceleración en la activación I_K inducida por $\beta 1$ tiene una correlación con el movimiento de carga del VSD, como predice el modelo alostérico. A pesar de la similitud del efecto regulatorio de $\beta 1$ y $\beta 2$ sobre la cinética de I_K y la sensibilidad aparente por Ca^{+2} , aun no está claro si esta subunidad ejerce su efecto a través sensor de voltaje. Mientras que Orio y Latorre (2005) sostienen que la modulación por $\beta 2$ modifica los parámetros alostérico (C, D y E) del modelo HA, los datos de fluorescencia sugieren que $\beta 2$ ejerce un efecto similar a $\beta 1$, evidenciado por un desplazamiento a la izquierda de la curva $F(V)$ medido en el mutante R207Q. La subunidad $\beta 3$ aparentemente no modifica las características biofísicas del canal, sin embargo la I_K de canales $(\alpha/\beta 3)$ BK se activan más rápido que los canales (α) BK a baja $[Ca^{+2}]$ (Xia y col., 2000). Este incremento de la rapidez de activación debe estar relacionado a modificaciones en la vía de apertura ($C \leftrightarrow O$) del canal BK. Por otro lado, Los efectos más dramáticos de las características biofísicas de canal son observados en presencia de $\beta 4$, aun cuando la subunidad $\beta 4$ modula al canal de manera similar a $\beta 1$ y $\beta 2$.

Los efectos de las subunidades beta sobre la activación de BK en condiciones de 0 Ca^{+2} se pueden agrupar en cambios en la cinética de apertura ($G \rightarrow O$) y cambios en la dependencia de voltaje del la P_O que, como mostramos anteriormente, provienen en gran parte del movimiento del VSD ($C \leftrightarrow C$ y $O \leftrightarrow O$). La naturaleza alostérica del canal permite evaluar cada una de estas alteraciones a través de cambios en la dependencia de voltaje y la cinética de las I_g (Horrigan y Aldrich, 2002).

A pesar del hecho de que el fenotipo BK producido por cada una de las subunidades β ha sido bien caracterizado, existen controversias acerca de los mecanismos biofísicos por medio de los cuales estas subunidades auxiliares modifican el “gating” del canal BK. Desde el hallazgo de Bao y Cox (2005) que el efecto principal de la subunidad $\beta 1$ es alterar el equilibrio entre la configuración de reposo y activa del VSD, surgen varias preguntas importantes: ¿Hasta qué punto otras subunidades β como $\beta 2$ y $\beta 4$ alteran la sensibilidad a voltaje de los canales BK? ¿Existe una relación entre los cambios en la cinética de I_K inducidos por subunidades β y la cinética de sensor de voltaje?, ¿Cuál es el rol modulador de la subunidad $\beta 1$ sobre la activación por voltaje del canal? y ¿Cuáles son los determinantes moleculares de $\beta 1$ que determinan la modulación de VSD?.

Para contestar estas preguntas, vamos a evaluar el efecto de las distintas subunidades β sobre el dominio sensor de voltaje del canal BK. A través de mediciones de corrientes de compuerta obtenidas utilizando parches gigante de membrana de ovocitos de *Xenopus* en configuración parche escindido “inside-out”, comparamos la relación de la carga desplazada con el voltaje $Q(V)$. Nuestros resultados muestran que todas las subunidades β modulan el VSD de α del canal BK. Encontramos que las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2IR$ estabilizan la conformación activa del VSD. En tanto $\beta 3b$ estabiliza un estado cerrado en la vía de apertura del canal y $\beta 4$ afecta la dependencia de voltaje de VSD. Para conceptualizar nuestros resultados fue necesario modificar el modelo HA, agregando un estado cerrado en la vía de apertura del canal. Además identificamos los determinantes moleculares de β que participan en la modulación el sensor de voltaje de la subunidad α , para esto construimos quimeras mediante el intercambio de los segmentos de transmembranales, NH_2 - y $COOH$ -terminal, y el lazo extracelular entre las subunidades $\beta 1$ - $\beta 2$ y $\beta 1$ - $\beta 3b$. Nuestros resultados muestran que $\beta 1$ y $\beta 2IR$ estabilizan la configuración activada del sensor de potencial y que sus dominios citoplasmáticos y el lazo extracelular de la subunidad β , son necesarios para provocar dicho efecto.

Hipótesis:

”Las distintas subunidades auxiliares β del canal BK modulan el dominio sensor de voltaje de la subunidad α a través de la interacción de regiones específicas.”

Basándose en que todas las subunidades β alteran la activación por voltaje del canal BK, proponemos que el dominio sensor de voltaje es principal blanco de esta modulación. Además suponemos que la modulación se debe a la interacción de una región específica de la subunidad β con el sensor de voltaje, proponemos aislar esta región para así entender el mecanismo tras este fenómeno.

Objetivos específicos.

Caracterizar las corrientes de compuerta en presencia de distintas subunidades β .

Para probar el efecto (o carencia de él) de las subunidades β en el equilibrio del sensor de voltaje, registraremos corrientes de compuerta (I_g) de canales BK expresados de forma heteróloga con y sin subunidades β .

Caracterizar las consecuencias cinéticas de la modulación por subunidades β .

Para ello resumiremos nuestros resultados en el ajuste de un modelo cinético, usando como templado inicial el modelo planteado por Horrigan y col. (1999,2002) para la subunidad α .

Caracterizar los elementos estructurales que influyen en la modulación del sensor de voltaje. Para ello registraremos I_g de quimeras entre las distintas subunidades β , en la que intercambiaremos regiones específicas entre ellas para medir su efecto sobre el canal BK.

MATERIALES Y METODOS

2.1.- Biología Molecular

2.1.1.- Bacterias

2.1.1.1.- Cepa bacteriana.

Se utilizó la cepa bacteriana XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA USA) y se eligió de acuerdo a sus características genéticas recomendadas para amplificar las secuencias clonadas en el vector pBSTA(Shih tm y col) y pGEM (Promega Corp., Madison, WI USA).

2.1.1.2.- Cultivo de bacterias.

Los cultivos de bacterias crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB) a 37°C el cual se agitó a 225 ciclos/minuto, en un agitador orbital. Para los cultivos en medio sólido, se utilizó el medio LB suplementado con agaragar al 1,5% (Sambrook y col. 1989). Todos los medios se esterilizaron a 125°C y 15 psi por 45 min.

2.1.1.3.- Obtención de bacterias competentes.

Las bacterias XL-1Blue fueron hechas competentes mediante el protocolo de cloruro de rubidio (Sambrook y col. 1989). Se aisló una colonia bacteriana cultivada en medio líquido LB sin antibiótico. Esta colonia se inoculó 100 ml de medio LB incubándose con agitación a 37°C toda la noche. Este cultivo se diluyó 1:100 en 100 ml de medio líquido mínimo (SOB; Sambrook y col. 1989) y creció hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,5 a 0,6 a 550 nm. Los cultivos

se sedimentaron a 4800 g por 15 min a 4°C, para luego resuspenderlas en una solución estéril y fría que contenía: 50 mM de KCH₃CO₂, 50 mM de MnCl₂, 10 mM de RbCl, 10 mM CaCl₂ y glicerol al 12%(p/v), todo a pH 5,8. Las células se incubaron por 2 h en hielo y luego se volvió a sedimentarlas y resuspenderlas en una solución cuya composición fue: 75 mM de CaCl₂, 10 mM de RbCl, 10 mM de MOPS, glicerol al 12%(p/v), todo a pH 7. Las bacterias se incubaron en hielo por 90 min, se alicuotaron y congelaron en nitrógeno líquido, y posteriormente se almacenaron a -80°C.

2.1.1.4.- Transformación de bacterias.

Las bacterias competentes fueron descongeladas en hielo durante 10 min, luego se agregó la muestra de DNA (1 ng de DNA plasmidial) y se incubó en hielo durante 30 min. Las bacterias fueron sometidas un calentamiento a 42°C durante 2 min y, luego transferidas al hielo por 2 min. Las bacterias se incubaron durante 1 h a 37 °C en 0,5 ml de medio líquido SOC (Sambrook y col. 1989). El cultivo se transfirió a placas con medio sólido suplementadas con ampicilina (50 µg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis MO), y se incubaron a 37°C, durante 12 a 16 horas, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico codificada en el plásmido.

2.1.2.- Obtención y purificación de plásmidos de DNA

El DNA se extrajo de un cultivo de bacterias transformadas con el plásmido de interés y crecido durante toda la noche (12-16 horas) a 37°C, con agitación. La extracción se realizó haciendo pasar por columnas "Maxi" según las indicaciones del fabricante (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA USA).

2.1.3.- Característica del clon utilizado

Se utilizó el cDNA codificante de la subunidad α del canal de potasio activado por calcio BK (N° de acceso genebank: U11058) clonado de humano. Este canal (BK) fue subclonado en el vector pBSTA y fue gentilmente donado por la Dr. L. Toro Universidad de California (UCLA), USA. En

el clon utilizado el inicio de la transcripción comienza desde la cuarta secuencia de consenso Kosack (Wallner y col., 1995).

Las subunidades $\beta 1$ (U25138) y $\beta 4$ (AF160967) del canal BK humano, y la subunidad $\beta 2$ (AF099137) sin el dominio de inactivación (en el futuro $\beta 2IR$; (Wallner y col., 1996)) fueron gentilmente donadas por la Dr. L. Toro Universidad de California (UCLA). La subunidad $\beta 3b$ (AF160968) fue gentilmente donada por el Dr. C Lingle de la Universidad de Washington.

2.1.4.- Transcripción in vitro

2.1.4.1.- Linearización y Purificación de DNA.

Los plasmidios se linealizaron con una enzima de restricción de corte único Not I cuyo sitio de corte se encuentra en el extremo 3' de la región a transcribir. Se linealizaron 10-20 μ g de DNA según el protocolo recomendado para la enzima, en un volumen total de 50 μ l. La mezcla de reacción se incubó por 4 horas a 37°C. El producto de linealización se verificó cargando 1 μ l de la reacción en un gel de agarosa al 1% teñidos con Gelstar (Lonza Group Ltd. Switzerland) y estimando el tamaño del DNA. El DNA lineal se purificó haciendo pasar el producto por columnas de purificación (QiaQuick Gel extraction kit, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA USA).

2.1.4.2.- Preparación del RNA mensajero.

La transcripción in vitro se efectuó con el kit mMMESSAGE mMACHINE T7 *ultra* (Ambion Inc., Austin, TX USA). Se usó la enzima RNA polimerasa T7, puesto que el DNA codificante se encuentra bajo el control del promotor T7 en el vector pBSTA. Los reactivos se agregaron en el siguiente orden: 10 μ l de NTP-ARCA, 2 μ l del tampón de transcripción (10X), 1 μ g de DNA y 1 μ l de enzima T7 en un volumen final de 20 μ l. Esta mezcla se incubó por 10 min a 37°C para luego agregar 1 μ l de GTP 30mM, y seguir incubando por al menos 2 horas a 37°C. Para terminar la reacción, el DNA se digirió agregando 1 μ l de TURBO-DNasa e incubando por 15 min a 37°C. Se usó la enzima *e.coli* Poly(A) polimerasa (E-PAP), para agregar una cola poliadenilada al RNA mensajero sintetizado e impedir la rápida degradación en el citoplasma del

ovocito. La reacción se realizó agregando al producto anterior los reactivos en el siguiente orden: 36 μ l de agua libre RNasa, 20 μ l tampón de la poliadenilación (5x), 20 μ l de $MnCl_2$, 10 μ l de ATP y 4 μ l de enzima E-PAP. La mezcla se incubó por 30 min a 37°C, finalmente la enzima fue inactivada incubándola en hielo por 10 minutos. El RNA sintetizado se purificó utilizando columnas de purificación de RNA según las indicaciones del fabricante (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany). La integridad del transcrito obtenido se verificó en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm, donde 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 40 μ g/ml.

2.2.- Animales de experimentación y microinyección

2.2.1.- Preparación de Ovocitos de *Xenopus laevis*

Ranas adultas hembras de *Xenopus laevis* se anestesiaron por inmersión en 5% (p/v) Etil-3-amino-benzoato metilsulfonato (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) durante 30 min. Mediante una incisión abdominal se disectó uno o dos lóbulos ováricos. Estos últimos se transfirieron a solución OR-2, compuesta por 82.5 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$, 5 mM de ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N`-2-etanosulfónico (HEPES), pH 7,6. La incisión fue suturada y el ejemplar se colocó en una mezcla de agua y hielo para su recuperación.

Los lóbulos fueron desmembrados manualmente en grupos de 5 a 10 ovocitos y luego defoliculados por digestión enzimática con colagenasa tipo 2 (~450 U/ml; Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ) en OR-2, por un periodo de 45 a 60 min., a temperatura ambiente y con una agitación orbital de 30 a 60 ciclos/min. Los ovocitos se lavaron 3 veces en medio OR-2 sin colagenasa y 2 veces en la solución SOS (100 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 1,8 mM de $CaCl_2$, 1 mM de $MgCl_2$, 5 mM de HEPES, pH 7,6). Posteriormente los ovocitos se colocaron en una placa de Petri con medio SOS suplementado con Amikacina (300 μ g/ml; Lab Chile SA. Santiago. Chile) y se efectuó una primera selección de ovocitos de los estados V y VI. Los ovocitos se mantuvieron a 18°C. Doce a veinticuatro horas después del tratamiento con

colagenasa, se efectuó la segunda selección de ovocitos, eligiéndose mediante inspección visual aquellos que no tuvieran la membrana de células foliculares. Estos ovocitos seleccionados se inyectaron durante las próximas 12 horas.

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

Se microinyectó un volumen de 40 nl de RNA a una concentración de 1 µg/µl de BK α, 0,2 µg/µl de BK β. La microinyección se realizó con la ayuda de un sistema que consistió de una lupa binocular (Nikon, Tipo 2001), una fuente de luz con fibra óptica ("FO-Z", Chiu Technical Corp.; Word 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 hicieron estirando capilares de vidrio ("4878", WPI, Sarasota, FL, USA) en un estirador horizontal (Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA). La punta de la micropipeta se quebró con una pinza bajo el microscopio, con el objetivo de obtener puntas de un diámetro de ~10 µm. Una extensión aproximada de un centímetro, medida desde el borde posterior de la micropipeta, se llenó con vaselina líquida (M-3516, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO; USA). La micropipeta se insertó en el vástago del microinyector y la vaselina líquida se hizo avanzar hasta la punta. Se succionó, entonces, un volumen de 2 µl de RNA mensajero, depositado previamente en un trozo de Parafilm ubicado sobre una placa de Petri llena de hielo. Los ovocitos se depositaron en una placa plástica que contenía SOS. Esta placa tiene tres sacados de 1 mm de ancho que permite mantener a los ovocitos en una posición fija durante la microinyección. Los ovocitos se inyectaron inmediatamente.

Los registros electrofisiológicos se efectuaron 1-4 días después de la microinyección. Durante este tiempo los ovocitos microinyectados se mantuvieron a 18°C, en SOS suplementado con amikacina. Previo a la realización de los experimentos de "patch-clamp", se removió manualmente la membrana vitelina del ovocito.

2.3.- Electrofisiología

2.3.1.- Técnica de “*patch-clamp*”

El registro de las corrientes de compuerta se realizó utilizando la técnica de “*patch clamp*” (Hamill y col., 1981) en configuración “*inside-out*” en macroparches de membrana (Hilgemann, 1989).

2.3.1.1.- Sistema de registro.

El sistema de registro se esquematiza en la figura 10 y está formado por: una cámara donde se ubica el ovocito, un amplificador de patch-clamp Axopatch-200b (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA), dos filtros Bessel, 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), una tarjeta de adquisición Digidata 1322A (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA) y un computador basado en el procesador Pentium III (Intel Corp., Santa Clara, CA, USA).

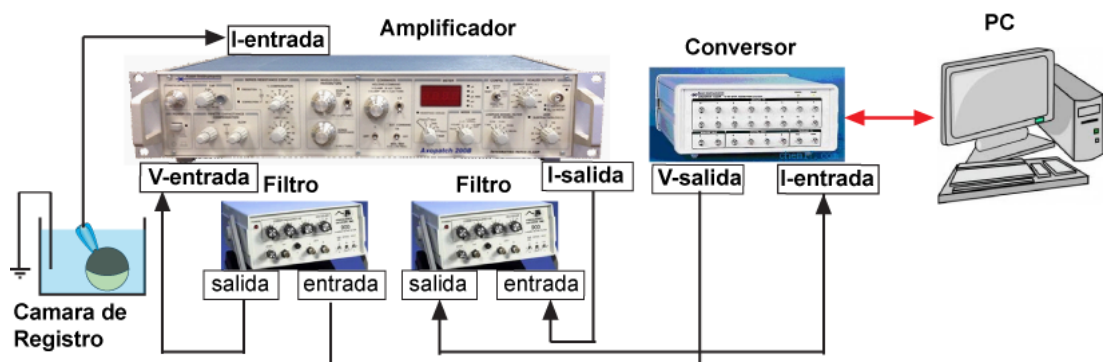


Figura 10.- Esquema del sistema de registro para “Patch-clamp”.

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

La posición y el desplazamiento de la pipeta de registro se controló con un micromanipulador compuesto por tres plataformas con tornillo micrométrico (Modelo 420, Newport Co., Fountain Valley, CA, USA) con desplazamiento en los ejes X e Y en el plano horizontal y con desplazamiento en el eje Z desviado 45° en relación al plano vertical.

2.3.1.2.- Pipeta de registro.

Para los experimentos de *patch clamp* se utilizó pipetas de vidrio de borosilicato Pyrex 7740 (Corning Inc., Corning City, NY, USA) y, obtenidas a partir del estiramiento con calor en un “*puller*” horizontal (modelo P80-PC, Sutter Instrument Co., San Rafael, CA, USA). Las pipetas utilizadas fueron de 10-70 μm de diámetro con una resistencia entre 0,4-0,8 $\text{M}\Omega$, Estas pipetas poseen un diámetro mayor que los habituales por eso los parches se llaman macro parches. Los electrodos metálicos se fabricaron con alambre de plata recubiertos con cloruro de plata (Ag/AgCl).

2.3.1.3.- Soluciones de registro.

Para el registro de corrientes de compuerta, el ovocito se bañó con una solución de: 110 mM de N-metil-d-glucamina (NMDG- MeSO_3), 10 mM de HEPES, 5 mM de HEDTA utilizado para reducir la concentración de calcio libre ($[\text{Ca}^{+2}]_{\text{libre}}$) a 0,8 nM, suponiendo que la $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{libre}}$ contaminante en la solución es $\sim 10 \mu\text{M}$ (Cox y col., 1997b). Las pipetas de registro se llenaron con la misma solución de 110 mM de tetraetilamonio (TEA- MeSO_3), 10 mM de HEPES, 2 mM de MgCl_2 . Ambas soluciones fueron tituladas a pH 7.0 utilizando MeSO_3 . Las soluciones fueron almacenadas a 4°C. Para realizar los registros se esperó que las soluciones alcanzaran temperatura ambiente.

2.3.2.- Adquisición y análisis.

2.3.2.1.- Adquisición.

Para la obtención de las corrientes macroscópicas se utilizaron dos tipos de protocolos: el protocolo **(1)** consiste en pulsos rectangulares de voltaje, de magnitud creciente y de duración adecuada para alcanzar el estado estacionario de las corrientes de compuerta; el protocolo **(2)** son pulsos de magnitud fija y duración variable entre 0,04 a 120 ms (fi 11).

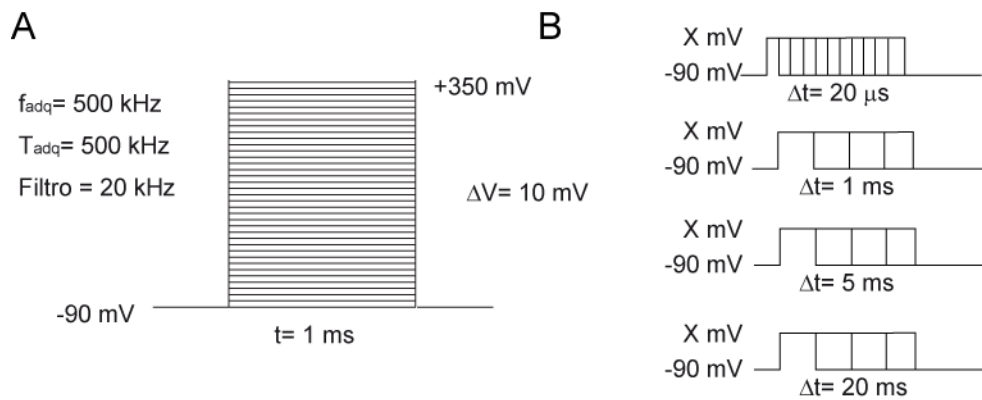


Figura 11.- Protocolos de voltaje.

- (A)** Protocolo de pulsos de voltaje de magnitud creciente utilizado para registrar corrientes de compuerta.
- (B)** Distintos protocolo de voltaje de duración creciente utilizado para registrar la cinética de las corrientes de compuerta al final del pulso

La señal de corriente se adquirió en forma digital a razón de 500 kHz con resolución de 16 bits, previamente filtrada con un filtro pasa bajos Bessel de 8 polos a una frecuencia de 20 Khz. La adquisición de los datos se realizó mediante el software CLAMPEX 8.2 (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA).

2.3.2.2.- Sustracción de componentes lineales.

Para obtener el movimiento de carga neto, se sustrajo el componente lineal utilizando la técnica de p/4 (Armstrong y Bezanilla 1974). Para aplicar esta técnica es necesario discriminar el rango de respuesta lineal (área gris fig. 12 A-B) del no-lineal (área amarilla fig. 12 A-B), debido a que los pulsos de voltaje que aplicaremos tienen magnitudes que están en el rango de respuesta no-lineal. Para restar los componentes lineales, por cada pulso de voltaje de magnitud (V_p),

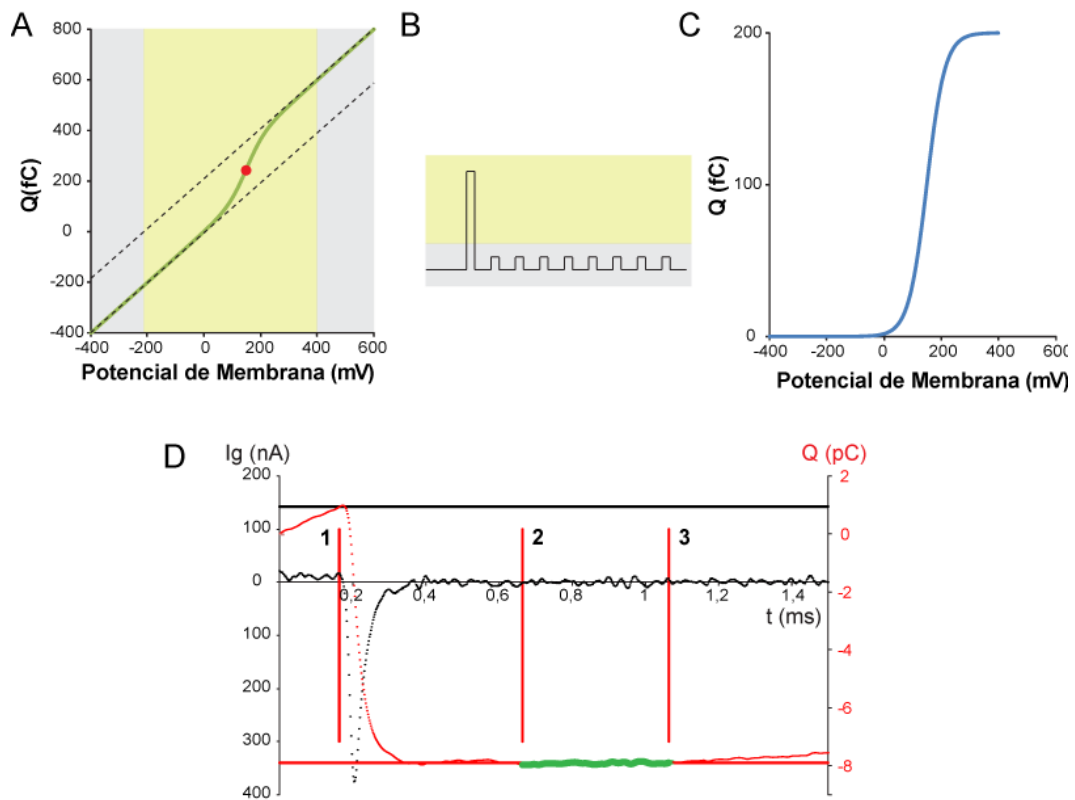


Figura 12.- Sustracción de componentes lineales.

(A) Curva $Q(V)$ obtenida al integrar la respuesta sin sustracción de componentes lineales. El área gris es el rango de respuesta lineal y el área amarilla es el rango de respuesta no-lineal.

(B) Protocolo de pulsos (p/8) utilizado para restar los componentes lineales.

(C) Curva $Q(V)$ obtenida al integrar la respuesta con sustracción de componentes lineales.

(D) Curva I_g en negro y su correspondiente integral. Las líneas verticales corresponden a: (1) inicio de la integración; (2) 500 μ s después del inicio de integración y (3) 1 ms luego del inicio.

aplicaremos 8 sub-pulsos de magnitud ($V_p/8$), la cual debe permanecer en el rango de respuesta lineal de la membrana (área gris fig 12 A-B). Luego, las respuestas obtenidas de con cada sub-pulso se suman, y esta suma se resta a la respuesta del pulso de voltaje de prueba. Finalmente, la línea base fue ajustada para cada trazo de manera individual para minimizar el efecto del ruido basal sobre el valor estacionario de la carga (ver trazo rojo fig 12B), efecto que notorio a los pulsos de voltaje bajos (entre -20 y +50 mV) cuando el movimiento de carga es mínimo. (ver 2 y 3 fig. 12D).

2.3.2.3.- Análisis de datos.

Todos los datos fueron analizados con Clampfit 10 (Axon Instruments) y Excel 2007 (Microsoft). Para obtener el movimiento de carga neto, las corrientes de compuerta se integraron entre 0 y 500 μ s después del pulso de voltaje. Relación $Q(V)$ fue ajustada a una función de Boltzmann de dos estados:

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

Donde z es la dependencia de voltaje de la activación, V_h es el potencial al que se encuentra el 50% de los sensores de voltaje en estado activo, T es la temperatura absoluta (típicamente 295 K), F es la constante de Faraday y R es la constante universal de los gases. Los valores de Q_{max} , V_h , y z se determinaron utilizando complemento *Solver* de Microsoft Excel para encontrar el mínimo de la suma de los cuadrados de las diferencias entre las cargas experimentales y las calculadas. La carga lenta al final del pulso (Q_{OFF}) fue evaluada como una función de la duración voltaje de activación, ajustando la curva $Q_{OFF}(t)$ a una función bi-exponencial:

$$Q_p = Q_{fast}(1 - \exp(-t / \tau_{fast})) + Q_{slow}(1 - \exp(-t / \tau_{slow}))$$

donde t es la duración del voltaje de activación, Q_{fast} , Q_{slow} , τ_{fast} y τ_{slow} son las cargas y las constantes de tiempo que describen la cinética de movimiento de carga lenta y rápida,

respectivamente. El valor de τ_{fast} fue restringido a la constante de tiempo obtenida del ajuste exponencial de I_{gON} (fig 18), los demás valores fueron determinados utilizando la aproximación por mínimos cuadrados.

2.3.2.4.- Desplazamiento en de V_h .

Se ha mostrado que el voltaje medio de activación (V_h) varía de parche en parche tanto para las curvas $G(V)$ como las $Q(V)$ (fig. 13A) (Stefani y col., 1997; Horrigan y Aldrich, 1999; Horrigan y col., 1999). Este desplazamiento en V_h no afecta de manera notoria la forma de las curvas individuales, pero la comparación entre curvas promedios se dificulta debido a que parámetros como la pendiente tienden a ensancharse dependiendo de la variabilidad de V_h . Para solucionar este problema, el V_h de cada experimento es determinado a partir del ajuste a la función de Boltzmann, luego es comparado con el promedio de todos los experimentos del mismo grupo $\langle V_h \rangle$. Los datos de cada experimento son desplazados en el eje del voltaje por ΔV_h ($\langle V_h \rangle - V_h$) como se muestra en la figura 13B, y luego son ajustados a una función de Boltzmann. Esto produce una curva promedio que representa de mejor forma las características individuales las curvas $G(V)$ y $Q(V)$.

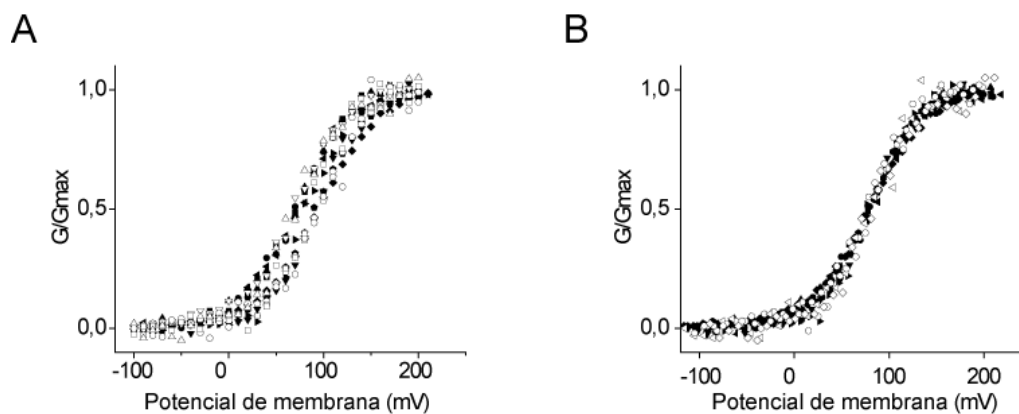


Figura 13.- Desplazamiento en el eje de voltaje aplicado registros $G(V)$.

- (A)** Curva $G(V)$ de varios experimentos en los que se observa la variabilidad V_h .
- (B)** Curvas $G(V)$ de varios experimentos que fueron desplazados en el eje del voltaje por ΔV_h ($\langle V_h \rangle - V_h$).

2.3.2.5.-Las simulaciones de corriente iónica y de compuerta.

Las corriente iónica y de compuerta de canales BK se simularon en Matlab™ (Matwork Inc, EE.UU.). Para ello se resolvieron las dependencias de tiempo de la matriz de distribución de estados (S (t)) durante un protocolo de pulso de voltaje mediante el cálculo de:

$$\vec{S}(t) = \vec{S}(t) \cdot \exp(Q \cdot t) \quad (12)$$

donde Q es la matriz de estados descrita por (Colquhoun y Hawkes, 1982) en el que cada elemento de la matriz q_{ij} es la constante de rapidez de la transición del estado i al estado j . Los elementos diagonales de esta matriz corresponde a la suma de las constantes de rapidez de salida de cada estado q_{ii} . Utilizando el método de descomposición espectral, se obtuvieron las constantes de tiempo y amplitudes que describen la relajación de un sistema de múltiples estados. El curso temporal de I_K e I_g se puede calcular entonces a partir de:

$$I_K(t) = S_j = N \cdot \vec{S}(t) \cdot \vec{G} \quad (13)$$

$$I_g(t) = N \cdot \vec{S}(t) \cdot \vec{F} \quad (14)$$

N es el número de canales y G es un vector que contiene la conductancia del canal único para cada estado. F es un vector en el que cada elemento se corresponde con el flujo neto de las cargas que participan en la transición entre los estados. Estos se obtienen multiplicando la tasa de cada transición por las cargas desplazadas en esa transición (Santiago-Castillo y col., 2010).

Todas las simulaciones se realizaron usando una frecuencia de muestreo de 500 kHz y fueron filtradas digitalmente a 20 KHz con una implementación numérica de un filtro Bessel de 8 polos. La carga total desplazada al final de un pulso (Q_{OFF}) se obtuvo mediante la integración de 1 ms de simulación de I_g . La Po aparente se obtuvo de $I_K(t)$ al final de un pulso de 120 ms.

El ajuste del modelo cinético a los datos se realizó mediante un ajuste global. El conjunto de parámetros (p_k) que define el modelo se obtuvo minimizando la función de coste SSQ (p_k) con un algoritmo de "simplex" (Nelder y Mead, 1965):

$$SSQ(p_k) = \sum_i A_i \left[\sum_j (f_i - x_j)^2 / n \max(x_j) \right] \quad (15)$$

El error de mínimos cuadrados entre los ajustes (f_i) y los datos (x_j) se normalizó por el número de puntos de los datos (n) veces el máximo en cada conjunto de datos en particular ($\max(x_j)$). El error relativo de cada tipo individual de experimentos fue escalado por un factor arbitrario (A_i) de manera que el error relativo para cada experimento se mantuvo dentro de un rango similar.

RESULTADOS

3.1.- Caracterización de las *gating currents* en la presencia de subunidades β .

Las primeras mediciones que realicé fueron las corrientes macroscópicas de K^+ (I_K) en la configuración de “*cell-attached*” para confirmar que el fenotipo de los canales BK expresados correspondían al de las subunidades esperadas: α sola o el complejo α/β (Fig. 14). Dada las altas concentraciones de K^+ y Ca^{+2} intracelular, la gran magnitud de las I_K hace imposible controlar el voltaje en la configuración “*cell-attached*”. Este problema lo solucioné registrando las corrientes en parches escindidos y con una concentración simétrica de K^+ de 1 mM. Después de la escisión del parche, las I_g se pudieron aislar perfundiendo profusamente el baño con soluciones libres de K^+ y Ca^{+2} (Figs. 14, columna derecha). En la figura 14 (ver nomenclatura) se puede observar que las corrientes de K^+ de canales ($\alpha/\beta1$)BK y ($\alpha/\beta4$)BK tienen una cinética mucho más lenta que las observada con canales formados por la subunidad α sola. El enlentecimiento de las corriente de K^+ mediada por la co-expresión de las subunidades β es una de las características del fenotipo de canales formados por $\alpha/\beta x$ ($x = 1, 2, 3$ y 4). Los canales ($\alpha/\beta3b$)BK se identificaron por la presencia de inactivación rápida e incompleta que se manifiesta como una pequeña disminución de la corriente al comienzo del pulso de voltaje (Fig. 15D).

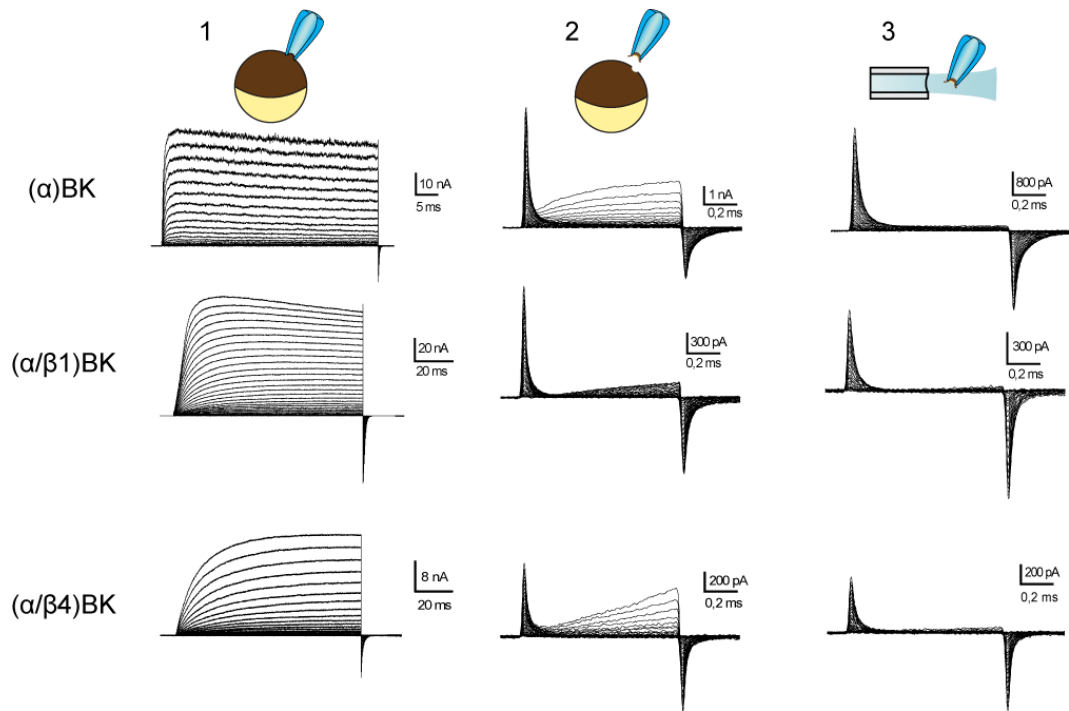


Figura 14.- Corrientes I_K e I_g registradas del mismo macro parche.

Las I_K se registraron en configuración "cell-attached" (1) con el fin de asegurar que los canales BK se formaron por la α o complejo α/β esperado (note la diferencia en escalas temporales entre la primera y segunda fila). Después de la escisión del parche (2), las I_g son aisladas en condiciones de $0 K^+$, luego de varios lavados con una solución libre de K^+ (3).

Las familias de I_g que se muestran en la figura 15, columna de la derecha, fueron evocadas por pulso de 1 ms a diferentes voltajes de -90 a 350 mV, en incrementos de 10 mV y desde un potencial de mantención de -90 mV. Con el fin de obtener las relaciones de activación de la carga de compuerta, se integraron los primero 0,5 ms al comienzo ($Q_{ON}(V)$) y al final del pulso ($Q_{OFF}(V)$). Como se ve en la figura 16, la carga desplazada al inicio del pulso despolarizante es recuperada completamente al final del pulso de 1 ms de duración para todos los diferentes tipos de canales probados, lo mismo se observó en el caso de $(\alpha/\beta 2IR)BK$ y $(\alpha/\beta 3b)BK$ (datos no mostrados). Para obtener las relaciones $Q(V)$ para cada tipo de canal, los datos de todos los experimentos se ajustaron a una función de Boltzmann (ver materiales y métodos 3.3) para producir las curvas $Q(V)$ que se muestran en la figura 17. A-D. Lo primero que llama la atención es que las curvas $Q(V)$ de los canales $(\alpha/\beta 1)BK$ y $(\alpha/\beta 2IR)BK$ están desplazadas -57 y -39 mV con respecto a canales $(\alpha)BK$, respectivamente (Fig. 17 A, B, E). Por otra parte las pendientes de las diferentes $Q(V)$ no muestran cambios apreciables (Fig. 17 F). Los valores de V_h y z obtenidos para canales $(\alpha)BK$ y $(\alpha/\beta 1)BK$ (Fig. 17 E y F) concuerdan con los reportados anteriormente (Stefani y col., 1997; Horrigan y Aldrich, 1999; Cox y Aldrich, 2000). Una mención aparte merece $\beta 4$ que produce un desplazamiento a la derecha 22 mV del V_h y una disminución del 23% en z (Fig. 17 D y F). La diferencia de energía libre estándar, ΔG^0 , entre los estados activo y en reposo del sensor de voltaje ($\Delta G^0 = zFV_o$) es de 10,3 kJ/mol para la subunidad α . Esta se reduce a 6,3, 7,7 y 8,6 kJ/mol cuando el canal se co-expresa con subunidades $\beta 1$, $\beta 2IR$ y $\beta 4$, respectivamente. Estos resultados muestran que no sólo $\beta 1$, sino también $\beta 2IR$ y $\beta 4$ estabilizan el sensor de voltaje en su configuración activa, (Fig. 17 C y E). Caso aparte es el de los canales $\alpha/\beta 3b$: para estos no se observan cambios energéticos sobre el VSD ($\Delta G^0 = 10,2$ kJ/mol).

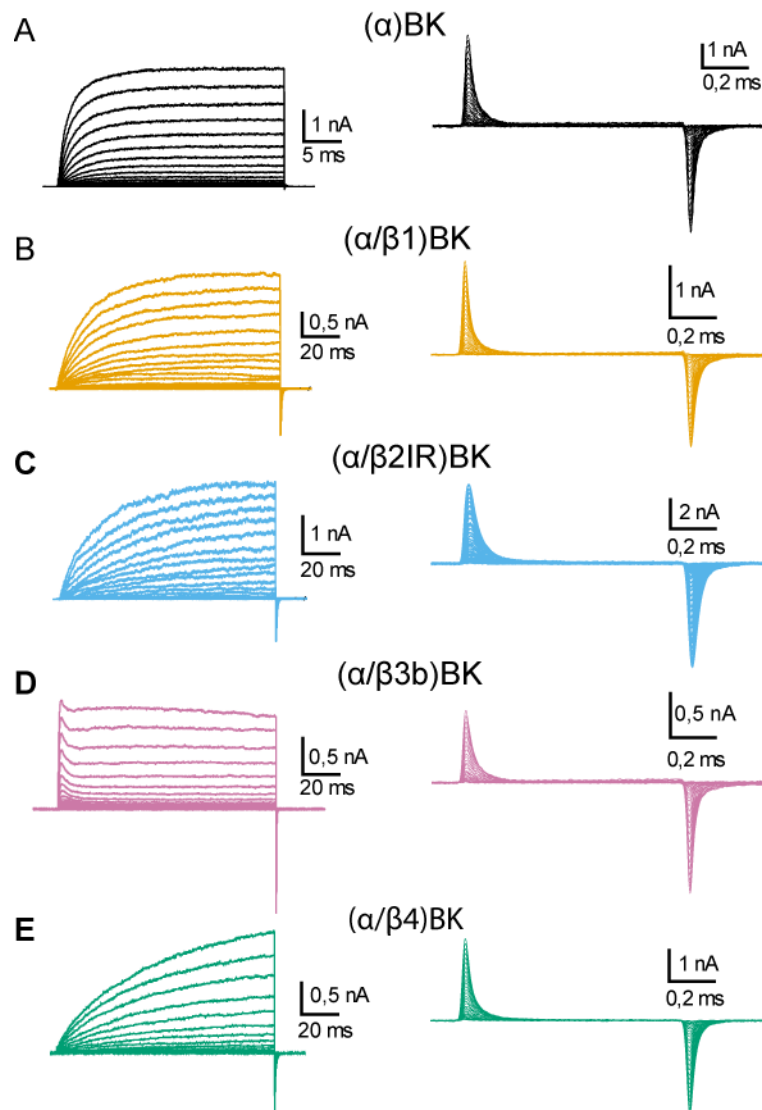


Figura 15.- Corrientes I_K e I_g de canales $(\alpha)BK$ $(\alpha/\beta x)BK$.

(A-E) Columna de la izquierda. Familias representativas de I_K evocados por pulsos de voltaje de 50 ms para $(\alpha)BK$ y 120 ms para los complejos de $(\alpha/\beta x)$, que van desde 0 a 250 mV con incrementos de 10 mV. Las I_K se registraron en 1 mM K^+ simétrico y ~ 5 nM Ca^{+2} . **(A-E) Columna derecha.** Corrientes de compuerta provocadas por pulsos de 1 ms de duración y voltaje de estímulo de -90 a 350 mV con incrementos de 10 mV. La duración del pulso se estableció de manera que las corrientes alcanzaran un estado casi estacionario.

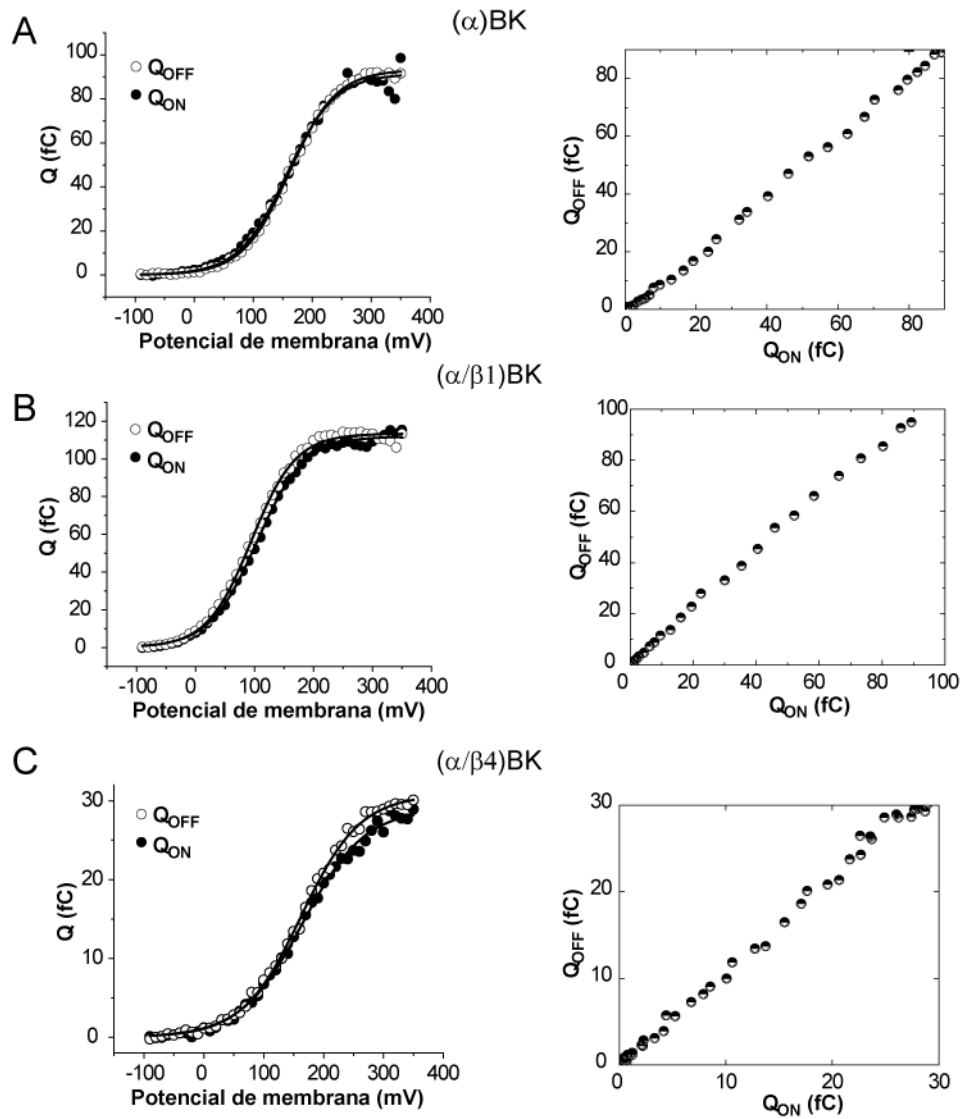


Figura 16.- Comparación entre Q_{ON} y Q_{OFF} evocadas por pulsos de voltaje de 1 ms.

Datos de experimentos individuales de corrientes de compuerta para distintas subunidades β , fueron registradas utilizando el protocolo 1 (métodos 3.2.1), la curva $Q(V)$ (ver métodos 3.2.2) obtenida de la integración del componente I_{gON} y I_{gOFF} son:

- (A) Los datos del ajuste son Q_{ON} : $Q_{max}= 91,4$ fC, $z=0,6$ e, $V_h=161$ mV ; Q_{OFF} : $Q_{max}= 93,1$ fC, $z=0,6$ e, $V_h=159$ mV
- (B) Los datos del ajuste son Q_{ON} : $Q_{max}= 111,8$ fC, $z=0,6$ e, $V_h=103$ mV ; Q_{OFF} : $Q_{max}= 113,3$ fC, $z=0,6$ e, $V_h=94$ mV.
- (C) Los datos del ajuste son Q_{ON} : $Q_{max}= 28,9$ fC, $z=0,48$ e, $V_h=169$ mV; Q_{OFF} : $Q_{max}= 30,7$ fC, $z=0,5$ e, $V_h=167$ mV.

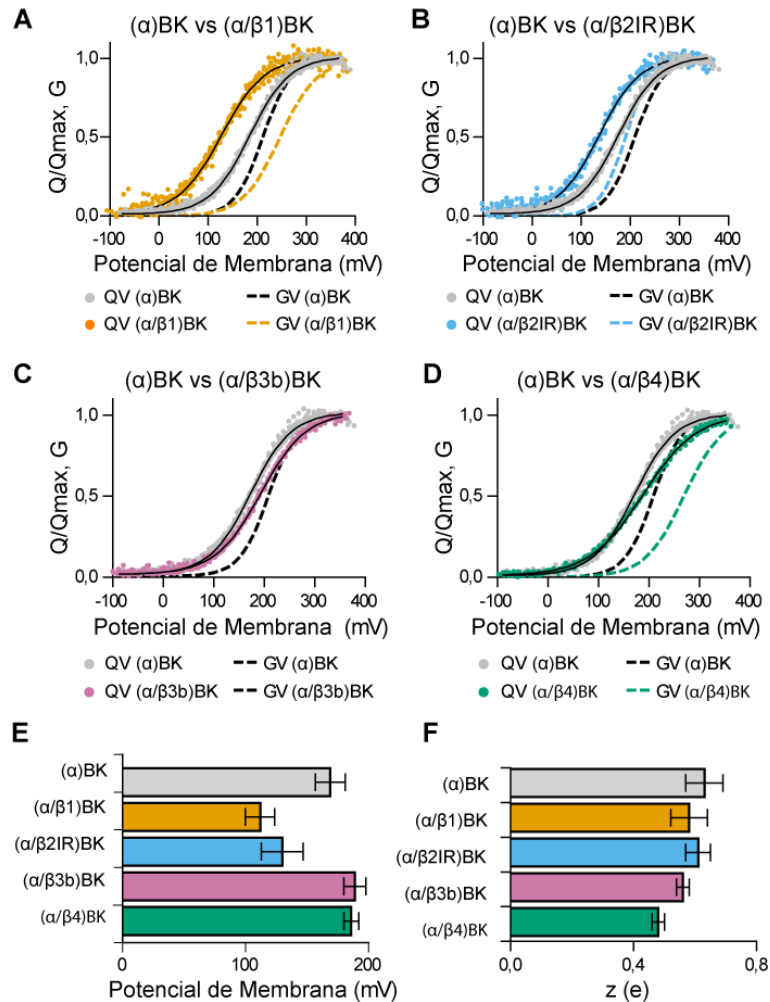


Figura 17.- Relaciones de carga-voltaje para canales (α)BK y ($\alpha/\beta x$)BK.

(A-D) Relaciones $Q(V)$ y $G(V)$ de los complejos (α)BK y ($\alpha/\beta x$)BK indicados. Para poder comparar el comportamiento de (α)BK con los canales ($\alpha/\beta x$)BK, todos los \acute{g} ficos $Q(V)$ incluyen la curva $Q(V)$ de canales formados solo por la subunidad α (arcos grises). Tambi3n se incluyen curvas de $G(V)$ para (α)BK (negro itea discontinua), ($\alpha/\beta 1$)BK (lnea naranja punteada), ($\alpha/\beta 2IR$)BK (lnea discontinua de color azul celeste). La $G(V)$ de canales ($\alpha/\beta 4$)BK (lnea discontinua de color verde azulado) fue obtenida de (Wang y col., 2006). Los datos de muchos experimentos ($n = 7-14$) fueron alineados en el eje de voltaje y desplazados por ΔV_h ($\langle V_h \rangle - V_h$), y luego todos los puntos se ajustaron a una funci3n de Boltzmann.

(E) y (F) La cuantificaci3n de V_h y z obtenidas a partir del ajuste de las $Q(V)$ (media \pm desviaci3n estandar; ver la Tabla 2).

La falta de una fase ascendente, el decaimiento exponencial de I_g (fig 18), y el hecho de que la relación $Q(V)$ es bien descrita por una sola función de Boltzmann indican que un modelo de dos estados, uno en reposo y uno activo, es adecuado para describir el movimiento del sensor de voltaje de los canales (α) BK (Esquema VI; Horrigan y Aldrich, 2002). Este comportamiento del sensor de voltaje se conserva en la presencia de las diferentes subunidades β (Tabla 2). En primer lugar, se encontró que el decaimiento exponencial de I_g y las relaciones $Q_{ON}(V)$ siguen siendo bien descritos por una única constante de tiempo (τ) (Fig. 19) y una única función de Boltzmann, (Fig. 17 B-D). En todos los casos los datos de $\tau(V)$ pueden ser ajustados a la ecuación:

$$\tau(V) = \frac{1}{\alpha(V) + \beta(V)} \quad (16)$$

donde la constante de rapidez $\alpha(V)$ hacia el estado activo está dada por:

$$\alpha(V) = \alpha_0 \exp(z\delta e_0 V / kT) \quad (17)$$

y la constante de rapidez $\beta(V)$ hacia el estado de reposo está dada por:

$$\beta(V) = \beta_0 \exp(z(\delta - 1)e_0 V / kT) \quad (18)$$

Ambas determinan la constante de equilibrio, J , que caracteriza la transición reposo-activo del sensor de voltaje, es decir, $J(V) = \alpha(V) / \beta(V)$. El parámetro z es el número de cargas efectivas desplazados durante las transiciones, y δ es la distancia

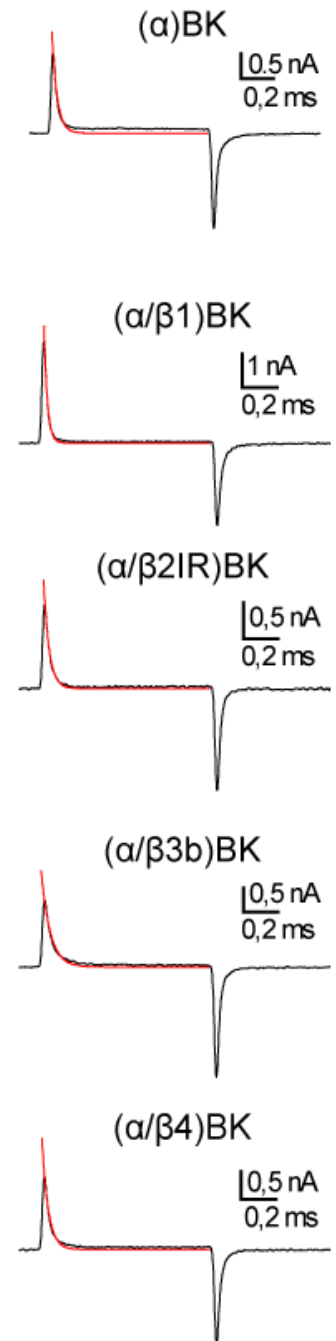


Figura 18.- decaimiento exponencial de I_{gON} .

I_{gON} Ajustada a una función de decaimiento exponencial (línea roja).

eléctrica a la que se encuentra el pico de la barrera de energía que separa los estados de reposo y activo del sensor. Como se espera de un modelo de dos estados el V_h de las curvas $Q(V)$ y el máximo de las curvas de $\tau(V)$ para la $(\alpha/\beta_1)BK$ y $(\alpha/\beta_2)BK$ obtenido a partir del ajuste a los datos $\tau(V)$ a ec. (16) se encuentra desplazado hacia la izquierda en comparación con $(\alpha)BK$ por 50 y 30 mV, respectivamente (Fig. 19 B y C, Tabla 3). El valor obtenido para δ indica que la barrera de energía que separa los estados de reposo y activa del sensor de voltaje es altamente asimétrica y que la mayor parte de la dependencia de voltaje reside en el retorno al estado de reposo del sensor (la constante de velocidad β). El comportamiento del sensor de voltaje de $(\alpha/\beta_4)BK$ también se puede describir por un modelo de dos estados. Aunque, hay una diferencia entre el máximo de $\tau(V)$ y el V_h de la $Q(V)$, esto puede ser explicado como un cambio δ como consecuencia de la disminución del número de cargas efectivas (z) en presencia de β_4 .

		$(\alpha)BK$	$(\alpha/\beta_1)BK$	$(\alpha/\beta_2)BK$	$(\alpha/\beta_3)BK$	$(\alpha/\beta_4)BK$
V_h(mV)	promedio	169	112	130	189	186
	SD	12	12	17	9	6
z (e0)	promedio	0,63	0,58	0,61	0,56	0,48
	SD	0,06	0,06	0,04	0,02	0,02

Tabla 2.- Parámetros de ajuste de relación Q-V de canales $(\alpha)BK$ y $(\alpha/\beta_x)BK$.

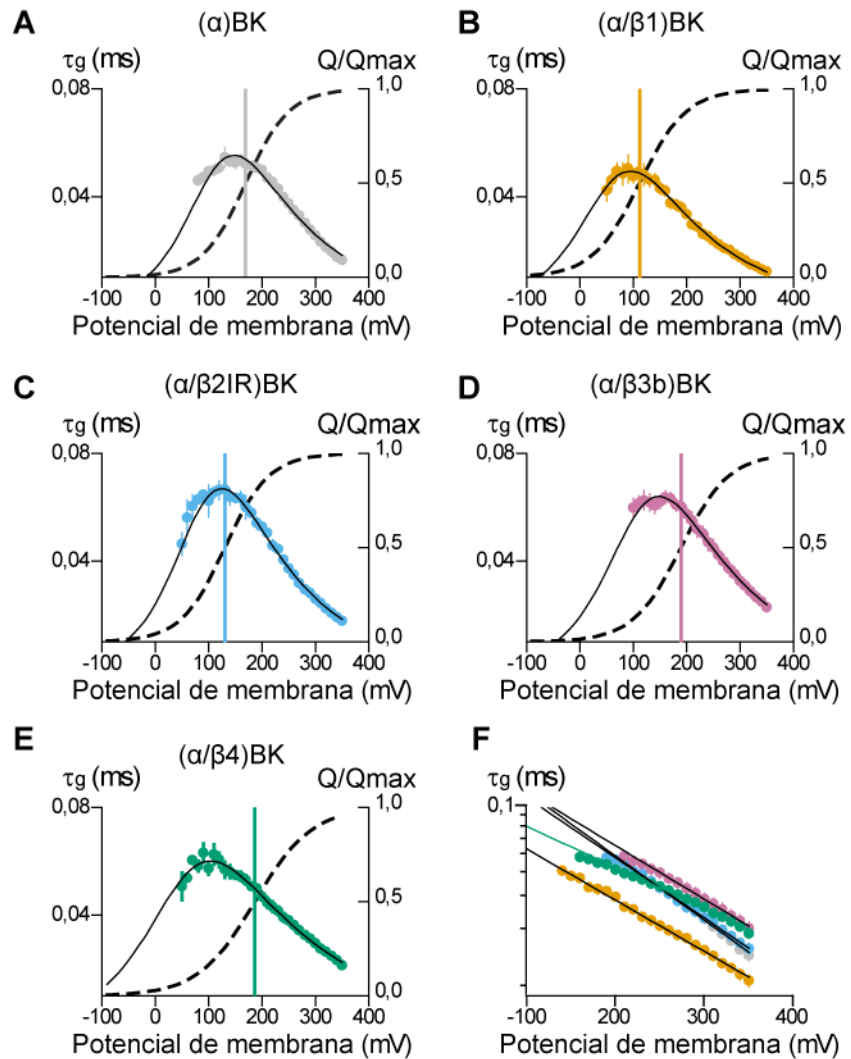


Figura 19.- Cinética de la compuerta de carga.

(A-E) Los decaimientos exponenciales de I_{gON} fueron ajustados con una función exponencial y las constantes de tiempo (τ_g , media \pm SEM) se grafican como función del potencial de membrana. La línea de color negro sólido es el mejor ajuste a un modelo de dos estados (ver Tabla S1). Todos los gráficos incluyen el ajuste de la curva de Boltzmann $Q(V)$ (líneas de trazos en la AE) y el correspondiente V_h se indica mediante una línea vertical de la curva $Q(V)$ (línea de color sólido en AE).

(F) El rango exponencial de cada gráfico fue ajustado a una función mono exponencial que se muestra como líneas de color negro en un gráfico semilog, con la excepción de ($\alpha/\beta 4$) BK que se muestra por una línea verde.

Canal	z (e_0)	δ	α_0 (s^{-1})	β_0 (s^{-1})
(α)BK	0,63	0,29	4476	70235
(α/β_1)BK	0,58	0,30	7264	27860
(α/β_{2IR})BK	0,61	0,30	4195	37324
(α/β_{3b})BK	0,56	0,30	4087	47540
(α/β_4)BK	0,48	0,28	6928	19130

Tabla 3.- Parámetros del ajuste de la cinética de I_g .

Mejor ajuste a un modelo de dos estados. El valor z se obtuvo del ajuste a la relación $Q(V)$ de los diferentes canales (tabla 2).

3.2.- Movimiento de carga lenta en canales BK.

Los movimientos de carga que ocurren durante pulsos de 1 ms corresponden casi en su totalidad a transiciones de los VSD entre estados cerrados. El modelo HA predice que las transiciones de apertura del canal y del VSD entre estados abiertos, también tienen movimientos de cargas asociadas pero con constantes cinéticas distintas. A medida que la duración del pulso de voltaje aumenta los VSD se activan y el canal alcanza su paso limitante que es la transición de apertura ($C \leftrightarrow O$). En el caso de los canales (α)BK la carga asociada a la transición de apertura es menor ($z=0,3$ e) que la asociada a la activación de los VSD ($z=0,6$ e) (Horrigan y Aldrich, 2002); además la apertura es más lenta que la activación de los VSD, lo que sigue que este componente de carga no será detectada en el componente de activación (ON) de I_g . Sin embargo, puede detectar un aumento de la carga al final del pulso (Q_{OFF}), durante la repolarización. A medida que los pulsos de voltaje se prolongan, más y más canales contienen la carga desplazada por la apertura de los canales y movimiento entre estados abiertos lo que se traduce en componente de carga que tiene una cinética más lenta y (Horrigan y Aldrich, 1999, 2002). Para caracterizar los componentes cinéticos de carga posiblemente asociados a la apertura de los canales, diseñamos varios protocolos de pulsos de voltaje con

diferentes duraciones desde 0,04 a 120 ms (ver figura 20), y fueron utilizados para separar los diferentes componentes cinéticos de las I_g .

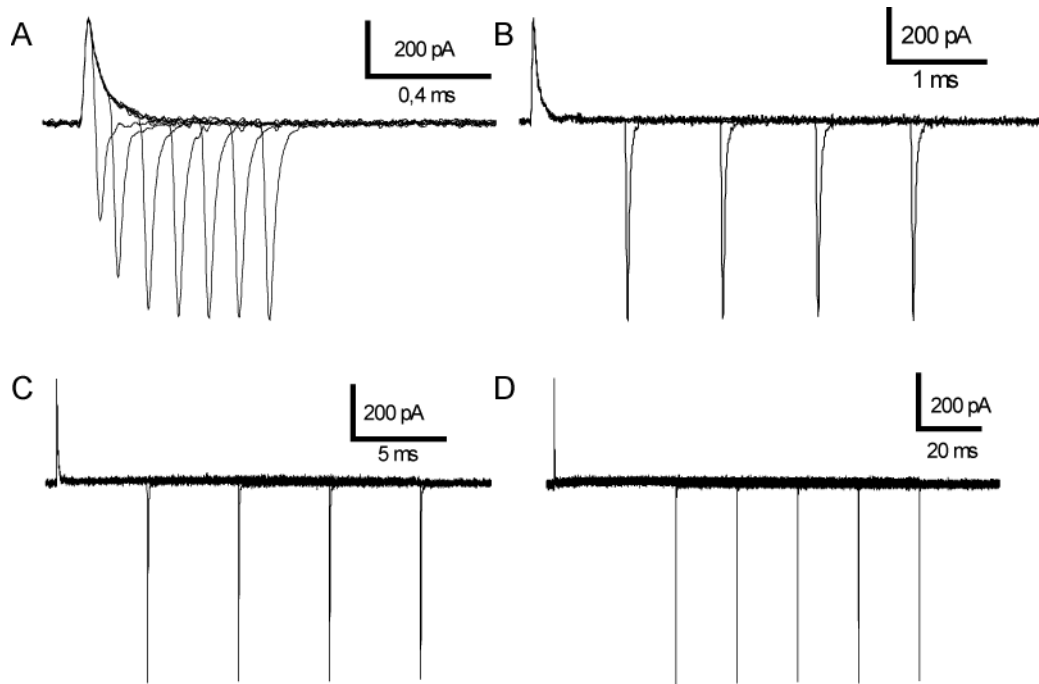


Figura 20.- Familia representativa de registros de I_{gOFF} .

(A, B, C y D) Registros representativos de I_g evocadas por pulsos de 200 mV con diferentes duraciones de 0,04 a 120 ms. Cada familia de I_g se registró con un protocolo de voltaje de magnitud fija (200 mV) y duración variable (protocolo 2, ver métodos 3.2.1).

La figura 21A muestra que para canales (α)BK, tal como predice el modelo alostérico, la contribución relativa del componente lento de Q_{OFF} aumenta con el voltaje de estimulación. Esta es una clara indicación de la existencia de componentes lentos adicionales en I_{gON} cuyas amplitudes son demasiado pequeñas para ser detectados durante el pulso ON , pero se puede detectar durante la repolarización porque la carga regresa más rápido. La cantidad de Q_{OFF} como una función de la duración del pulso ($Q_{OFF}(V)$) es bien descrita por una función bi-exponencial (línea continua Fig. 21A).

La existencia de dos componentes en la cinética de Q_{OFF} fue reportada por (Horrigan y Aldrich, 1999, 2002) para los canales BK en la ausencia de Ca^{+2} . Ellos explicaron este comportamiento en términos del modelo alostérico descrito en el del esquema V. La despolarización de la membrana desplaza el equilibrio de los VSD ($R \leftrightarrow A$) hacia A, y este proceso genera la corriente de compuerta rápida que cuando se integra en el tiempo da Q_{fast} . La activación de los sensores de voltaje desplaza el equilibrio $C \leftrightarrow O$, hacia el estado abierto debido al acoplamiento alostérico, a través de la constante de acoplamiento alostérico D. Como la constante de equilibrio $C \leftrightarrow O$, L, también es dependiente de voltaje ($L = L_0 \exp(-z_L * eV/kT)$), la transición de cerrado a abierto desplaza z_L cargas elementales. Debido a que la transición $C \leftrightarrow O$ es lenta, la carga transportada contribuye al componente Q_{Slow} de Q_{OFF} . La carga lenta refleja el movimiento de los sensores entre estados abiertos cuya cinética está determinada por una etapa limitante ($C \leftrightarrow O$).

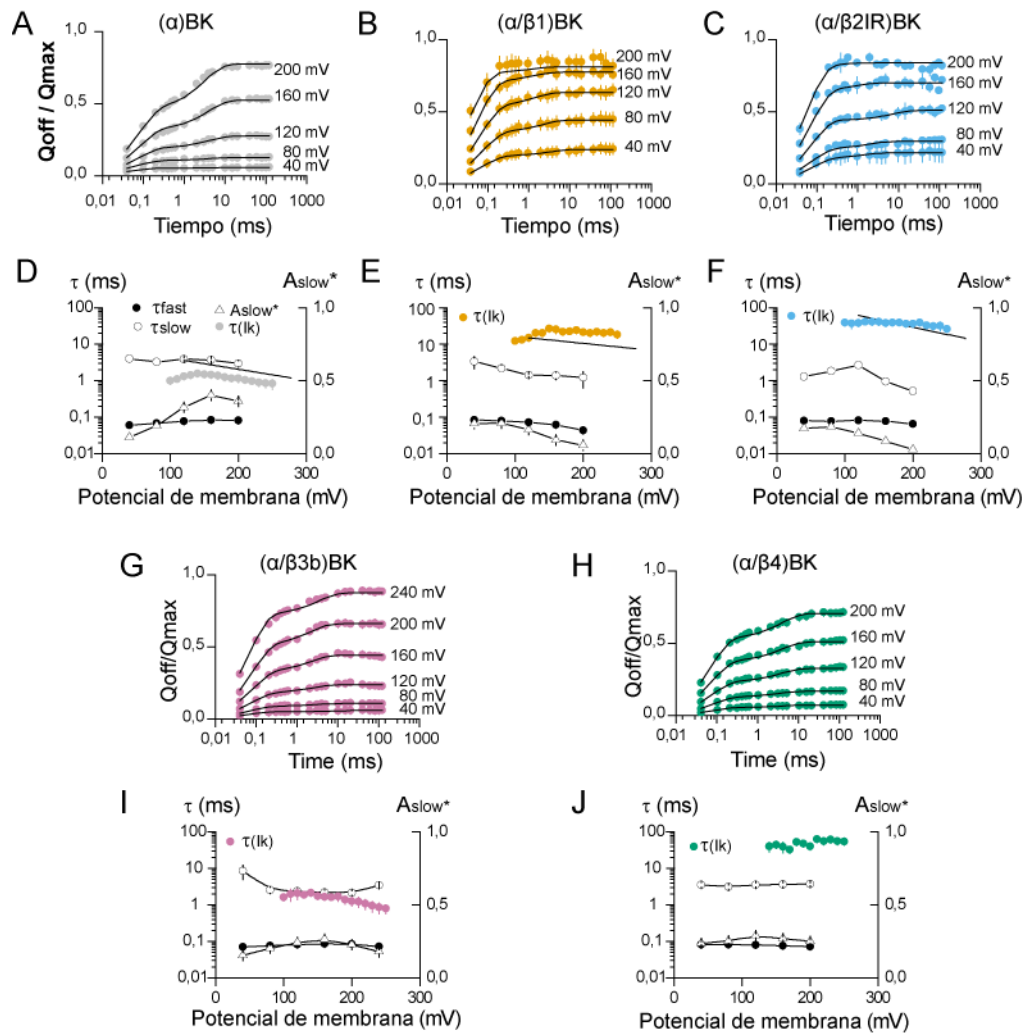


Figura 21.- Cinética del componente de carga lento.

(A, B, C, G,H) Carga OFF en función de la duración del pulso de voltaje para canales (α) BK y $(\alpha/\beta x)$ BK ($x = 1-4$). La carga OFF (Q_{OFF} ; círculos rellenos, media \pm SEM) se integró en un rango de 1 ms, normalizado respecto a la Q_{MAX} de cada parche y se representó frente a la duración de pulso (el tiempo en escala logarítmica) para los diferentes pulsos de voltaje (40, 80, 120, 160 y 200 mV). Las relaciones Q_{OFF} -t fueron ajustadas a una función exponencial de dos componentes (línea continua) con una constante de tiempo de la componente rápida limitada al ajuste exponencial de I_{GON} a esos voltajes.

(D, E, F, I y J) Parámetros que definen los componentes rápido y lento en función del voltaje para canales (α) BK y $(\alpha/\beta x)$ BK ($x = 1-4$). Para la comparación también se muestran las constantes de tiempo de la activación I_K ($\tau(I_K)$, los círculos de color llenos). Las constantes de tiempo de los componentes rápido de I_g ($\tau(Q_{fast})$) están representados por los círculos abiertos y las constantes de tiempo de los componentes lentos ($\tau(Q_{slow})$) están representados por los círculos rellenos; A_{slow}^* es la amplitud fraccionada de los componentes lentos ($A_{slow}^* = A_{slow} / (A_{fast} + A_{slow})$, triángulos abiertos). Las figuras D,E y F incluyen los ajustes de la constante de activación I_K reportadas por Orio y Latorre (en la ref. (Orio y Latorre, 2005), Graficadas como líneas de color negro).

El modelo HA (Horrigan y Aldrich, 2002), predice que la constante de tiempo de Q_{slow} debe coincidir con la constante de activación de la corriente iónica tal como lo observamos para $(\alpha)BK$ (Fig. 21D). Esta coincidencia se pierde con la presencia de las distintas β . Los componentes más lentos del movimiento de carga de $(\alpha/\beta1)BK$, $(\alpha/\beta2IR)BK$ y $(\alpha/\beta4)BK$ son de menor tamaño y su contribución relativa va disminuyendo a potenciales más positivo donde se espera una mayor fracción de canales abiertos (Fig.21 B,C y H). Esto puede apreciarse mejor en el comportamiento de la amplitud de la componente lento (en A_{slow} . Fig. 21 D, E y F). Para canales $(\alpha/\beta1)BK$, $(\alpha/\beta2IR)BK$ y $(\alpha/\beta4)BK$, la amplitud de A_{slow} es grande, incluso a voltajes en los que la P_O es muy baja. Por otra parte, para estos canales, la constante de tiempo de Q_{slow} es entre 10-30 veces más rápida que para la activación de I_K (Fig. 21 D, E y F). Se puede argumentar que las diferencias en $\tau(Q_{slow})$ y $\tau(I_K)$ se deben a las diferencias en las condiciones experimentales en las que se obtuvieron los datos de I_g y los de I_K . Es posible que la composición iónica, y en particular que $[K^+]$ impacte tanto el equilibrio como la velocidad de las corrientes iónicas. Para descartar esta posibilidad, se midieron las constantes de tiempo de activación de I_K de registros obtenidos en 1 mM de K^+ simétrico. (Fig. 21, círculos de color), y encontramos que es similar al $\tau(I_K)$ obtenido en 100 mM K^+ simétrico (véanse círculos de color con línea continua en la. Fig. 21 D, E y F).

3.3.- Modelo alostérico de tres pisos.

Nuestros resultados con canales BK asociados con las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ muestran que Q_{OFF} también tiene un componente lento pero que aparece a voltajes donde el equilibrio de la transición $C \leftrightarrow O$ está totalmente desplazado hacia el estado cerrado (fig 21 F). Este resultado es incompatible con el modelo alostérico HA. Esto se puede ver la figura 22, nuestros datos registrados en canales $(\alpha)BK$ se ajustan bien al modelo HA, en un ajuste donde solo variamos el número de canales conservando los parámetros del ajuste reportado en (Horrigan y col., 1999), sin embargo los datos obtenidos para canales $(\alpha/\beta 1)BK$ tienen un componente lento de carga que aparece a voltajes que no pudo ser descrito por este tipo modelos (fig 22 F). Por lo tanto, planteamos un modelo en que la transición $C \leftrightarrow O$ se divide en dos pasos transformándose en $C \leftrightarrow C \leftrightarrow O$ (Fig. 23): En este modelo el componente lento de Q_{OFF} representa la carga transportada debido a la transición desde el estado cerrado más profundo, C_0 , a otro estado cerrado intermedio, C_1 , y es independiente de la transición final desde C_1 a el estado abierto. Esta última transición se rige por la constante de equilibrio M que puede ser dependiente de voltaje y desplazar carga, pero se espera que la amplitud de la I_g asociada no sea medible, ya que la apertura del canal en la presencia de $\beta 1$ es muy lenta. Con este estado cerrado intermedio, el modelo alostérico de 10 estados HA de dos niveles pasa a ser uno de 15 estados de tres niveles, (Fig. 23) y se debe añadir una nueva constante de acoplamiento alostérico E al esquema.

El análisis de estado estacionario de la I_g , es decir, la determinación de Q_{fast} y Q_{slow} como una función del voltaje es suficiente para hacer una primera aproximación de las constantes de equilibrio J y L como una función del voltaje y la constante de acoplamiento alostérico D . Aumentamos el modelo para describir la cinética de los procesos, por la división de las constantes de equilibrio J , L y M en constantes de rapidez hacia adelante y hacia atrás (Fig. 23).

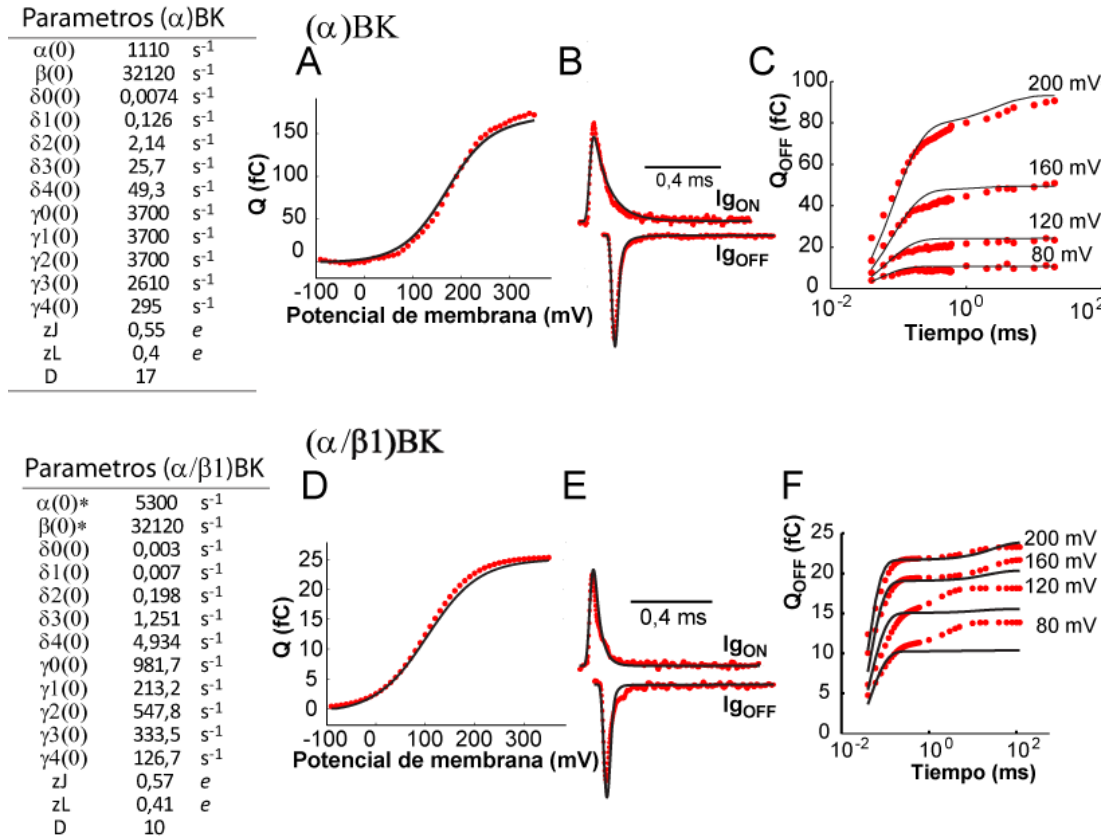


Figura 22.- Ajuste global de (α)BK y (α/β_1)BK al modelo alostérico.

Los datos de las relaciones $Q(V)$, $Q_{OFF}(t)$ y la cinética de las I_g fueron ajustados utilizando los parámetros obtenidos para (α)BK por (Horrigan y col., 1999) y para (α/β_1)BK por (Bao y Cox, 2005); para el ajuste solo se deja libre el número de canales. Los parámetros se muestran en la tabla de la derecha. En todas las figuras de círculos rojos son los datos y la línea negra es el ajuste.

(A y D) Relación $Q(V)$.

(B y E) ajuste de I_{gON} y I_{gOFF} , evocadas por un pulso de 200 mV y 20 ms.

(C y F) Curva $Q_{OFF}(t)$, a los voltajes que se indican al lado derecho de cada curva.

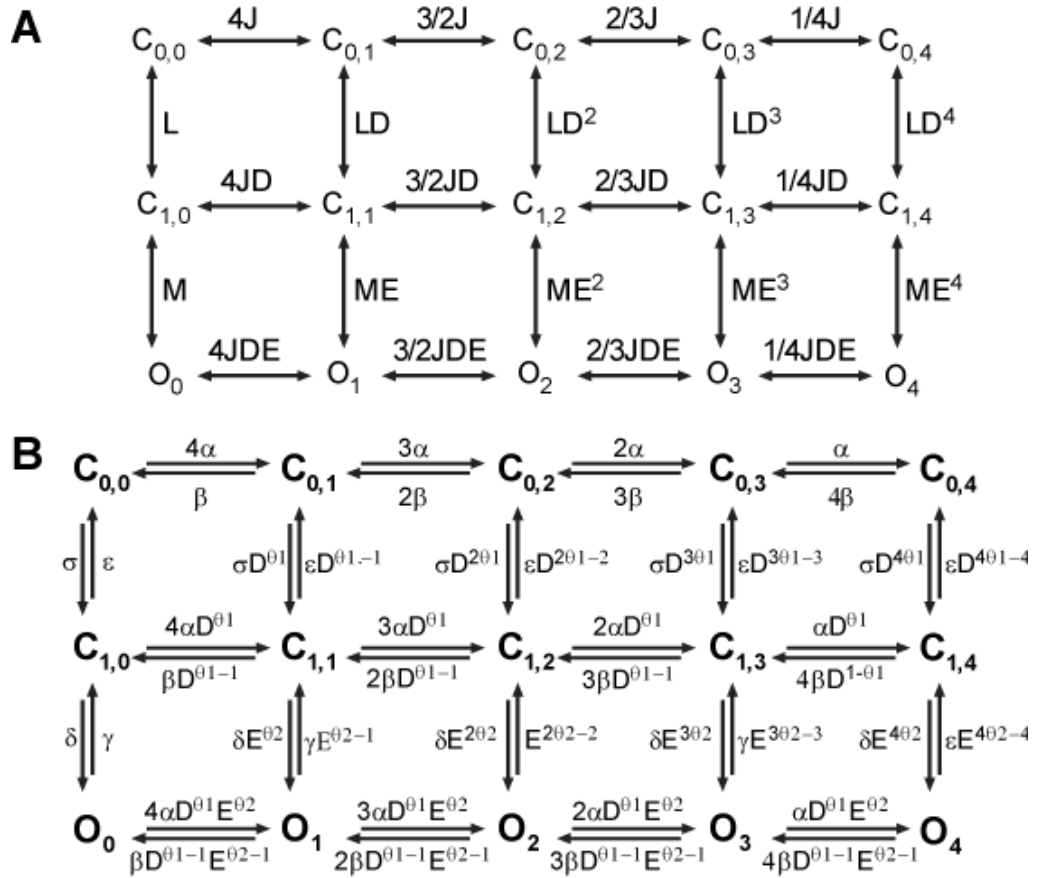


Figura 23.- Modelo alostérico de tres pisos.

(A) Modelo alostérico en la que la compuerta del canal se abre en dos etapas sucesivas. El equilibrio entre la primera y segunda fila de estados cerrado se rige por L y el factor de alostérico D mientras que los factores alostéricos M y E describen el equilibrio entre $C_{1,0}$ a $C_{4,0}$ y O_1 a través O_4 .

(B) El diagrama muestra en cada fila los estados correspondiente a la diferente combinación de los cuatro sensores de voltaje ya sea en la posición de reposo o activo con constantes de rapidez $\alpha(V)$ y $\beta(V)$. Cada columna representa una puerta que se abre en dos etapas, la primera se rige por las constantes de rapidez σ y ε que conectan a un estado cerrado intermedio que se abre y se cierra con constantes de rapidez δ y γ respectivamente. Con la activación de cada sensor de voltaje, estas transiciones son favorecidos por los factores alostérico D y E. Estas constantes alostéricas influirán en la constante de rapidez de avance por una fracción θ mientras que las constante de rapidez hacia atrás lo harán por una fracción $(\theta-1)$.

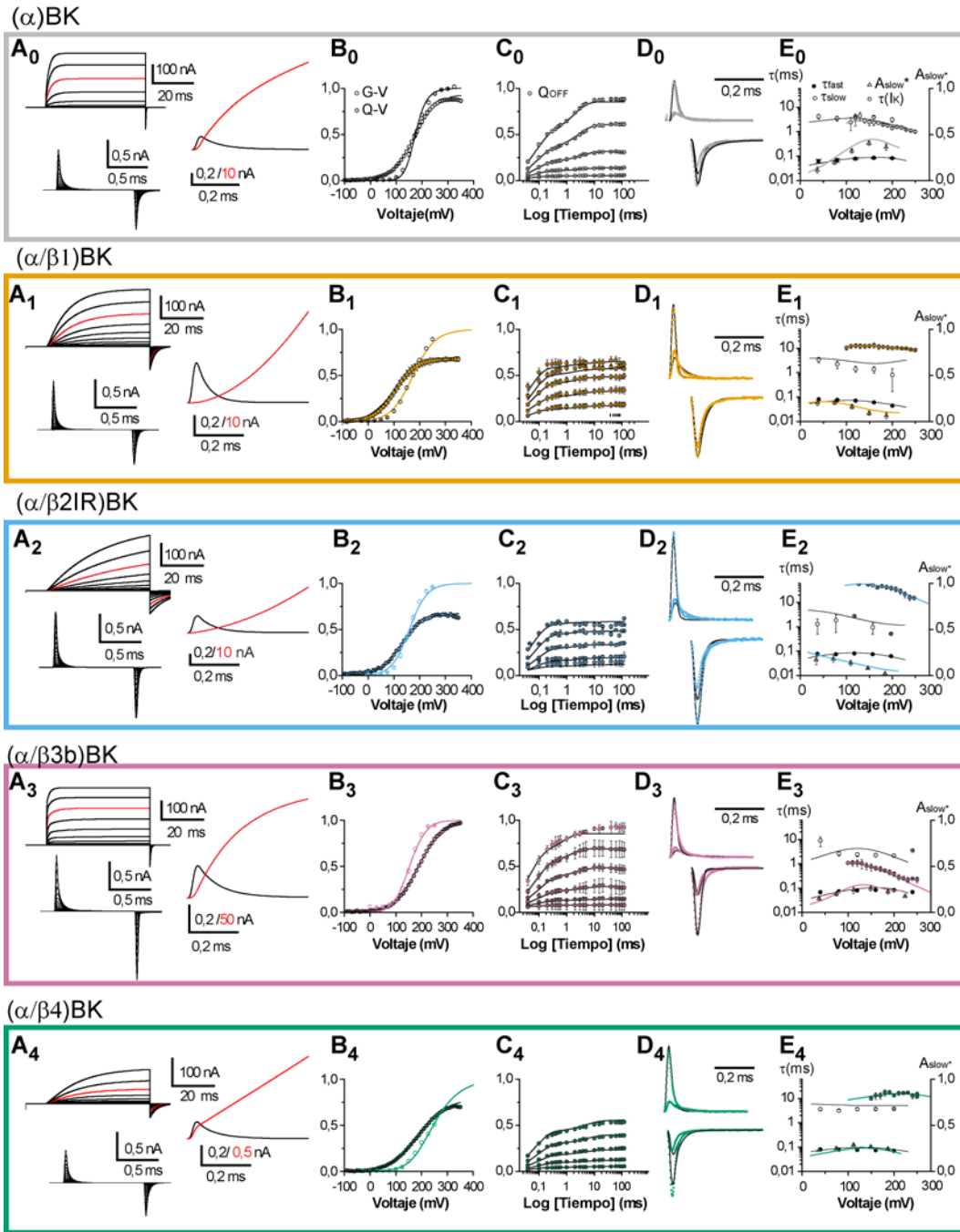


Figura 24.- Simulación y ajuste de resultados al modelo alostérico de tres pisos.

Para cada combinación de canales $(\alpha)BK$ y $(\alpha/\beta_x)BK$ ($x = 1-4$). El subíndice de la letra en la figura corresponde a la subunidad β_x . Los datos de las figuras 11 y 15 fueron ajustados al modelo alostérico de la figura 16 B, Los parámetros del mejor ajuste global se encuentran en la tabla 4; cada figura contiene el resultado del ajuste global, graficado como líneas, junto a datos experimentales graficados como símbolos según se detalla en la leyenda de la figura. Los datos experimentales fueron normalizados por Q_{max} o por G_{max} según corresponde. **(A_x)** experimentos simulados de I_K y I_G . **(B_x)** Relación $Q(V)$ y el P_o (línea de color), junto con los datos experimentales. **(C_x)** curva $Q_{OFF}(t)$. **(D_x)** I_{GON} y I_{GOFF} junto con los respectivos datos **(E_x)** Dependencia de voltaje de las constantes de tiempo de Q_{OFF} e I_K .

$R \leftrightarrow A$	$\alpha (s^{-1})$	$\beta (s^{-1})$	z_{α}	δ_{α}
(α)BK	800	42000	0,55	0,5
($\alpha/\beta 1$)BK	2400	20000	0,51	0,5
($\alpha/\beta 2$ IR)BK	930	21000	0,57	0,4
($\alpha/\beta 3 b$)BK	56	25000	0,57	0,5
($\alpha/\beta 4$)BK	650	77000	0,49	0,6

$C_0 \leftrightarrow C_1$	$\sigma (s^{-1})$	$\varepsilon (s^{-1})$	z_{ε}	δ_{ε}	D	θ_1
(a)BK	100	300	0	0	3,8	0,5
(a/b1)BK	93	220	0,35	0,8	1,6	0
(a/b2IR)BK	145	44	0,4	0,3	1,5	1
(a/b3b)BK	20	5,9	0	0	11,6	1,1
(a/b4)BK	125	36	0,15	0,6	5,1	0

$C_1 \leftrightarrow O$	$\delta (s^{-1})$	$\gamma (s^{-1})$	z_{γ}	δ_{γ}	E	θ_2
(a)BK	1,9	8200	0,9	1,1	2	0
(a/b1)BK	3,8	160	0,63	0,6	0,8	0
(a/b2IR)BK	2,7	47	0,76	0,7	1	0
(a/b3b)BK	4,9	1200	1	0,8	0,6	0
(a/b4)BK	1	260	0,4	0,9	1,6	0

Tabla 4.- Parámetros del ajuste global al modelo de tres pisos.

Los parámetros p_k que definen modelo de la figura 22, que mejor describe los datos fue obtenido por ajuste global como se detalla en la sección 3.2.4. Cada tabla contiene el valor de las constantes de las transiciones $R \leftrightarrow A$, $C_0 \leftrightarrow C_1$ y $C_0 \leftrightarrow O$ respectivamente.

Los resultados del ajuste para canales BK compuestos por (α), ($\alpha/\beta 1$), ($\alpha/\beta 2$ IR), revelan que tanto la dependencia de voltaje como la posición de la barrera de la transición $R \leftrightarrow A$ no cambian considerablemente. Tal vez $\beta 4$ disminuya levemente la carga desplazada por los sensores pero puede estar dentro de los errores del ajuste. Lo que sí está claro es que las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ estabilizan el estado activo de VSD enlenteciendo el proceso de desactivación de los sensores de potencial (tabla 4; $R \leftrightarrow A$, parámetro β_0). Por el contrario, la presencia de $\beta 3b$ enlentece de manera significativa la cinética de activación de VSD ($\alpha_0=56 s^{-1}$ tabla 4), aun

cuando la cinética de I_K y la curva $Q(V)$ observadas no varían con respecto a canales (α)BK (fig 17 y 19). Esto se puede explicar si la carga observada proviene principalmente de transiciones entre estado cerrados intermedios ($C_{1,n} \leftrightarrow C_{1,(n+1)}$) o abiertos ($O_n \leftrightarrow O_{(n+1)}$) ya que en ambos casos α_0 está incrementada D veces ($\alpha_0 \cdot D \approx 660 \text{ s}^{-1}$). Este modelo explica las diferencias de la cinética de activación de I_K entre las distintas β , como una consecuencia de la estabilización de un estado cerrado intermedio ($C_{1,i}$). Los valores del ajuste muestran que las subunidades con cinética de activación lenta β_1 , β_2 y β_4 , están desenmascarando una transición ($C_{0,i} \leftrightarrow C_{1,i}$) que en canales compuestos solo por α posiblemente esta enmascarada. Sin embargo, esta transición es muy lenta y no puede ser detectada en la Q_{OFF} y solo se manifiestan en el curso temporal de I_K . Nuestros resultados son consistentes con los resultados de Horrigan y Aldrich (2002), quienes para explicar la dependencia de Ca^{+2} de la cinética de activación ($\tau(I_K)$) del canal (α)BK propusieron que la apertura ($C \leftrightarrow O$) involucra dos barreras energéticas y que solo una de ellas es perturbada por la unión de Ca^{+2} (ver fig 15 en Horrigan y Aldrich, (2002)). Nuestros resultados muestran que las subunidades β_1 , β_2 y β_4 , modifican esta barrera de manera tal que estabilizan un estado intermedio ($C_{1,i}$).

3.4.- determinantes estructurales de interacción α - β .

Dado que hemos podido aislar el efecto de las subunidades β sobre los VSD, es pertinente resolver cuáles son los determinantes estructurales involucrados en esta interacción. Para ello utilizaremos quimeras entre subunidades β previamente construidas en el laboratorio. Un grupo se generó intercambiado segmentos de la subunidad $\beta 1$ y con los de $\beta 2$ (Orio y col., 2006); y un segundo grupo utilizando $\beta 1$ y $\beta 3b$. Como mostramos en la sección 4.1 (fig. 17 E), las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, desplazan el $V_h(J)$ hacia la izquierda en -57 mV y -40 mV respectivamente, mientras que la subunidad $\beta 3b$ desplaza el $\Delta V_h(J)$ levemente hacia la derecha. Por lo tanto el grupo de quimeras $\beta 1$ - $\beta 2$ servirá como control, puesto que cualquier cambio entre estas dos subunidades debería estabilizar el estado activo de VSD, mientras que el grupo de quimeras $\beta 1$ - $\beta 3$ permitirá aislar la región de la subunidad que interactúa con el VSD. Para construir las quimeras (esquematisadas en la Fig. 25), las subunidades β fueron segmentadas en tres regiones: el lazo extracelular, los segmentos transmembranales TM1 y TM2 y los

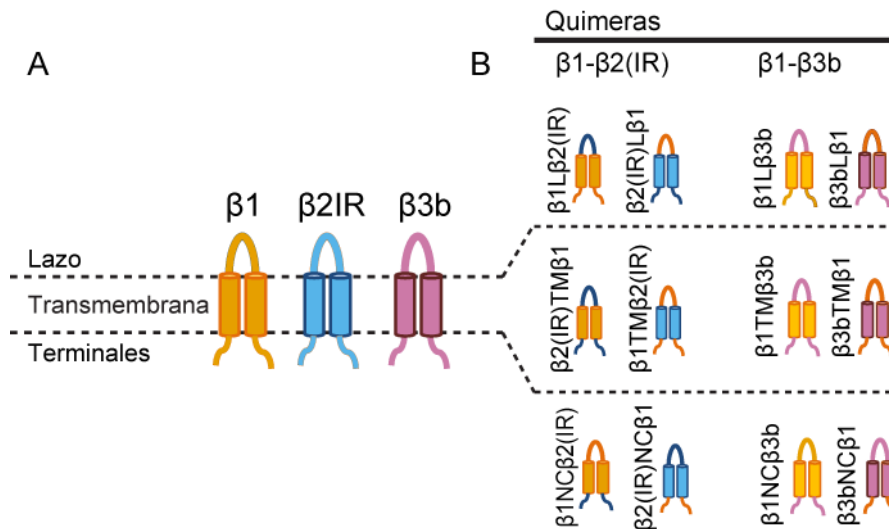


Figura 25.- Esquema de construcción de las quimeras de $\beta 1$ - $\beta 2$ y $\beta 1$ - $\beta 3$

- (A) Modelo topológico de la subunidad β en que hemos dividido la proteína en lazo extracelular, dominios transmembranales y dominios citoplasmáticos.
- (B) Grupo de quimeras probadas divididas en las quimeras entre $\beta 1$ - $\beta 2$ y $\beta 1$ - $\beta 3$.

extremos e intracelulares COOH- y NH₂ - (fig 25 A). Las quimeras en que se intercambiaron los lazos extracelulares de $\beta 1m$ con $\beta 2(IR)$, fueron llamadas $\beta 1L\beta 2(IR)$ ($\beta 1$ con el lazo de $\beta 2IR$) y $\beta 2(IR)L\beta 1$ ($\beta 2(IR)$ con el lazo de $\beta 1$). Quimeras en que se intercambiaron ambos segmentos transmembranales entre $\beta 1$ y $\beta 2(IR)$, fueron llamadas $\beta 1TM\beta 2(IR)$ ($\beta 1$ con los TM de $\beta 2IR$) y $\beta 2(IR)TM\beta 1$ ($\beta 2(IR)$ con los TM de $\beta 1$)(fig 25B). Finalmente las

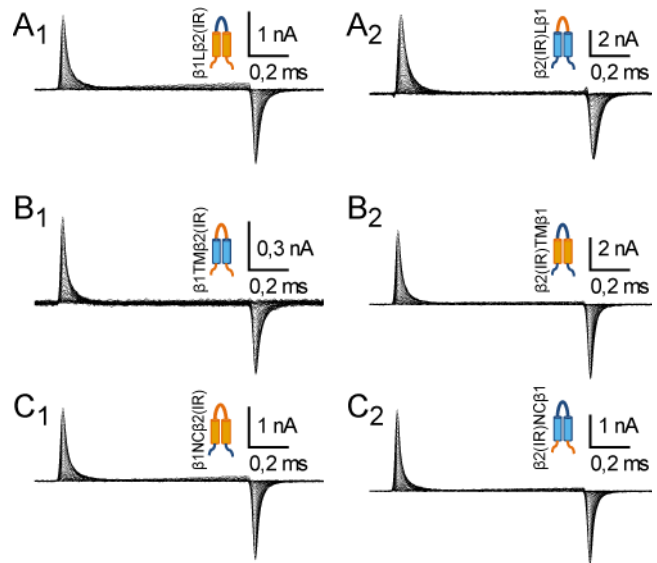


Figura 26.- Familia representativa de I_g registrada al co-expresión de quimeras $\beta 1$ - $\beta 2IR$.

quimeras en las que se intercambian los terminales NH₂- y COOH- fueron llamadas $\beta 1NC\beta 2(IR)$ ($\beta 1$ con los terminales NH₂- y COOH- de $\beta 2IR$) y $\beta 2(IR)NC\beta 1$ ($\beta 2(IR)$ con los terminales NH₂- y COOH- de $\beta 1$)(fig 25B). La figura 26 muestra ejemplos de corrientes I_g obtenidas con la co-expresión de estas quimeras con (α)BK y la fig 27 curvas $Q(V)$ promedio que son comparadas con las descritas previamente para las combinaciones (α)BK $\beta 1$ y (α)BK $\beta 2IR$.

Algunas de estas quimeras presentaron complejidades experimentales. Ovocitos inyectados con $\beta 1L\beta 2IR$ o $\beta 2(IR)L\beta 1$ presentaban una alta mortalidad con distintas preparaciones de RNA hechas por otras dos personas además de mí. La relación $Q(V)$ para la quimera $\beta 1L\beta 2(IR)$ arroja un $V_h=89\pm 6$ mV (n=3), 20 mV más negativo que lo encontrado en canales ($\alpha/\beta 1$)BK (Fig 27 A₁). Sin embargo la quimera inversa $\beta 2(IR)L\beta 1$ parece comportarse como $\beta 2IR$ y da origen a un $Q(V)$ con V_h de 122 mV y $z=0,6$ e (n=4 fig 27 A₃), similar a los canales ($\beta 2IR$)BK. Según

estos datos ambas quimeras ejercen un efecto similar a las respectivas subunidades silvestres estabilizando el estado activado del VSD.

Quimeras en que se intercambiaron ambos segmentos transmembranales $\beta 1\text{TM}\beta 2(\text{IR})$ y $\beta 2(\text{IR})\text{TM}\beta 1$ re-editan el fenotipo de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ respectivamente. La quimera $\beta 1\text{TM}\beta 2(\text{IR})$ tiene un $V_h=107\pm 5$ mV (n=5) similar al de los canales $(\alpha/\beta 1)\text{BK}$ (fig 27 B₃), en tanto que $\beta 2(\text{IR})\text{TM}\beta 1$ tiene un $V_h=119\pm 5$ mV (n=6) similar a $(\alpha/\beta 2\text{IR})\text{BK}$ (fig 27 B₃). Estos resultados sugieren que los segmentos TM1 y TM2 no hacen diferencia en el efecto modulador de cada subunidad sobre el VSD de $(\alpha)\text{BK}$. Finalmente las quimeras en las que se intercambian los terminales NH₂- y COOH- ($\beta 1\text{NC}\beta 2(\text{IR})$ y $\beta 2(\text{IR})\text{NC}\beta 1$ generan divergencias en cuanto al

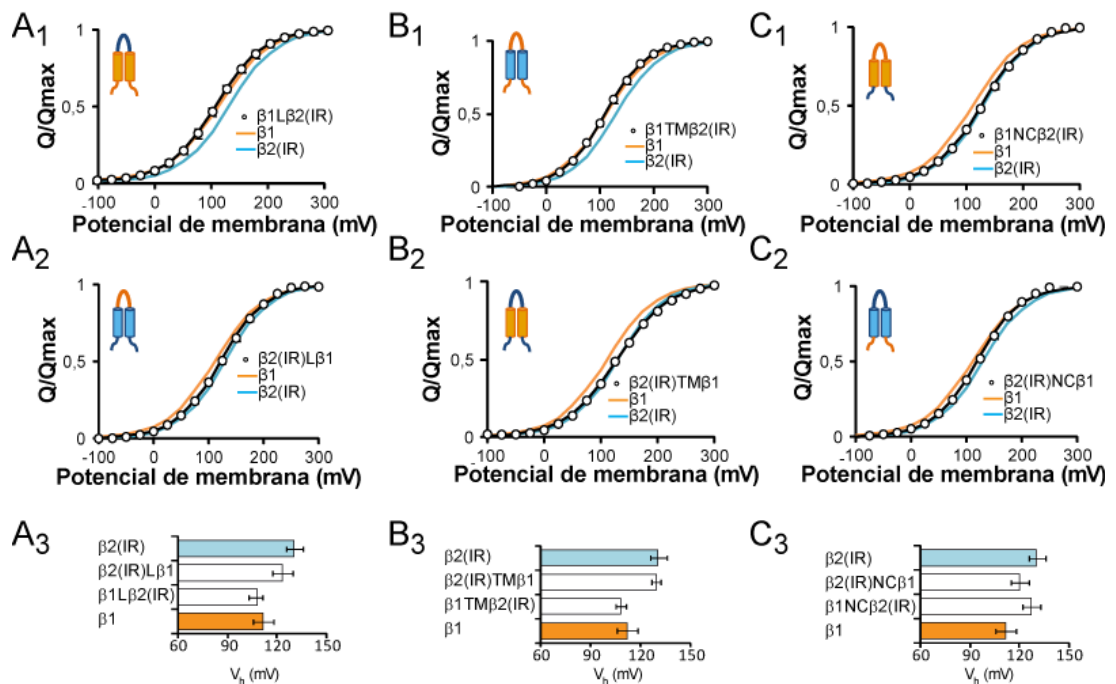


Figura 27.- Comparación del efecto de las quimeras $\beta 1\text{-}\beta 2\text{IR}$ en la relación $Q(V)$.

La primera y segunda fila corresponden a las relaciones $Q(V)$ para cada $\beta 1\text{-}\beta 2$ quimera (círculos abiertos, con una media \pm SEM) y además el ajuste Boltzmann de canales $(\beta 1)\text{BK}$ (línea naranja) y $(\beta 2\text{IR})\text{BK}$ (línea azul). La última fila es la cuantificación de V_h según de los ajustes de una función de Boltzmann a la relación $Q(V)$ (media \pm SEM) **$\beta 1\text{L}\beta 2\text{IR}$** : $V_h=106 \pm 3$ mV, $z=0,6$ e (n=3); **$\beta 2\text{IRL}\beta 1$** : $V_h=119 \pm 4$ mV, $z=0,6$ e (n=4); **$\beta 1\text{TM}\beta 2\text{IR}$** : $V_h=126 \pm 5$ mV, $z=0,6$ e (n=5); **$\beta 2\text{IRTM}\beta 1$** : $V_h=119 \pm 5$ mV, $z=0,6$ e (n=7); **$\beta 1\text{NC}\beta 2\text{IR}$** : $V_h=171 \pm 3$ mV, $z=0,6$ e (n=10); **$\beta 2\text{IRNC}\beta 1$** : $V_h=111 \pm 5$ mV, $z=0,6$ e (n=9).

desplazamiento V_h . Para la quimera $\beta 1\text{NC}\beta 2(\text{IR})$ coexpresada con $(\alpha)\text{BK}$ la relación $Q(V)$ tiene un $V_h=125\pm 5$ mV ($n=7$) similar al encontrado con canales $(\alpha/\beta 2\text{IR})\text{BK}$ (fig 27-C₃). Sorprendentemente la quimera inversa $(\beta 2(\text{IR})\text{NC}\beta 1)$ co-expresada con $(\alpha)\text{BK}$ también da lugar a una relación $Q(V)$ con similar al encontrado con canales $(\alpha/\beta 2\text{IR})\text{BK}$ ($V_h=118\pm 5$ mV ; $n=6$), (fig 27-C₃).

La primera conclusión de estos experimentos es que cada una de estas quimeras preserva la habilidad de desplazar la relación $Q(V)$ hacia la izquierda en una magnitud comparable a $\beta 1$ y $\beta 2$. Lo que es más difícil de decidir es cuál de los distintos segmentos es más relevante para este efecto, ya que las diferencias de V_h entre las $Q(V)$ de canales $(\alpha/\beta 1)\text{BK}$ y $(\alpha/\beta 2\text{IR})\text{BK}$ es de 18 mV y el error de la media es ± 5 mV aproximadamente (tabla 3). Los únicos dominios que podemos descartar como determinantes moleculares de los efectos de la subunidades β sobre el sensor de potencial son los segmentos transmembranales, además podemos sospechar que el lazo extracelular tiene un rol en este proceso. La solución fue construir quimeras entre subunidades más dispares. Como se había discutido anteriormente, la subunidad $\beta 3b$ pareciera carecer de los elementos para modular el sensor de voltaje ya que V_h de la $Q(V)$ prácticamente no cambia con su co-expresión (ver tabla 2).

Las quimeras construidas intercambiando segmentos entre estas dos subunidades esta resumidas en la figura 25B. Al igual que la subunidad $\beta 2\text{IR}$, la subunidad $\beta 3b$ utilizada carece del dominio de inactivación por lo que su terminal NH_2^- es más corto que la subunidad $\beta 3b$ silvestre. Las quimeras en que se intercambiaron los lazos extracelulares entre $\beta 1$ - $\beta 3b$, fueron llamadas $\beta 1\text{L}\beta 3b$ ($\beta 1$ con el lazo extracelular de $\beta 3b$) y $\beta 3b\text{L}\beta 1$ ($\beta 3b$ con el lazo extracelular de $\beta 1$; fig 25 B). Quimeras en que se intercambiaron ambos segmentos transmembranales entre $\beta 1$ - $\beta 3b$, fueron llamadas $\beta 1\text{TM}\beta 3b$ ($\beta 1$ con los TM de $\beta 3b$) y $\beta 3b\text{TM}\beta 1$ ($\beta 3b$ con los TM de $\beta 1$; fig 25 B). El intercambio de los terminales NH_2^- y COOH^- entre las subunidades $\beta 1$ - $\beta 3b$ generó la quimeras llamadas $\beta 1\text{NC}\beta 3b$ ($\beta 1$ con los terminales NH_2^- y COOH^- de $\beta 3b$) y $\beta 3b\text{NC}\beta 1$ ($\beta 3b$

con los terminales NH₂- y COOH- de β1). La figura 28 muestra familia representativas de I_g al co-expresar estas quimeras con (α)BK en tanto que el análisis de la relación $Q(V)$ e muestra en la figura 29.

Lo primero que debemos destacar es que introducir el lazo de β1 en β3 no es suficiente para rescatar el fenotipo de esta subunidad ya que la $Q(V)$ de la quimera β3bLβ1 es indistinguible de la $Q(V)$ generada por canales

(α/β3b)BK (fig 29 A₂-A₃). Sin embargo la quimera inversa en que el lazo extracelular de β3b es trasplantado a β1 si tiene un efecto, aunque parcial. Es como si la presencia del lazo de β3 interfiriera sobre la capacidad de β1 para modular el VSD. Esto se manifiesta en un menor desplazamiento de V_h (fig 29 A₁-A₃). La figura 29 B₁, B₂ y B₃; muestra que los segmentos transmembranales de β3b no alternan el fenotipo de β1 ya que la quimera β1TMβ3b tiene un V_h similar al de los canales (α/β1)BK(fig 29 B₃), La quimera inversa β3bTMβ1 reedita el V_h encontrado en canales (α/β2)BK(fig 29 B₃). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en quimeras β1-β2, descartando a los TM como determinantes estructural en el rol modulador de VSD.

Caso aparte son los fenotipos de las quimeras β1NCβ3b y β3bNCβ1 co-expresadas con (α)BK. Al analizar las relaciones $Q(V)$ de este tipo de quimeras vemos que el intercambio de los componentes intracelulares (terminales NH₂- y COOH-) acarrea el fenotipo de la subunidad β de origen. Notamos en particular, que la β3bNCβ1 desplaza el V_h de la relación $Q(V)$ hacia la

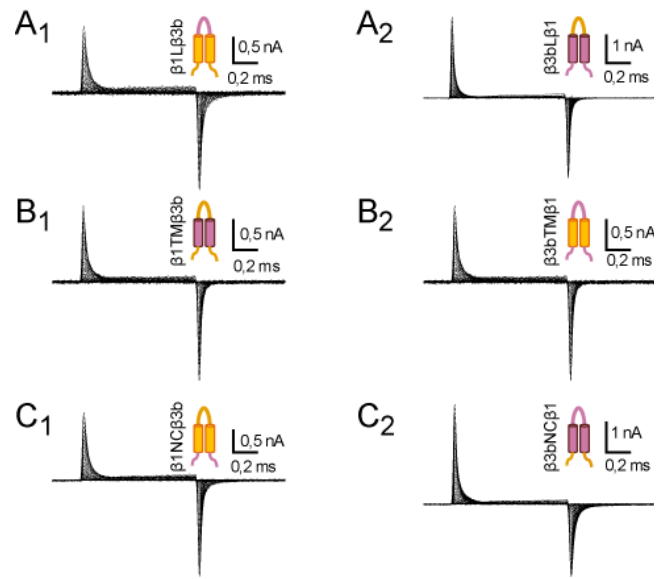


Figura 28.- Familia de I_g registrada al co-expresión de quimeras β1-β3b.

izquierda en el eje del voltaje con igual efectividad que los canales (α/β)BK. Estos resultados están de acuerdo con los resultados encontrados por (Orio y col., 2006), quien identifica los terminales NH₂- y COOH- como los responsables del cambio en la cinética de activación de la I_K. Además indican que de existir diferencias la modulación de VSD entre β 1- β 2 pueden estar contenidas en estos segmentos.

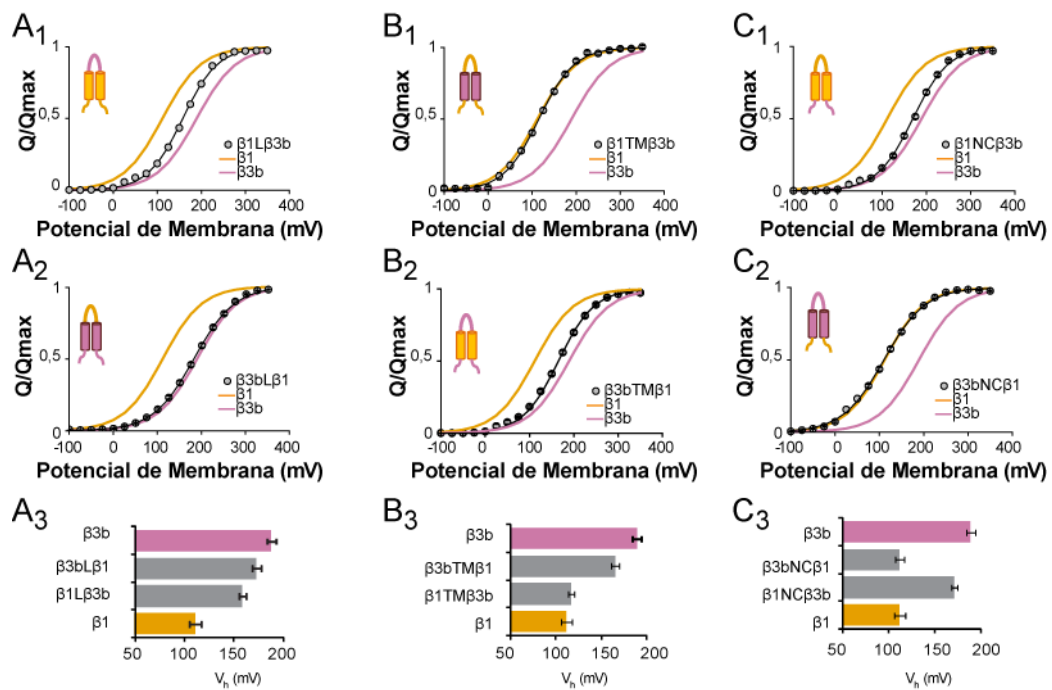


Figura 29.- Comparación del efecto de las quimeras β 1- β 3b en la relación $Q(V)$.

La primera y segunda fila corresponden a las relaciones $Q(V)$ para cada β 1- β 3b quimera (círculos abiertos, con una media \pm SEM) y además el ajuste Boltzmann de canales (β 1) BK (línea naranja) y (β 3b)BK (línea magenta). La última fila es la cuantificación de V_h según de los ajustes de una función de Boltzmann a la relación $Q(V)$ (media \pm SEM) son los siguientes: **β 1L β 3b**: $V_h=157 \pm 3$ mV, $z=0,6$ e ($n=8$); **β 3bL β 1**: $V_h=182 \pm 13$ mV, $z=0,55$ e ($n=9$); **β 1TM β 3b**: $V_h=116 \pm 6$ mV, $z=0,65$ e ($n=7$); **β 3bTM β 1**: $V_h=165 \pm 7$ mV, $z=0,65$ e ($n=8$); **β 1NC β 3b**: $V_h=171 \pm 3$ mV, $z=0,65$ e ($n=10$); **β 3bNC β 1**: $V_h=111 \pm 5$ mV, $z=0,65$ e ($n=9$).

DISCUSION

En esta tesis investigamos la modulación que ejercen las subunidades β sobre el sensor de voltaje de la subunidad α del canal BK. Evaluamos esto de manera directa estudiando las corrientes de compuerta de canales BK compuesto solo por la subunidad α y co-expresados con $\beta 1$, $\beta 2IR$, $\beta 3b$ y $\beta 4$. Los resultados aquí obtenidos demuestran que cada una de estas subunidades β modifica el funcionamiento del sensor de voltaje. Estos resultados fueron ajustados a un modelo alostérico, el cual sugiere que la apertura del canal BK ocurre en dos pasos. Luego, identificamos los determinantes moleculares de la subunidad β que participan en la modulación el sensor de voltaje de la subunidad α .

4.1.- Efecto de la subunidad $\beta 1$ sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2} .

La consecuencias más obvias de la co-expresión de la subunidades $\beta 1$, son el aumento de la sensibilidad aparente Ca^{+2} y el enlentecimiento de cinética de apertura de los canales BK, para los que se han propuesto varios mecanismos moleculares (Nimigean y Magleby, 2000; Orio y Latorre, 2005; Yang y col., 2008) Por otro lado, los estudios de fluorescencia de Savalli y col. (2007), indican que similar a los propuesto para $\beta 1$ por Bao y Cox (2005), la subunidad $\beta 2$ también estabilizaría el estado activo del sensor de voltaje. En este contexto el aumento de la sensibilidad aparente a Ca^{+2} sería una consecuencia de esto último. Sin embargo, aún hay desacuerdos sobre si la subunidad $\beta 1$ actúa puramente sobre el sensor de voltaje o si también cambia la sensibilidad al Ca^{+2} del canal BK (Sweet y Cox, 2008; Yang y col., 2008). Estudios anteriores que reportan aumentos en la P_o en ausencia de Ca^{+2} , sugieren que el aumento de la sensibilidad a Ca^{+2} del canal BK se debería a efectos no relacionados con la unión a Ca^{+2} (Cox y Aldrich, 2000; Savalli y col., 2007). Registros de canal único en ausencia Ca^{+2} revelan la aparición de ráfagas de aperturas de mayor duración cuando la subunidad α se co-expresa con la subunidad $\beta 1$. Estas aperturas sucesivas hacen que la probabilidad de apertura (P_o) aumente 10 veces y desplazaría la relación P_o vs Ca^{+2} hacia la izquierda (Nimigean y Magleby, 2000). La subunidad $\beta 1$ también es capaz de restaurar parcialmente la sensibilidad a Ca^{+2} de un

mutante del canal BK en el que se ha disminuido la sensibilidad a Ca^{+2} mediante la neutralización de los aspartatos contenidos en el tazón de Ca^{+2} (contenido en el RCK2) y en el segundo sitio de alta afinidad de Ca^{+2} en el dominio RCK1. Estos resultados sugieren que en lugar de actuar directamente sobre los sitios de unión de Ca^{+2} , $\beta 1$ modula el acoplamiento alostérico entre los sitios de unión de Ca^{+2} y el PD. Sin embargo, algunos estudios indican que es necesario modificar la afinidad de los sitios de unión a Ca^{+2} para explicar completamente los efectos de esta subunidad sobre la sensibilidad Ca^{+2} (Bao y Cox, 2005; Savalli y col., 2007; Sweet y Cox, 2008). Nuestra conclusión concuerda con los resultados de Yang y col. (2008), quien informó que la neutralización de los residuos sensibles a voltaje contenidos en el segmento S4 de (α)BK, eliminan el desplazamiento hacia la izquierda de la curva $G(V)$ inducida por $\beta 1$, resultado que apoya la hipótesis de que $\beta 1$ mejora la sensibilidad de Ca^{+2} mediante la modificación del sensor de voltaje.

4.2.- Efecto de la subunidad $\beta 2$ sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2}

Aunque, la mayoría de los estudios indican que las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ aumentan la sensibilidad aparente al Ca^{+2} , en la actualidad no está claro si $\beta 2$ también lo hace regulando al sensor de voltaje (Orio y Latorre, 2005; Lee y Cui, 2009; Lee y col., 2010). En particular, se ha propuesto que la subunidad $\beta 2$ modula principalmente el acoplamiento entre la unión de Ca^{+2} y la apertura del canal (Nimigeon y Magleby, 2000). Sin embargo, esta no puede ser toda la historia ya que utilizando la técnica de VCF, Savalli y col. (2007), encontraron que la relación fluorescencia voltaje $F(V)$ para ($\alpha/\beta 2$ IR)BK está desplaza a la izquierda en comparación con la obtenida con (α)BK sugiriendo que, como es el caso de la subunidad $\beta 1$, $\beta 2$ favorece la conformación activada del sensor de voltaje de BK. Aquí, mediante el registro de corrientes de compuerta, demostramos de manera directa que $\beta 2$ estabiliza la configuración activa del sensor de voltaje aunque en menor medida ($\Delta V_h = -40$ mV) que la subunidad $\beta 1$ (Fig. 17B). Esta es la primera demostración directa de la estabilización de la configuración activa del sensor de voltaje y como este efecto da cuenta del aumento de la sensibilidad aparente al Ca^{+2} . Sin embargo, la

neutralización de los mismos residuos sensibles a voltaje de (α)BK que interrumpen la capacidad de $\beta 1$ para aumentar la sensibilidad de Ca^{+2} , no lo hacen con $\beta 2$ (Yang y col., 2008), indicando que los efectos de $\beta 2$ y $\beta 1$ sobre el sensor de potencial son mediados por mecanismos distintos. Queda también por descartar de manera más directa si $\beta 2$ modifica o no la unión de Ca^{+2} .

4.3.- Efecto de la subunidad $\beta 3b$ sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2}

En cuanto a, los efectos de $\beta 3b$, se han detectado cambios en la relación $G(V)$ del canal incluso si se retira el NH_2 - terminal (Zeng y col., 2001) que constituye la compuerta de inactivación. En particular, se reportó que las curvas $G(V)$ de la activación de canales ($\alpha/\beta 3b$)BK se describen mejor por la suma de dos distribuciones de Boltzmann. Nuestros resultados muestran que la co-expresión de la subunidad α con $\beta 3b$ modifica drásticamente el funcionamiento del canal. De acuerdo al ajuste al modelo de 3 pisos, los principales efectos son: el enlentecimiento de la activación de los sensores de voltaje y un incremento del factor de acoplamiento alostérico entre los sensores de voltaje y dominio del poro (ver tabla 4). El incremento de seis veces el factor de acoplamiento alostérico D^{01} , desencadena la apertura de los canales ($\alpha/\beta 3b$)BK aun cuando no estén todos los sensores del voltaje activados. Esto se traduce en que la curva $G(V)$, la cual se encuentra desplazada a la izquierda de la curva $Q(V)$ en el eje del voltaje (ver fig. 24 B₃).

4.4.- Efecto de la subunidad $\beta 4$ sobre la sensibilidad aparente a Ca^{+2} .

El análisis de canal único y de los registros de I_K utilizando el modelo alostérico HA, explican los efectos de $\beta 4$ por una disminución en la constante que describe el equilibrio cerrado-abierto (L_0) y un desplazamiento hacia la izquierda de la relación $Q(V)$ (Wang y col., 2006). Los resultados de esta tesis, a través de registros de I_g , muestran que $\beta 4$ estabiliza la conformación activa del sensor de voltaje, pero reduciendo el número de cargas de apertura por sensor y no la energía media de activación (V_h). Estos hallazgos serían suficientes para explicar los cambios en la sensibilidad Ca^{+2} inducida por $\beta 4$ (Fig. 30). Sin embargo, el comportamiento de Q_{slow} en BK ($\alpha/\beta 4$) solo es compatible con el modelo de tres niveles que hemos propuesto ya que da cuenta de la diferencia entre la constante de tiempo de activación de la corriente iónica y Q_{slow} .

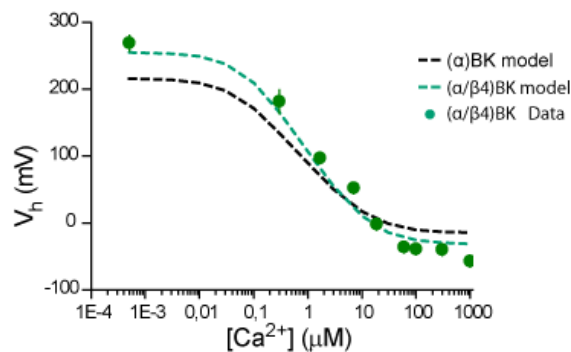


Figura 30.- Los cambios en z_j y V_h explican la sensibilidad al Ca^{+2} en canales ($\alpha/\beta 4$)BK.

Los datos de (Wang y col., 2006; círculos de color verde azulado) se superponen con la simulación de (α)BK (negro línea discontinua) y ($\alpha/\beta 4$)BK canales (línea discontinua de color verde azulado), utilizando el modelo de HA (fig. 14A) con los siguientes parámetros : para (α) BK $V_h=140$ mV, $z_f=0,5$ e, $z_L=0,31$ e, $D=19$, $C=14$, $E=2,8$, $L_0=1e-6$, y $K_D=8,2$. Para ($\alpha/\beta 4$) BK todos los parámetros son los mismos excepto $V_h = 186$ mV y $z_j = 0,4$.

4.5.- Efecto de las subunidades β sobre la cinética de apertura

Sorprendentemente, β_1 no afecta a la cinética de I_g , lo que sugiere que la desaceleración de la cinética de activación y de desactivación del canal BK es un proceso relacionado con la transición entre los estados cerrados y abiertos. En el presente estudio, mediante la aplicación de despolarizaciones prolongadas pudimos investigar los efectos de las distintas β en el movimiento de carga entre estados abiertos. Nuestros resultados indican que β_1 , β_{2IR} y β_4 afectan profundamente tanto la amplitud como la cinética del componente lento de carga (Q_{slow}) (Fig. 21E, G y K) pero su curso temporal no está relacionado con la activación de I_K . Esta divergencia con los resultados obtenidos con canales (α)BK la hemos interpretado utilizando el modelo representado en la figura 23. Este modelo da cuenta de los datos presentados aquí e indica que β_1 y β_2 estabilizan la configuración activa del sensor de voltaje enlenteciendo la desactivación de los VSD. Sin embargo, la modificación del curso temporal de I_K es una consecuencia de un aumento en la barrera entre C y O.

En ausencia de Ca^{+2} , un esquema cinético basado en un mecanismo alostérico puede describir las características básicas de la dependencia de voltaje de los canales BK. El esquema V contiene una disposición en paralelo de los estados abiertos y cerrados representando dos mecanismos separados: los estados de una misma fila definen las distintas combinaciones de estado de los cuatro VSD en tanto que las transiciones verticales reflejan el estado del PD (Horrigan y col., 1999; Horrigan y Aldrich, 2002). Sin embargo, además de las divergencia descritas en esta tesis existen publicaciones que notan, que si bien el modelo alostérico puede dar cuenta de los efectos de voltaje y de Ca^{+2} sobre la probabilidad de apertura de los canales BK compuestas sólo de subunidades α , no puede dar cuenta del detalle cinético de los canales individuales (Cox y col., 1997b). Cox y col. (1997) sugirieron que se necesitan estados adicionales. El análisis detallado de registros de canal único realizado por Rothberg y Magleby (1998) confirma esta predicción. Ellos encontraron que los modelos mínimos requieren de estados cerrados breves adicionales, para dar cuenta de la actividad de canal único dejando abierta la posibilidad de que esto cierres breves no estén en la vía de activación. Un esquema

cinético de tres niveles con dos filas de estados cerrados similar al que proponemos aquí fue utilizado por (Zeng y col., 2001) para explicar la necesidad de usar la suma de dos distribuciones de Boltzmann para describir las curvas $G(V)$ de canales $(\alpha/\beta_3b)BK$. Considerando nuestros resultados, proponemos que las subunidades β_1 , β_2 y β_4 modifican la barrera energética que separa el estado cerrado del abierto ($C \leftrightarrow O$). Esto se refleja en el modelo cinético como un estado intermedio ($C_{1,i}$) en la vía de apertura del canal, lo cual enlentece el curso temporal de la corriente.

4.6.- Determinantes estructurales de la interacción β -VSD.

Experimentos de entrecruzamiento de puentes de disulfuro demostraron que existe una cercanía tal, que sugiere contacto físico entre los extremo extracelulares de $(S0)\alpha$ con $(TM2)\beta$, y $(TM1)\beta$ con $(S1$ y $S2)\alpha$ y que todas las subunidades β , se localizan en la misma posición cuando interactúan con $(\alpha)BK$ (Wu y col., 2009a; Liu y col., 2010; Morera y col., 2012; Wu y col., 2013). Dado que, el segmento $S0$ interactúa con el sensor de voltaje (Koval y col., 2007; Pantazis y col., 2010b), se puede prever que el $(TM2)\beta$ participa en la modulación de VSD. Sin embargo, nuestros resultados con las quimeras descartan un rol relevante de los segmentos transmembranales en el acoplamiento funcional de las dos subunidades. Esto concuerda con el hecho de que la mayor homología entre las subunidades β se encuentra en estos segmentos. En resumen, $TM2$ tendría un rol estructural como, por ejemplo, mantener la unión de β con α .

Nuestros resultados con quimeras indican que los componentes estructurales responsables de la modulación sensor de voltaje estarían en los terminales NH_2 - y $COOH$ -. Estos resultados concuerdan con los de Orio y col. (2006), quienes encuentran que estos mismos segmentos son responsables de los cambios en la cinética de activación inducidos por β_1 y β_2 . El hecho que la modulación del VSD por la subunidad β_1 ocurra en la región intracelular, sugiere que los dominios intracelulares de la subunidad β afectan la estabilidad de la conformación de reposo

del VSD. Esto explicaría por que la subunidad $\beta 1$ no puede modular los canales (α)BK a los que se introdujo el terminal COOH- de Slo3 (Qian y col., 2002).

Trabajos recientes adjudican un rol modulador de la P_o al lazo extracelular de la subunidad $\beta 1$ (Gruslova y col., 2012), debido a que al reemplazar una serie de residuos conservados del lazo de $\beta 1$ por alanina se producen cambios en la curva $G(V)$, tanto en la carga equivalente como en la constante intrínseca de activación L_0 (Gruslova y col., 2012). Además las mutaciones naturales en esta región E65R (Fernandez-Fernandez y col., 2004) y R140W (Seibold y col., 2008), también modifican la curva $G(V)$. Sin embargo, el rol de los lazos parece estar mas relacionado con el funcionamiento del poro del canal. Los residuos lisina en el lazo de $\beta 2$, que están en la vecindad de los residuos mutados por Gruslova y col. (2012), confieren rectificación de salida de las corrientes de BK (Chen y col., 2008), lo que sugiere que estos residuos están próximos al vestíbulo externo del poro y actúan por repulsión electrostática de los iones K^+ entrantes. Nuestros resultados no muestran un rol significativo del lazo en a modulación del sensor de voltaje. Sin embargo, la interacción del lazo con el poro podría explicar porqué la quimera $\beta 1L\beta 3b$ (fig 29 A₁-A₃) no se recupera el fenotipo de la $Q(V)$ de $\beta 1$. La interacción del lazo de $\beta 3b$ con el poro promovería la activación acelerada del canal por vías independientes de voltaje (Zeng y col., 2001), afectando indirectamente el equilibrio del sensor de voltaje.

En el contexto del modelo de tres pisos que proponemos, el canal ($\alpha/\beta 3b$)BK transitaría rápidamente a los cerrados intermedios y una fracción relevante de ellos se abre antes de que se activen los sensores de voltaje. Las $Q(V)$ obtenidas contendría el movimiento de VSD de canales abierto ($O_n \leftrightarrow O_{n+1}$) y en el estado cerrado intermedio ($C_{1,n} \leftrightarrow C_{1,(n+1)}$). En otras palabras, el lazo de $\beta 3b$ estabiliza el estado abierto del canal. Como corolario de esta conclusión, los elementos que influyen en la apertura del canal están localizados en la cara extracelular del canal y estabilizando la compuerta de apertura ($C_{1,n} \leftrightarrow C_{1,(n+1)} \leftrightarrow O$) en un estado intermedio. Este efecto podría compararse a la inactivación de tipo-C que se observa en los canales Kv; esto

puede ser evaluado ocupando iones bloqueadores como el Ba^{+2} y Rb^{+} que modifican la conformación del poro.

4.7.- Posible mecanismo de molecular de interacción de α - β .

Recientemente, en el laboratorio se construyeron quimeras $\beta 1$ - $\beta 3b$ en que se intercambiaron los terminales NH_2 - y COOH -, $\beta 1\text{N}\beta 3b$ y $\beta 1\text{C}\beta 3b$, respectivamente. La comparación de las $Q(V)$ de canales BK co-expresados con estas quimeras nos permite establecer que el terminal NH_2 - de $\beta 1$ contiene el motivo estructural responsable de la modulación de los sensores de voltaje (fig 31). Dado que la subunidad $\beta 2$ también estabiliza el estado activado del sensor, es posible suponer que, el NH_2 - de esta subunidad comparte el determinante estructural de $\beta 1$. El desplazamiento de la curva $Q(V)$ (fig 17 A-B) producido por $\beta 1$ y $\beta 2$ coincide con el valor máximo de la constante de rapidez $\tau_{[g]}(V)$ (fig 19 y tabla 3). Esto es consistente con un efecto electrostático del terminal NH_2 - de $\beta 1$ sobre el sensor de voltaje. Igualmente, la presencia de Mg^{+2} , Zn^{+2} y H^{+} en el lado intracelular desplaza la relación $G(V)$ del canal BK hacia la izquierda (Laurido y col., 1991; Shi y col., 2002; Hou y col., 2010). Aun cuando los efectos en la $G(V)$ no tienen por que involucrar el sensor de voltaje, todos estos iones modulan al canal a través del mismo sitio (fig 2; Shi y col., 2002; Avdonin y col., 2003; Hou y col., 2010). En particular, se demostró que Mg^{+2} activa al canal BK por interacciones electroestáticas con el sensor del voltaje (Yang y col., 2007). Lo interesante es que cuando los canales BK se co-expresaron con $\beta 1$, Mg^{+2} no desplaza mayormente la curva $G(V)$ (Qian y Magleby, 2003). Inspirado en estos resultados, proponemos que el terminal NH_2 - de $\beta 1$ y $\beta 2$ contiene residuos cargados que desplazan el equilibrio de los sensores de voltaje por interacción electroestática y que estos residuos interactúan con el sitio de unión a Mg^{+2} . Esto último implica que la posición de los residuos positivos sea relevante, estando limitada por el largo del terminal NH_2 - de $\beta 1$. A partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las

distintas β y el contraste con sus fenotipos, identificamos como posibles candidatos los residuos K10 y R11, este mecanismo se detalla en la figura 32.

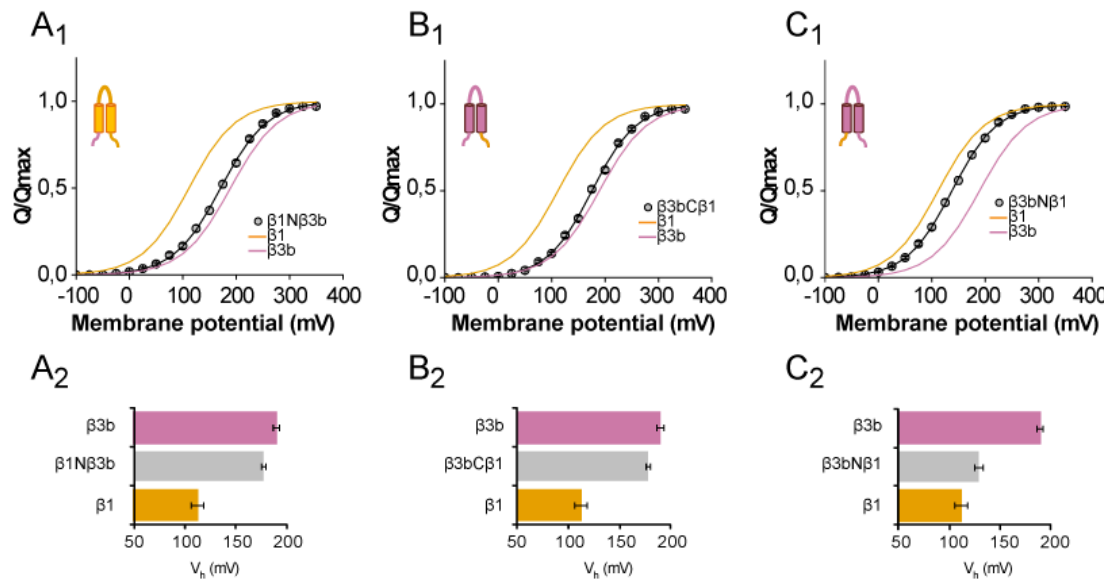


Figura 31.- Comparación del efecto de las quimeras de dominios intracelulares $\beta 1$ - $\beta 3b$ en la relación $Q(V)$.

(A-C) Las relaciones $Q(V)$ para cada $\beta 1$ - $\beta 3b$ quimera (círculos abiertos, con una media \pm SEM) y además el ajuste Boltzmann de canales ($\beta 1$)BK (línea naranja) y ($\beta 3b$)BK (línea magenta). Los ajustes de una función de Boltzmann a la relación $Q(V)$ (media \pm SEM) son los siguientes: **$\beta 1N\beta 3b$** : $V_{1/2}=177 \pm 2$ mV, $z=0,58$ e ($n=7$); **$\beta 3bC\beta 1$** : $V_{1/2}=177 \pm 2$ mV, $z=0,6$ e ($n=7$); **$\beta 3bN\beta 1$** : $V_{1/2}=128 \pm 4$ mV, $z=0,65$ e ($n=6$).

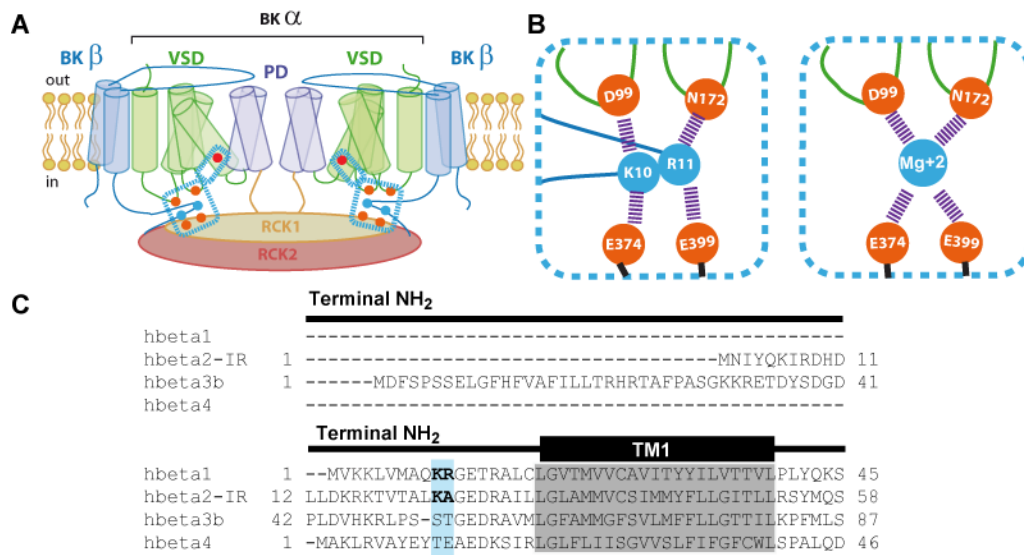


Figura 32.- mecanismo hipotético de interacción α - β .

(A) Diagrama esquemático del sitio de interacción entre el terminal NH₂- y el sitio de Mg⁺². Además se muestra un diagrama del canal BK sin β .

(B) Esquema que muestra los aminoácidos involucrados en el proceso propuesto.

(C) Alineamiento entre las distintas subunidades que destaca los residuos cargados que suponemos pueden apantallar interactuar en el sitio de unión a Mg⁺²

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2IR$ desplazan las curvas $Q(V)$ a lo largo del eje de voltaje a la izquierda por 57 y 39 mV, respectivamente pero sin cambios apreciables en la dependencia de voltaje de la activación (z).
- La subunidad $\beta 4$ produce un desplazamiento de la $Q(V)$ de 22 mV a la derecha y una disminución del 23% en z .
- $\beta 1$, $\beta 2IR$ y $\beta 4$ estabilizan la configuración activa del sensor de voltaje. Para la subunidad α sola ΔG_0 es 10,3 kJ / mol. Cuando α se co-expresa con las subunidades $\beta 1$, $\beta 2IR$, y $\beta 4$, esta energía se reduce a 6,3, 7,7 y 8,6 kJ/mol respectivamente.
- En canales $(\alpha/\beta 1)BK$, $(\alpha/\beta 2IR)BK$ y $(\alpha/\beta 4) BK$, la constante de tiempo lenta de la Q_{OFF} es entre 10 a 30 veces más rápida que para la activación de I_K .
- Se encontró que una extensión del modelo alostérico HCA que incluye una fila adicional de cerrado intermedia ($C_{1,i}$) es suficiente para explicar nuestros resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Adelman, J.P., K.Z. Shen, M.P. Kavanaugh, R.A. Warren, Y.N. Wu, A. Lagrutta, C.T. Bond, and R.A. North. 1992. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*. 9:209-216.
- Aggarwal, S.K., and R. MacKinnon. 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel. *Neuron*. 16:1169-1177.
- Armstrong, C.M., and F. Bezanilla. 1974. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *J Gen Physiol*. 63:533-552.
- Atkinson, N.S., G.A. Robertson, and B. Ganetzky. 1991. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science*. 253:551-555.
- Avdonin, V., X.D. Tang, and T. Hoshi. 2003. Stimulatory action of internal protons on Slo1 BK channels. *Biophys J*. 84:2969-2980.
- Bao, L., and D.H. Cox. 2005. Gating and ionic currents reveal how the BKCa channel's Ca²⁺ sensitivity is enhanced by its beta1 subunit. *J Gen Physiol*. 126:393-412.
- Bao, L., A.M. Rapin, E.C. Holmstrand, and D.H. Cox. 2002. Elimination of the BK(Ca) channel's high-affinity Ca(2+) sensitivity. *J Gen Physiol*. 120:173-189.
- Barrett, J.N., K.L. Magleby, and B.S. Pallotta. 1982. Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *The Journal of physiology*. 331:211-230.
- Behrens, R., A. Nolting, F. Reimann, M. Schwarz, R. Waldschutz, and O. Pongs. 2000. hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett*. 474:99-106.
- Bentrop, D., M. Beyermann, R. Wissmann, and B. Fakler. 2001. NMR structure of the "ball-and-chain" domain of KCNMB2, the beta 2-subunit of large conductance Ca²⁺- and voltage-activated potassium channels. *J Biol Chem*. 276:42116-42121.
- Bian, S., I. Favre, and E. Moczydlowski. 2001. Ca²⁺-binding activity of a COOH-terminal fragment of the *Drosophila* BK channel involved in Ca²⁺-dependent activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:4776-4781.
- Brelidze, T.I., X. Niu, and K.L. Magleby. 2003. A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:9017-9022.
- Brenner, R., T.J. Jegla, A. Wickenden, Y. Liu, and R.W. Aldrich. 2000. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J Biol Chem*. 275:6453-6461.
- Cannon, W.B. 1929. ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. *Physiological reviews*. 9:399-431.
- Carvacho, I., W. Gonzalez, Y.P. Torres, S. Brauchi, O. Alvarez, F.D. Gonzalez-Nilo, and R. Latorre. 2008. Intrinsic electrostatic potential in the BK channel pore: role in determining single channel conductance and block. *J Gen Physiol*. 131:147-161.
- Cole, K.S., and J.W. Moore. 1960. Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristic. *Biophys J*. 1:1-14.

- Colquhoun, D. 1973. The relation between classical and cooperative models for drug action. *In Drug Receptors*. H.P. Rang, editor. *University Park Press, London*. 149–182.
- Colquhoun, D., and A.G. Hawkes. 1981. On the stochastic properties of single ion channels. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 211:205-235.
- Colquhoun, D., and A.G. Hawkes. 1982. On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and of clusters of bursts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 300:1-59.
- Cox, D.H., and R.W. Aldrich. 2000. Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca(2+) sensitivity. *J Gen Physiol*. 116:411-432.
- Cox, D.H., J. Cui, and R.W. Aldrich. 1997a. Allosteric gating of a large conductance Ca-activated K+ channel. *J Gen Physiol*. 110:257-281.
- Cox, D.H., J. Cui, and R.W. Aldrich. 1997b. Separation of gating properties from permeation and block in mslo large conductance Ca-activated K+ channels. *J Gen Physiol*. 109:633-646.
- Cui, J., D.H. Cox, and R.W. Aldrich. 1997. Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K+ channels. *J Gen Physiol*. 109:647-673.
- Cha, A., and F. Bezanilla. 1997. Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K+ channel with fluorescence. *Neuron*. 19:1127-1140.
- Chen, M., G. Gan, Y. Wu, L. Wang, and J. Ding. 2008. Lysine-rich extracellular rings formed by hbeta2 subunits confer the outward rectification of BK channels. *PLoS One*. 3:e2114.
- Choi, K.L., C. Mossman, J. Aube, and G. Yellen. 1993. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron*. 10:533-541.
- Del Castillo, J., and B. Katz. 1957. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 146:369-381.
- Diaz, L., P. Meera, J. Amigo, E. Stefani, O. Alvarez, L. Toro, and R. Latorre. 1998. Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *J Biol Chem*. 273:32430-32436.
- Dong, J., N. Shi, I. Berke, L. Chen, and Y. Jiang. 2005. Structures of the MthK RCK domain and the effect of Ca²⁺ on gating ring stability. *J Biol Chem*. 280:41716-41724.
- Eigen, M. 1968. New looks and outlooks on physical enzymology. *Q Rev Biophys*. 1:3-33.
- Feinberg-Zadek, P.L., and S.N. Treistman. 2007. Beta-subunits are important modulators of the acute response to alcohol in human BK channels. *Alcohol Clin Exp Res*. 31:737-744.
- Fernandez-Fernandez, J.M., M. Tomas, E. Vazquez, P. Orio, R. Latorre, M. Senti, J. Marrugat, and M.A. Valverde. 2004. Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *J Clin Invest*. 113:1032-1039.
- Gan, G., H. Yi, M. Chen, L. Sun, W. Li, Y. Wu, and J. Ding. 2008. Structural basis for toxin resistance of beta4-associated calcium-activated potassium (BK) channels. *J Biol Chem*. 283:24177-24184.
- Gardos, G. 1958. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 30:653-654.
- Geng, Y., X. Niu, and K.L. Magleby. 2011. Low resistance, large dimension entrance to the inner cavity of BK channels determined by changing side-chain volume. *J Gen Physiol*. 137:533-548.
- Gessner, G., K. Schonherr, M. Soom, A. Hansel, M. Asim, A. Baniahmad, C. Derst, T. Hoshi, and S.H. Heinemann. 2005. BKCa channels activating at resting potential without calcium in LNCaP prostate cancer cells. *J Membr Biol*. 208:229-240.

- Gonzalez-Perez, V., X.H. Zeng, K. Henzler-Wildman, and C.J. Lingle. 2012. Stereospecific binding of a disordered peptide segment mediates BK channel inactivation. *Nature*. 485:133-136.
- Gruslova, A., I. Semenov, and B. Wang. 2012. An extracellular domain of the accessory beta1 subunit is required for modulating BK channel voltage sensor and gate. *J Gen Physiol*. 139:57-67.
- Gutman, G.A., K.G. Chandy, S. Grissmer, M. Lazdunski, D. McKinnon, L.A. Pardo, G.A. Robertson, B. Rudy, M.C. Sanguinetti, W. Stuhmer, and X. Wang. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*. 57:473-508.
- Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 391:85-100.
- Haug, T., D. Sigg, S. Ciani, L. Toro, E. Stefani, and R. Olcese. 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. *J Gen Physiol*. 124:173-184.
- Heginbotham, L., T. Abramson, and R. MacKinnon. 1992. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science*. 258:1152-1155.
- Hicks, G.A., and N.V. Marrion. 1998. Ca²⁺-dependent inactivation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channels in rat hippocampal neurones produced by pore block from an associated particle. *J Physiol*. 508 (Pt 3):721-734.
- Hilgemann, D.W. 1989. Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflugers Arch*. 415:247-249.
- Hodgkin, A.L., and A.F. Huxley. 1952. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *The Journal of physiology*. 116:449-472.
- Horrigan, F.T., and R.W. Aldrich. 1999. Allosteric voltage gating of potassium channels II. Mslo channel gating charge movement in the absence of Ca(2+). *J Gen Physiol*. 114:305-336.
- Horrigan, F.T., and R.W. Aldrich. 2002. Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J Gen Physiol*. 120:267-305.
- Horrigan, F.T., J. Cui, and R.W. Aldrich. 1999. Allosteric voltage gating of potassium channels I. Mslo ionic currents in the absence of Ca(2+). *J Gen Physiol*. 114:277-304.
- Hoshi, T., Y. Tian, R. Xu, S.H. Heinemann, and S. Hou. 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 U S A*. 110:4822-4827.
- Hou, S., S.H. Heinemann, and T. Hoshi. 2009. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules. *Physiology (Bethesda, Md.)*. 24:26-35.
- Hou, S., L.E. Vigeland, G. Zhang, R. Xu, M. Li, S.H. Heinemann, and T. Hoshi. 2010. Zn²⁺ activates large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel via an intracellular domain. *J Biol Chem*. 285:6434-6442.
- Johnson, B.E., D.A. Glauser, E.S. Dan-Glauser, D.B. Halling, R.W. Aldrich, M.B. Goodman. 2011. Alternatively spliced domains interact to regulate BK potassium channel gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:20784-20789.
- Knaus, H.G., K. Folander, M. Garcia-Calvo, M.L. Garcia, G.J. Kaczorowski, M. Smith, and R. Swanson. 1994. Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit

- of high conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J Biol Chem.* 269:17274-17278.
- Koshland, D.E., Jr., G. Nemethy, and D. Filmer. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry.* 5:365-385.
- Koval, O.M., Y. Fan, and B.S. Rothberg. 2007. A role for the S0 transmembrane segment in voltage-dependent gating of BK channels. *J Gen Physiol.* 129:209-220.
- Latorre, R., and C. Miller. 1983. Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol.* 71:11-30.
- Latorre, R., C. Vergara, and C. Hidalgo. 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 U S A.* 79:805-809.
- Laurido, C., S. Candia, D. Wolff, and R. Latorre. 1991. Proton modulation of a Ca(2+)-activated K⁺ channel from rat skeletal muscle incorporated into planar bilayers. *J Gen Physiol.* 98:1025-1042.
- Lee, U.S., and J. Cui. 2009. {beta} subunit-specific modulations of BK channel function by a mutation associated with epilepsy and dyskinesia. *J Physiol.* 587:1481-1498.
- Lee, U.S., J. Shi, and J. Cui. 2010. Modulation of BK channel gating by the ss2 subunit involves both membrane-spanning and cytoplasmic domains of Slo1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 30:16170-16179.
- Li, W., and R.W. Aldrich. 2004. Unique inner pore properties of BK channels revealed by quaternary ammonium block. *J Gen Physiol.* 124:43-57.
- Lingle, C.J., X.H. Zeng, J.P. Ding, and X.M. Xia. 2001. Inactivation of BK channels mediated by the NH(2) terminus of the beta3b auxiliary subunit involves a two-step mechanism: possible separation of binding and blockade. *J Gen Physiol.* 117:583-606.
- Liu, G., X. Niu, R.S. Wu, N. Chudasama, Y. Yao, X. Jin, R. Weinberg, S.I. Zakharov, H. Motoike, S.O. Marx, and A. Karlin. 2010. Location of modulatory beta subunits in BK potassium channels. *J Gen Physiol.* 135:449-459.
- Liu, G., S.I. Zakharov, L. Yang, R.S. Wu, S.X. Deng, D.W. Landry, A. Karlin, and S.O. Marx. 2008. Locations of the beta1 transmembrane helices in the BK potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:10727-10732.
- Ma, Z., X.J. Lou, and F.T. Horrigan. 2006. Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels. *J Gen Physiol.* 127:309-328.
- Mannuzzu, L.M., M.M. Moronne, and E.Y. Isacoff. 1996. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science.* 271:213-216.
- Marty, A. 1981. Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature.* 291:497-500.
- McManus, O.B., A.L. Blatz, and K.L. Magleby. 1985. Inverse relationship of the durations of adjacent open and shut intervals for C1 and K channels. *Nature.* 317:625-627.
- McManus, O.B., and K.L. Magleby. 1989. Kinetic time constants independent of previous single-channel activity suggest Markov gating for a large conductance Ca-activated K channel. *J Gen Physiol.* 94:1037-1070.
- Meech, R.W. 1974. The sensitivity of *Helix aspersa* neurones to injected calcium ions. *The Journal of physiology.* 237:259-277.

- Meera, P., M. Wallner, Z. Jiang, and L. Toro. 1996. A calcium switch for the functional coupling between alpha (hslo) and beta subunits (KV,Ca beta) of maxi K channels. *FEBS Lett.* 382:84-88.
- Meera, P., M. Wallner, M. Song, and L. Toro. 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:14066-14071.
- Meera, P., M. Wallner, and L. Toro. 2000. A neuronal beta subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5562-5567.
- Miller, C. 1982. Bis-quaternary ammonium blockers as structural probes of the sarcoplasmic reticulum K⁺ channel. *J Gen Physiol.* 79:869-891.
- Miranda, P., J.E. Contreras, A.J. Plested, F.J. Sigworth, M. Holmgren, and T. Giraldez. 2013. State-dependent FRET reports calcium- and voltage-dependent gating-ring motions in BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:5217-5222.
- Moczydlowski, E., and R. Latorre. 1983. Gating kinetics of Ca²⁺-activated K⁺ channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers. Evidence for two voltage-dependent Ca²⁺ binding reactions. *J Gen Physiol.* 82:511-542.
- Monod, J., J.P. Changeux, and F. Jacob. 1963. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol.* 6:306-329.
- Monod, J., and F. Jacob. 1961. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 26:389-401.
- Monod, J., J. Wyman, and J.P. Changeux. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol.* 12:88-118.
- Morera, F.J., A. Alioua, P. Kundu, M. Salazar, C. Gonzalez, A.D. Martinez, E. Stefani, L. Toro, and R. Latorre. 2012. The first transmembrane domain (TM1) of beta2-subunit binds to the transmembrane domain S1 of alpha-subunit in BK potassium channels. *FEBS Lett.* 586:2287-2293.
- Nelder, J.A., and R. Mead. 1965. A Simplex Method for Function Minimization. *The Computer Journal.* 7:308-313.
- Nelson, M.T. 1993. Ca(2+)-activated potassium channels and ATP-sensitive potassium channels as modulators of vascular tone. *Trends Cardiovasc Med.* 3:54-60.
- Nimigeon, C.M., J.S. Chappie, and C. Miller. 2003. Electrostatic tuning of ion conductance in potassium channels. *Biochemistry.* 42:9263-9268.
- Nimigeon, C.M., and K.L. Magleby. 2000. Functional coupling of the beta(1) subunit to the large conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in the absence of Ca(2+). Increased Ca(2+) sensitivity from a Ca(2+)-independent mechanism. *J Gen Physiol.* 115:719-736.
- Niu, X., G. Liu, R.S. Wu, N. Chudasama, S.I. Zakharov, A. Karlin, and S.O. Marx. 2013. Orientations and proximities of the extracellular ends of transmembrane helices S0 and S4 in open and closed BK potassium channels. *PLoS One.* 8:e58335.
- Niu, X., X. Qian, and K.L. Magleby. 2004. Linker-gating ring complex as passive spring and Ca(2+)-dependent machine for a voltage- and Ca(2+)-activated potassium channel. *Neuron.* 42:745-756.
- Oberhauser, A., O. Alvarez, and R. Latorre. 1988. Activation by divalent cations of a Ca²⁺-activated K⁺ channel from skeletal muscle membrane. *J Gen Physiol.* 92:67-86.

- Orio, P., and R. Latorre. 2005. Differential effects of beta 1 and beta 2 subunits on BK channel activity. *J Gen Physiol.* 125:395-411.
- Orio, P., P. Rojas, G. Ferreira, and R. Latorre. 2002. New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci.* 17:156-161.
- Orio, P., Y. Torres, P. Rojas, I. Carvacho, M.L. Garcia, L. Toro, M.A. Valverde, and R. Latorre. 2006. Structural determinants for functional coupling between the beta and alpha subunits in the Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel. *J Gen Physiol.* 127:191-204.
- Pallotta, B.S. 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.
- Pallotta, B.S., K.L. Magleby, and J.N. Barrett. 1981. Single channel recordings of Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat muscle cell culture. *Nature.* 293:471-474.
- Pantazis, A., V. Gudzenko, N. Savalli, D. Sigg, and R. Olcese. 2010a. Operation of the voltage sensor of a human voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:4459-4464.
- Pantazis, A., A.P. Kohanteb, and R. Olcese. 2010b. Relative motion of transmembrane segments S0 and S4 during voltage sensor activation in the human BK(Ca) channel. *J Gen Physiol.* 136:645-657.
- Pantazis, A., and R. Olcese. 2012. Relative transmembrane segment rearrangements during BK channel activation resolved by structurally assigned fluorophore-quencher pairing. *J Gen Physiol.* 140:207-218.
- Perutz, M.F. 1949. An X-ray study of horse methemoglobin. *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci.* 195:474-499.
- Qian, X., and K.L. Magleby. 2003. Beta1 subunits facilitate gating of BK channels by acting through the Ca²⁺, but not the Mg²⁺, activating mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10061-10066.
- Qian, X., C.M. Nimigeon, X. Niu, B.L. Moss, and K.L. Magleby. 2002. Slo1 tail domains, but not the Ca²⁺ bowl, are required for the beta 1 subunit to increase the apparent Ca²⁺ sensitivity of BK channels. *J Gen Physiol.* 120:829-843.
- Rothberg, B.S., and K.L. Magleby. 1998. Kinetic structure of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels suggests that the gating includes transitions through intermediate or secondary states. A mechanism for flickers. *J Gen Physiol.* 111:751-780.
- Rothberg, B.S., and K.L. Magleby. 1999. Gating kinetics of single large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in high Ca²⁺ suggest a two-tiered allosteric gating mechanism. *J Gen Physiol.* 114:93-124.
- Rothberg, B.S., and K.L. Magleby. 2000. Voltage and Ca²⁺ activation of single large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels described by a two-tiered allosteric gating mechanism. *J Gen Physiol.* 116:75-99.
- Santiago-Castillo, J.A., M. Covarrubias, J.E. Sanchez-Rodriguez, P. Perez-Cornejo, and J. Arreola. 2010. Simulating complex ion channel kinetics with IonChannelLab. *Channels (Austin).* 4:422-428.
- Savalli, N., A. Kondratiev, S.B. de Quintana, L. Toro, and R. Olcese. 2007. Modes of operation of the BKCa channel beta2 subunit. *J Gen Physiol.* 130:117-131.
- Schoppa, N.E., and F.J. Sigworth. 1998. Activation of shaker potassium channels. I. Characterization of voltage-dependent transitions. *J Gen Physiol.* 111:271-294.

- Schreiber, M., and L. Salkoff. 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*. 73:1355-1363.
- Seibold, M.A., B. Wang, C. Eng, G. Kumar, K.B. Beckman, S. Sen, S. Choudhry, K. Meade, M. Lenoir, H.G. Watson, S. Thyne, L.K. Williams, R. Kumar, K.B. Weiss, L.C. Grammer, P.C. Avila, R.P. Schleimer, E.G. Burchard, and R. Brenner. 2008. An african-specific functional polymorphism in KCNMB1 shows sex-specific association with asthma severity. *Human molecular genetics*. 17:2681-2690.
- Seoh, S.A., D. Sigg, D.M. Papazian, and F. Bezanilla. 1996. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*. 16:1159-1167.
- Shen, K.Z., A. Lagrutta, N.W. Davies, N.B. Standen, J.P. Adelman, and R.A. North. 1994. Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Arch*. 426:440-445.
- Shi, J., G. Krishnamoorthy, Y. Yang, L. Hu, N. Chaturvedi, D. Harilal, J. Qin, and J. Cui. 2002. Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature*. 418:876-880.
- Schubert R., M.T. Nelson. 2001. Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci*. 22:505-12.
- Sigg, D., and F. Bezanilla. 1997. Total charge movement per channel. The relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity of activation. *J Gen Physiol*. 109:27-39.
- Solaro, C.R., and C.J. Lingle. 1992. Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science*. 257:1694-1698.
- Stefani, E., M. Ottolia, F. Noceti, R. Olcese, M. Wallner, R. Latorre, and L. Toro. 1997. Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺channel (hsl_o). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5427-5431.
- Sweet, T.B., and D.H. Cox. 2008. Measurements of the BKCa channel's high-affinity Ca²⁺ binding constants: effects of membrane voltage. *J Gen Physiol*. 132:491-505.
- Sweet, T.B., and D.H. Cox. 2009. Measuring the influence of the BKCa {beta}1 subunit on Ca²⁺ binding to the BKCa channel. *J Gen Physiol*. 133:139-150.
- Talukder, G., and R.W. Aldrich. 2000. Complex voltage-dependent behavior of single unliganded calcium-sensitive potassium channels. *Biophys J*. 78:761-772.
- Tang, Q.Y., X.H. Zeng, and C.J. Lingle. 2009. Closed-channel block of BK potassium channels by bbTBA requires partial activation. *J Gen Physiol*. 134:409-436.
- Thompson, J., and T. Begenisich. 2012. Selectivity filter gating in large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels. *J Gen Physiol*. 139:235-244.
- Uebele, V.N., A. Lagrutta, T. Wade, D.J. Figueroa, Y. Liu, E. McKenna, C.P. Austin, P.B. Bennett, and R. Swanson. 2000. Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K⁺ channel. *J Biol Chem*. 275:23211-23218.
- Valverde, M.A., P. Rojas, J. Amigo, D. Cosmelli, P. Orio, M.I. Bahamonde, G.E. Mann, C. Vergara, and R. Latorre. 1999. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*. 285:1929-1931.
- Wallner, M., P. Meera, M. Ottolia, G.J. Kaczorowski, R. Latorre, M.L. Garcia, E. Stefani, and L. Toro. 1995. Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi KCa channel cloned from myometrium. *Receptors & channels*. 3:185-199.

- Wallner, M., P. Meera, and L. Toro. 1996. Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:14922-14927.
- Wallner, M., P. Meera, and L. Toro. 1999. Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4137-4142.
- Wang, B., B.S. Rothberg, and R. Brenner. 2006. Mechanism of beta4 subunit modulation of BK channels. *J Gen Physiol.* 127:449-465.
- Weiger, T.M., M.H. Holmqvist, I.B. Levitan, F.T. Clark, S. Sprague, W.J. Huang, P. Ge, C. Wang, D. Lawson, M.E. Jurman, M.A. Glucksmann, I. Silos-Santiago, P.S. DiStefano, and R. Curtis. 2000. A novel nervous system beta subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. *J Neurosci.* 20:3563-3570.
- Wilkins, C.M., and R.W. Aldrich. 2006. State-independent block of BK channels by an intracellular quaternary ammonium. *J Gen Physiol.* 128:347-364.
- Wu, R.S., N. Chudasama, S.I. Zakharov, D. Doshi, H. Motoike, G. Liu, Y. Yao, X. Niu, S.X. Deng, D.W. Landry, A. Karlin, and S.O. Marx. 2009a. Location of the beta 4 transmembrane helices in the BK potassium channel. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 29:8321-8328.
- Wu, R.S., G. Liu, S.I. Zakharov, N. Chudasama, H. Motoike, A. Karlin, and S.O. Marx. 2013. Positions of beta2 and beta3 subunits in the large-conductance calcium- and voltage-activated BK potassium channel. *J Gen Physiol.* 141:105-117.
- Wu, Y., Y. Xiong, S. Wang, H. Yi, H. Li, N. Pan, F.T. Horrigan, and J. Ding. 2009b. Intersubunit coupling in the pore of BK channels. *J Biol Chem.* 284:23353-23363.
- Wu, Y., Y. Yang, S. Ye, and Y. Jiang. 2010. Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca(2+)-gated K(+) channel. *Nature.* 466:393-397.
- Wyman, J., and D.W. Allen. 1951. The problem of the heme interactions in hemoglobin and the basis of the bohr effect. *Journal of Polymer Science.* 7:499-518.
- Xia, X.M., J.P. Ding, and C.J. Lingle. 1999. Molecular basis for the inactivation of Ca²⁺- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 19:5255-5264.
- Xia, X.M., J.P. Ding, X.H. Zeng, K.L. Duan, and C.J. Lingle. 2000. Rectification and rapid activation at low Ca²⁺ of Ca²⁺-activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 20:4890-4903.
- Xia, X.M., X. Zeng, and C.J. Lingle. 2002. Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature.* 418:880-884.
- Yang, H., L. Hu, J. Shi, K. Delaloye, F.T. Horrigan, and J. Cui. 2007. Mg²⁺ mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:18270-18275.
- Yang, H., G. Zhang, J. Shi, U.S. Lee, K. Delaloye, and J. Cui. 2008. Subunit-specific effect of the voltage sensor domain on Ca²⁺ sensitivity of BK channels. *Biophys J.* 94:4678-4687.
- Yuan, P., M.D. Leonetti, Y. Hsiung, and R. MacKinnon. 2012. Open structure of the Ca²⁺ gating ring in the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Nature.* 481:94-97.
- Yuan, P., M.D. Leonetti, A.R. Pico, Y. Hsiung, and R. MacKinnon. 2010. Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science.* 329:182-186.

- Yusifov, T., A.D. Javaherian, A. Pantazis, C.S. Gandhi, and R. Olcese. 2010. The RCK1 domain of the human BKCa channel transduces Ca²⁺ binding into structural rearrangements. *J Gen Physiol.* 136:189-202.
- Yusifov, T., N. Savalli, C.S. Gandhi, M. Ottolia, and R. Olcese. 2008. The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:376-381.
- Zeng, X.H., J.P. Ding, X.M. Xia, and C.J. Lingle. 2001. Gating properties conferred on BK channels by the beta3b auxiliary subunit in the absence of its NH(2)- and COOH termini. *J Gen Physiol.* 117:607-628.
- Zeng, X.H., X.M. Xia, and C.J. Lingle. 2005. Divalent cation sensitivity of BK channel activation supports the existence of three distinct binding sites. *J Gen Physiol.* 125:273-286.
- Zhou, Y., X.M. Xia, and C.J. Lingle. 2011. Cysteine scanning and modification reveal major differences between BK channels and Kv channels in the inner pore region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:12161-12166.