

**Exploración de la arquitectura y los cambios de
conformación del canal BK utilizando una regla
espectroscópica**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular
Y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Juan Pablo Castillo Gutiérrez

Abril, 2014

Director de Tesis: Dr. Ramón Latorre de la Cruz

Co-Director de Tesis: Dr. Osvaldo Álvarez Araya

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

APROBADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Juan Pablo Castillo Gutiérrez

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 15 de Enero de 2014

Director de Tesis:
Dr. Ramón Latorre

Co-Director de Tesis
Dr. Osvaldo Álvarez

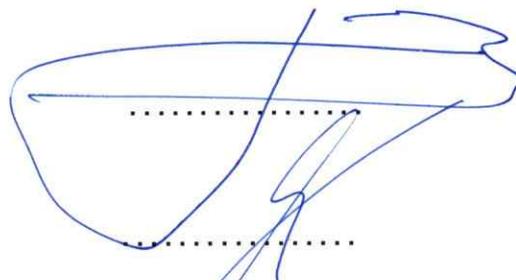
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Cecilia Vergara (presidenta)

Dr. Juan Brunet

Dr. David Naranjo

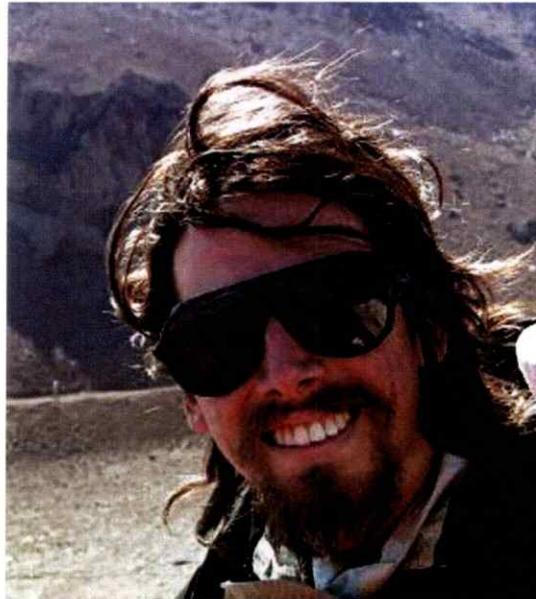
Dra. Magdalena Sanhueza



.....

Cecilia Vergara
.....
Juan Brunet
.....
David Naranjo
.....
Magdalena Sanhueza

Dedicado a todos ellos que se maravillan con la simpleza



En el año 2004 entré a estudiar la carrera de ingeniería en biotecnología molecular sin saber mucho que quería hacer de mi vida en el futuro, hasta que en cuarto año tuve el placer de tener clases con mi querido profesor Osvaldo Álvarez, quien me presentó por primera vez la biofísica, un enfoque cuantitativo de los modelos biológicos que toma como regla fundamental el hecho de que todos los procesos deben seguir las leyes de la física (obvio, no?). Fue él quien me presentó y recomendó con el Dr. Ramón Latorre para trabajar en su laboratorio, quien venía recién llegando a la ciudad de Valparaíso. Con ellos dos como guías en mi camino desarrollé con entusiasmo la pasión que siento cada vez que hago experimentos o que estudio los modelos teóricos que utilizamos comúnmente, motivado siempre con el entender cada detalle. Gracias a Ramón tuve también la oportunidad de conocer y trabajar actualmente con Miguel Holmgren y Pancho Bezanilla en el laboratorio de Montemar utilizando el axón gigante de la Jibia. Han pasado ya cinco años desde que inicié el doctorado y he podido conocer cada vez más de este entretenido mundo de la biofísica: distintos modelos de estudio, técnicas impresionantes y un sin fin de cosas que me siguen motivando cada vez más para seguir ligado a la ciencia básica. Espero en algún futuro llegar a la academia y poder formar una escuela que de algún modo fuese la continuación de la escuela que me enseñó y a mí y a mis maestros.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que de alguna u otra manera influyeron para construir la persona que soy. A mis padres por iniciar mi vida. A mis hermanos y amigos por ayudarme a descubrir el mundo. A mi querido Osvaldo por darme la inspiración que siempre busqué en un profesor, un verdadero maestro. A mi tutor y guía Ramón por la confianza que depositó en mí desde el primer momento y por la libertad con que me permite pensar y actuar. A Pancho por su inagotable genialidad y energía, un ejemplo como científico, pero más aún por su sencillez y calidez. A la curiosidad que se anidó en mí desde que tengo memoria. A todos los fenómenos descriptibles del universo que provocan que me sienta abrumado. En especial al fenómeno que llamamos vida y a las leyes físicas que lo permiten. Al sistema nervioso junto con todos los insondables procesos que permiten la conciencia, y todo lo que ella desencadena. Y por supuesto a Bárbara, quien me hace sentir que un hombre de ciencia también puede ser tocado por la magia...

Índice de contenidos

1. Introducción	1
El canal de potasio activado por calcio de alta conductancia BK:	
un fino amortiguador de señales celulares	2
El BK como modelo de proteína alostérica	5
El sensor de voltaje del canal BK: un caso especial dentro de los canales	
activados por voltaje	11
El segmento S0	16
La subunidad beta1: un notable regulador funcional del canal BK	17
LRET, una regla espectroscópica	21
Hipótesis de trabajo y objetivos	32
Objetivos específicos	33
3. Materiales y Métodos	35
4. Resultados	59
Los clones BK-LBT producen canales funcionales similares al BK.....	62
Los clones BK-LBT producen señales de fluorescencia del dador Tb⁺³-LBT	65
LRET entre el dador LBT-Tb⁺³ y el aceptor Cu⁺²	69
LRET entre el dador LBT-Tb⁺³ y el aceptor IBTX-BODIPY	75
Obtención de un mapa espacial de los dadores respecto al aceptor para	
las construcciones BK-LBT	83
Un modelo molecular refinado usando los resultados experimentales	
de LRET	92
5. discusión	97
6. Conclusión	111
7. Referencias	112

Índice de Tablas

Tabla I. Tiempo de vida del dador Tb^{+3} -LBT	68
Tabla II. Tiempo de vida del dador en presencia del aceptor Cu^{+2}	72
Tabla III. Análisis preliminar de los registros de emisión sensibilizada	80
Tabla IV. Análisis geométrico de los registros de emisión sensibilizada	86

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema de la topología del canal BK	4
Figura 1.2. Modelo alostérico de la activación del canal BK	7
Figura 1.3. Estructura molecular propuesta para el BK	10
Figura 1.4. Análisis de la activación por voltaje del canal BK	12
Figura 1.5. Residuos cargados en la secuencia de BK y del canal Shaker	14
Figura 1.6. La subunidad beta1	19
Figura 1.7. Interacción FRET para un par dador-aceptor	24
Figura 1.8. LRET para medir distancias intermoleculares en el canal Shaker	28
Figura 1.9. Dador y aceptores de LRET	30
Figura 2.1. Posiciones donde fue insertada la secuencia LBT	35
Figura 2.2. Estrategia de inserción de la secuencia LBT en el plasmidio BK-c	38
Figura 2.3. Esquema de la estación de trabajo de LRET	43
Figura 2.4. Espectros de emisión del Tb^{+3} y del BODIPY-FL	44
Figura 2.5. Análisis de la señal de fluorescencia del dador Tb^{+3} -LBT	47
Figura 2.6. Generación de la nube de posiciones del aceptor	50
Figura 2.7. Modelo geométrico para el análisis de la emisión sensibilizada	52
Figura 3.1. Descripción del uso de LRET para medir distancias intermoleculares	60
Figura 3.2. Registros de corriente de los canales BK-LBT usando <i>patch clamp</i>	63
Figura 3.3. Co-expresión de los canales BK-LBT con la subunidad beta1	65
Figura 3.4. Curso temporal de la fluorescencia de las construcciones BK-LBT	66
Figura 3.5. Decaimiento de la fluorescencia en presencia de Cu^{+2}	70

Figura 3.6. Distancia entre el dador Tb^{+3}-LBT y el sitio de Cu^{+2}	73
Figura 3.7. Bloqueo de la corriente en presencia de IBTX-BODIPY 400nM	76
Figura 3.8. Señal óptica en condiciones de dador solo y en presencia del aceptor	77
Figura 3.9. Señal de emisión sensibilizada de las construcciones BK-LBT	78
Figura 3.10. Efecto de la subunidad beta1 sobre la emisión sensibilizada	79
Figura 3.11. Efecto de la posición del aceptor sobre el ajuste	85
Figura 3.12. Mapa espacial de los dadores	88
Figura 3.13. Mapa espacial de los dadores en presencia de la subunidad beta1	89
Figura 3.14. Cambio en la estructura del BK inducido por la subunidad beta1	90
Figura 3.15. Modelo molecular que aplica las restricciones experimentales	92
Figura 3.16. Representación del modelo molecular obtenido (vista lateral)	93
Figura 3.17. Representación del modelo molecular obtenido (vista frontal)	94
Figura 4.1. Estructura del BK obtenida a partir de crio-microscopía	99
Figura 4.2. Mapas estructurales del BK obtenidos experimentalmente	101
Figura 4.3. Detalle de la estructura del sensor de voltaje	103
Figura 4.4. Efecto de la subunidad beta1 sobre el mapa estructural del BK	108

Lista de abreviaturas y símbolos

BK	Canal de K ⁺ de alta conductancia regulado por Ca ²⁺ y activado por voltaje.
K ⁺	ión Potasio
Ca ²⁺	ión Calcio
Cu ²⁺	ión Cobre
Tb ³⁺	ión Terbio
K _v	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente
S0-S6	Segmentos de transmembrana de la subunidad alfa del canal BK
TM1-TM2	Segmentos de transmembrana de la subunidad beta del canal BK
LBT	Motivo de unión a lantánidos (del inglés <i>Lanthanide Binding Tag</i>)
D	Dador en el par Dador-Aceptor de transferencia de energía resonante
A	Aceptor en el par Dador-Aceptor de transferencia de energía resonante
BODIPY-FL	Boro-Di-Pirrol- Fluoresceína, fluoróforo utilizado como aceptor
IBTX	Iberiotoxina, toxina derivada del escorpión <i>Buthus tamulus</i> .
FRET	Transferencia de Energía Resonante basada en Fluoróforos (del Inglés <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>).
LRET	Transferencia de Energía Resonante basada en Lantánidos (del Inglés <i>Lanthanide Resonance Energy Transfer</i>).
Å	Amstrong, unidad de longitud 10 ⁻¹⁰ metros.
ms, μs	milisegundos, microsegundos, unidades de tiempo 10 ⁻³ , 10 ⁻⁶ segundos, respectivamente.
pS	pico siemens, unidad de conductancia 10 ⁻¹² siemens

λ	Longitud de onda
RCK	Dominio reguladores de la conductancia de K^+ (del Inglés <i>Regulator Conductance K^+</i>).
KvAP	Canal de K^+ voltaje-dependiente de la arqueobacteria <i>Aeropyrum pernix</i> .
Kv1.2	Canal de K^+ voltaje-dependiente de mamífero.
Kv2.1	Canal de K^+ voltaje-dependiente de mamífero.
MthK	Canal de K^+ activado por Ca^{2+} de la arqueobacteria <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> .
Shaker	Canal de K^+ voltaje-dependiente.
K_d	Constante de disociación.
G/V	Relación conductancia v/s voltaje.
Q/V	Relación carga v/s voltaje.
O	Estado Abierto del poro de conducción de un canal en el contexto de un modelo de activación
C	Estado Cerrado del poro de conducción de un canal en el contexto de un modelo de activación
L, J, K	Constantes de Equilibrio en el contexto del modelo alostérico de activación.
D, C, E	Constantes alostéricas en el contexto del modelo alostérico de activación.
I_K	Corriente de K^+ llevada por un canal selectivo al potasio
Q_D	Rendimiento cuántico.
$f_{D(\lambda)}$	Espectro de fluorescencia del Dador.
$\epsilon_{A(\lambda)}$	Espectro de absorción del Aceptor.

K^2	Factor de orientación relativa del par dador-aceptor.
R_0	Constante de Förster.
τ_D	Tiempo de vida del dador solo
τ_{DA}	Tiempo de vida del dador en presencia del aceptor
k_D	constante de rapidez con que decae el dador solo
k_T	constante de rapidez con que ocurre la transferencia de energía
r	Distancia entre el par D-A.
$F_{SE(t)}$	decaimiento de emisión sensibilizada.
UV	UltraViolet.
TEV	Técnica de voltaje clamp de Dos Microelectrodos (del Inglés <i>Two microelectrode Voltage-Clamp</i>).
PMT	Tubo fotomultiplicador
PCR	Reacción de la Polimerasa en Cadena (del Inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
d1-d4	Distancias efectivas entre cada uno de los cuatro dadores y el aceptor en el modelo geométrico
r	Distancia entre el dador 1 y el eje de simetría en el modelo geométrico
θ	Ángulo relativo del dador 1 respecto al aceptor en el modelo geométrico
z	coordenada del dador 1 en el eje z, que corresponde al eje de simetría del canal. $z = 0$ corresponde al centro de la bicapa lipídica
RS	Desplazamiento radial de la nube del aceptor respecto del eje z (del inglés <i>Radial shift</i>)



Resumen

El canal BK está involucrado en una gran variedad de procesos fisiológicos y las diversas subunidades reguladoras beta son responsables de crear la diversidad fisiológica del canal BK, fundamental para la adecuada función en muchos tejidos. A pesar la importancia fisiológica de este canal, poco se sabe acerca de su estructura detallada. En este trabajo se muestra la arquitectura externa de la subunidad alfa del canal BK utilizando la transferencia de energía basada en lantánidos (LRET) como una regla molecular. Se utilizó una secuencia codificada genéticamente que une lantánidos (LBT) para unir Tb^{+3} , capaz de actuar como dador de LRET. Como aceptores de LRET se utilizaron el fluoróforo BODIPY-FL y el ion Cu^{+2} . El primero se encuentra cerca del eje de simetría unido a una toxina del escorpión, la iberiotoxina, que se une al poro del canal. El segundo se une a un sitio ubicado en la cara extracelular del dominio sensor de voltaje. Estas dos aproximaciones fueron utilizadas paralelamente para medir distancias intra-moleculares en la estructura del canal BK, en una preparación *in vivo*. Tomando ventaja de la simetría tetramérica del canal, se construyó un mapa espacial del dador insertado en distintas posiciones de la parte extracelular del dominio sensor de voltaje respecto al eje de simetría y al plano del centro de la membrana. También fue posible describir en detalle los re-arreglos de conformación de la subunidad alfa inducidos por la subunidad beta1. Esta metodología nos da el primer vistazo a la arquitectura externa del canal BK en diferentes estados funcionales con y sin la subunidad beta1.

Abstract

BK channel is involved in a large variety of physiological processes and a variety of regulatory beta subunits are responsible of creating BK channel physiological diversity fundamental to their adequate function in many tissues. Regardless the proven importance of this channel little is known about its detailed structure. Here we disclose the external architectural intimacies of BK alpha subunit using Lanthanide-based Resonance Energy Transfer (LRET) as a molecular ruler. We used a genetically encoded Lanthanide Binding Tag (LBT) that binds Tb^{3+} as the LRET donor. As LRET acceptors we used the fluorophore BODIPY-FL and the Cu^{+2} ion. The former is near the symmetry axis bound to a scorpion toxin, iberiotoxin, which bounds to the channel pore. The second acceptor bounds to a site at the extracellular side of the voltage sensor domain. These two approaches were used in parallel to measure intra-molecular distances within the BK structure *in vivo*. Taking advantage of the four-fold symmetry of the channel, we build a spatial map of the donor being inserted in different positions at the external aspect of the voltage sensor domain with respect to the symmetry axis and the membrane plane. We also were able to describe the details of the beta1 subunit-induced rearrangements in alpha subunit. The methodology presented gives us the first glimpses to the BK channel external surface structure in its different functional states with and without the β 1-subunit.

1. Introducción

Los canales de iones son proteínas integrales de membrana presentes en todas las células de los sistemas vivos. La función de los canales es facilitar el paso de átomos cargados eléctricamente (iones) que viajan desde el citoplasma hacia el líquido extracelular y viceversa. El sentido que siguen los iones a través de los canales depende de la gradiente electroquímica formada entre el borde interno y el borde externo de la membrana celular. Ya que los canales de iones disipan las gradientes electroquímicas generadas por el transporte activo, realizado por las bombas de iones, se dice que el flujo de iones a través de ellos es un tipo de transporte pasivo (Hille, 1992). En las células excitables del sistema nervioso los canales de iones juegan un papel fundamental, ya que son estos los responsables de formar las vías de paso para la entrada de iones Na^+ y la subsiguiente salida de iones K^+ . Estos flujos de iones dan como resultado un cambio transitorio del potencial eléctrico de membrana, conocido como potencial de acción, capaz de auto-propagarse a lo largo de los axones (Hodgkin et al. 1952; Hodgkin & Huxley. 1952a; Hodgkin & Huxley. 1952b; Hodgkin & Huxley. 1952c; Hodgkin & Huxley. 1952d).

Existen muchos tipos de canales de iones, que pueden diferenciarse por sus distintas características como el tipo de ion que puede pasar a través de ellos (selectividad), la eficiencia con la que estos se transportan (conductancia) y el tipo de estímulo que los activa (excitabilidad). Tales estímulos pueden ser tan variados como cambios de potencial eléctrico de la membrana, cambios de temperatura, cambios en la concentración de neurotransmisores o segundos mensajeros, etc. La capacidad de traducir los estímulos, tanto internos como externos, en cambios del potencial eléctrico de la membrana celular convierte a los canales de iones en verdaderas antenas

moleculares que conectan tanto el mundo intracelular como el extracelular con el borde que delimita las células.

El canal de K^+ activado por Ca^{+2} de alta conductancia BK: un fino amortiguador de señales celulares

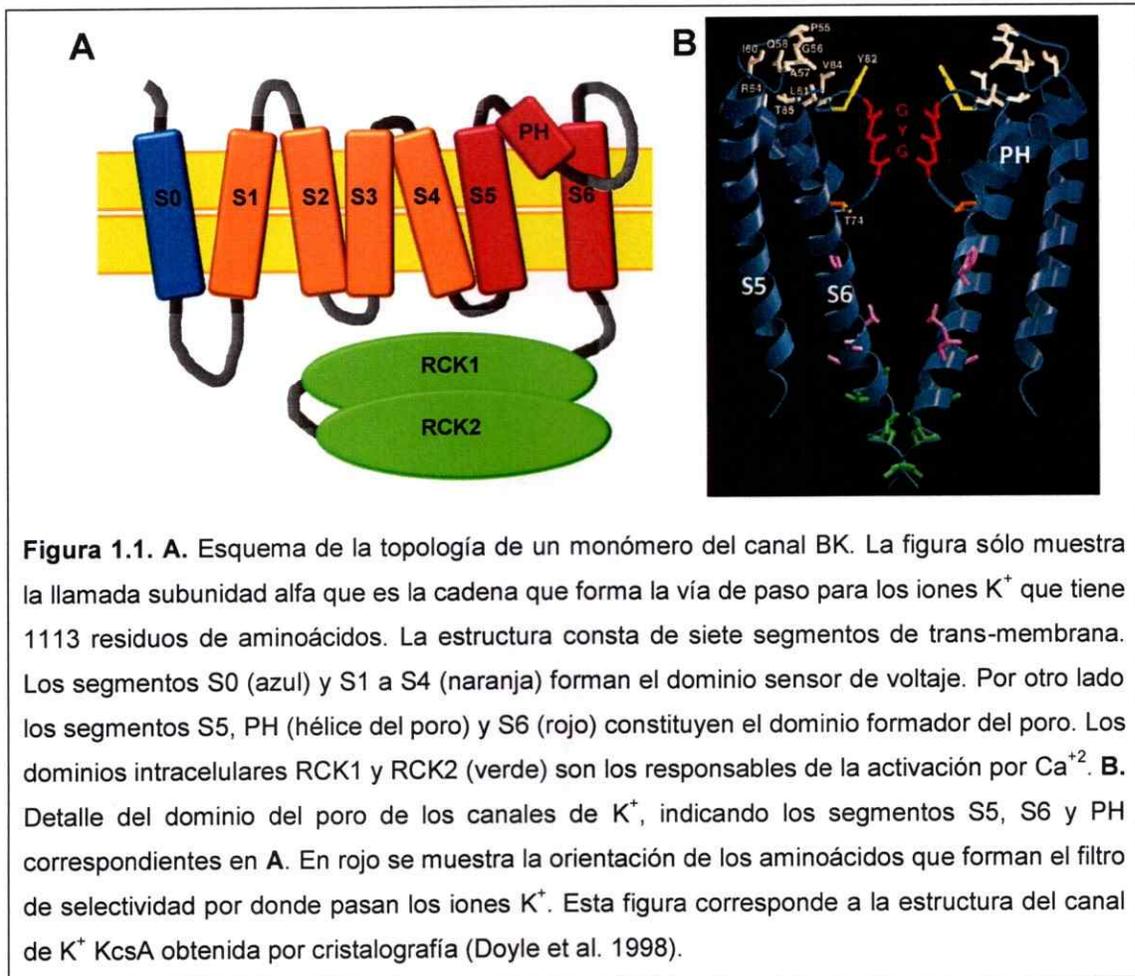
En las células excitables, los canales de K^+ juegan un rol fundamental en el proceso de re-polarización, pues son la vía de salida del ion K^+ desde el interior de la célula. En el caso de los canales de K^+ que son activados por Ca^{+2} intracelular (K_{Ca}), su activación debida a la entrada de Ca^{+2} a través de canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje (Ca_V), re-polariza la membrana frenando la entrada de este ion divalente. Así el BK forma parte de un sistema de realimentación negativa que regula finamente la entrada de Ca^{+2} al interior de las células (revisado en Cui et al. 2009; Contreras et al. 2013). El canal de K^+ activado por Ca^{+2} de alta conductancia, BK, posee algunas características que lo hacen único dentro de la familia de canales de K^+ . Este canal llamó la atención de los fisiólogos y biofísicos por su inusual conductancia y selectividad por K^+ , pues posee la mayor conductancia unitaria de entre todos los canales selectivos a K^+ que se conocen (250 pS en 100 mM K^+ simétrico), de ahí el nombre BK por *Big K^+ Conductance* (Marty, 1981; Pallotta et al. 1981; Latorre et al. 1982). Este canal se expresa en prácticamente todos los organismos del reino animal en diversos tipos celulares. Como ha sido mencionado, su función es la de contribuir a la homeostasis del Ca^{+2} intracelular, participando en procesos como el tono del músculo liso, la neurosecreción, establecimiento del mapa tonotópico de la cóclea, entre otras (Revisado en Latorre & Brauchi, 2006; Cui et al. 2009).

El BK es un tetrámero formado por cuatro subunidades alfa (α) ensambladas simétricamente (Shen et al. 1994). Este canal está emparentado con la familia de canales de K^+ activados por voltaje (K_V) ya que los monómeros de este canal tienen una topología de segmentos de transmembrana similar a la de los K_V , que poseen 6 segmentos de transmembrana (Shih & Goldin, 1997, Jiang et al. 2003, Long et al. 2007), pero con la singularidad que el BK posee 7 segmentos de transmembrana. El segmento de transmembrana adicional se encuentra en el terminal amino, precediendo en la secuencia los otros 6 segmentos y se le denomina S0 (Wallner et al. 1996; Meera et al. 1997) (Figura 1.1).

En los K_V los segmentos de transmembrana S1 a S4 forman el llamado dominio sensor de voltaje caracterizado por tener un grupo de aminoácidos cargados positivamente en el segmento S4. Estas cargas son las que otorgan la sensibilidad a voltaje en esta familia (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Seoh et al. 1996). Asimismo el BK puede ser activado cuando el voltaje de la membrana se hace más positivo, pero con una sensibilidad menor que la que se observa en la mayoría de los canales de la familia K_V (contrastar Seoh et al. 1996 con Stefani et al. 1997). Es posible realizar alineamientos de secuencia que muestran que las cargas del segmento S4 en el BK están conservadas con respecto al resto de los K_V (Diaz et al. 1998; Ma et al. 2006). Sin embargo se ha demostrado que los residuos responsables de conferir la sensibilidad a voltaje en el BK no se encuentran concentrados en el segmento S4 como ocurre en la familia de canal K_V (ver más abajo).

Al igual que en el resto de los canales de K^+ , la porción que comprende los segmentos S5 al S6 es la que forma el poro por donde transitan los iones (Doyle et al. 1998; Jiang et al. 2002a; Jiang et al. 2002b). Parte del bucle extracelular que conecta ambos

segmentos contiene la secuencia característica de residuos TVGYG que confiere la selectividad al ion K^+ (Heginbotham et al. 1994; Figura 1.1).



La porción restante del carboxilo terminal se encuentra totalmente en el lado citoplasmático (Figura 1.1). Esta tiene alrededor de 800 residuos de aminoácidos y contiene dos dominios RCK (Reguladores de conductancia de K^+) llamados RCK1 y RCK2 (Jiang et al. 2001; Jiang et al. 2002b; Wu et al. 2010; Yuan et al. 2010). Estos dominios RCK son los responsables de la unión del Ca^{+2} intracelular que tiene como resultado la apertura del canal (Wei et al. 1994; Bian & Moczydlowski, 2001; Moss & Magleby, 2001; Niu & Magleby, 2002; Xia et al. 2002; Yusifov et al. 2008; Yusifov et al.

2010) (Figura 1.1) por lo que el dominio intracelular es considerado un dominio sensor de Ca^{+2} . La activación del BK por el Ca^{+2} intracelular es una de las características distintivas de este canal y fue fuente de atención para quienes estudiaron el BK desde el comienzo (Marty, 1981; Pallotta et al. 1981; Latorre et al. 1982; Barrett et al. 1982; Moczdilowski & Latorre, 1983). Se han identificado principalmente dos sitios de Ca^{+2} de alta afinidad en el dominio carboxilo terminal intracelular, con constantes de disociación aparente (K_d) de entre 0.8 y 11 μM (Cox et al. 1997a; Cox et al. 1997b; Schreiber 1997; Xia et al. 2002; revisado en Cui et al. 2009). Uno de los sitios se encuentra en el "dominio RCK2 con una secuencia rica en residuos ácidos (aspartato y glutamato), llamada comúnmente tazón de Ca^{+2} (Schreiber et al. 1997) con una K_d de $\sim 3.4 \mu\text{M}$ (Niu & Magleby, 2002). El segundo sitio de alta afinidad se encuentra en el dominio RCK1 ($K_d \sim 17 \mu\text{M}$) y no posee una secuencia rica en residuos ácidos con (Xia 2002).

La combinación entre su gran selectividad a K^+ , su alta conductancia y su sensibilidad al Ca^{+2} intracelular así como al potencial eléctrico de la membrana, convierten al BK en una interesante máquina molecular, cuyo estudio nos puede ayudar a develar los mecanismos que gobiernan la traducción de las energías eléctricas y químicas en energía mecánica (la apertura del poro de conducción).

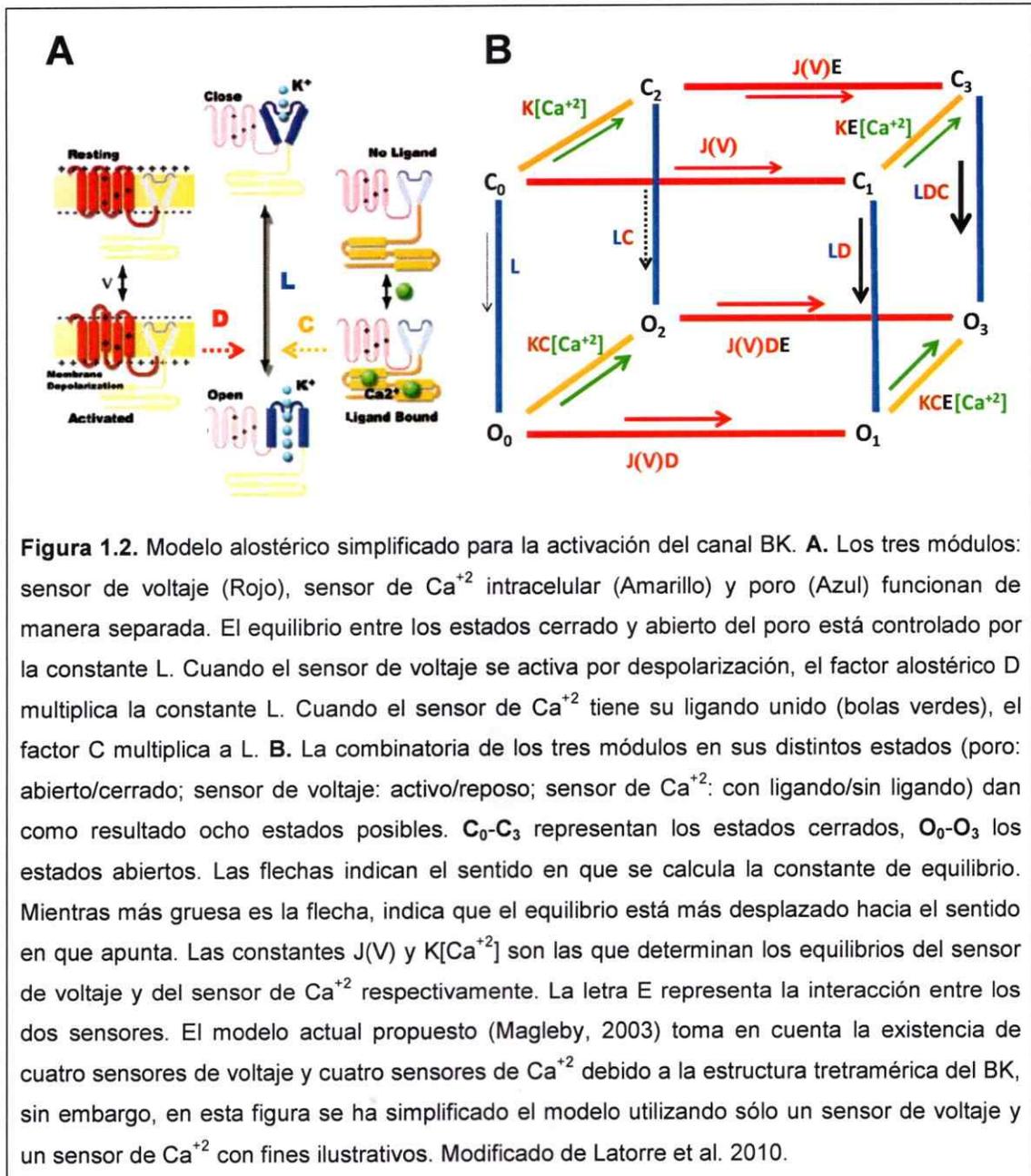
El BK como modelo de proteína alostérica

Funcionalmente la activación del BK tanto por el potencial eléctrico de la membrana como por la unión a Ca^{+2} intracelular se ha descrito con éxito sobre la base de un modelo alostérico de tipo Monod-Wyman-Changeux (MWC) propuesto originalmente para la unión de oxígeno en la hemoglobina (Monod et al. 1965). Este modelo supone que el funcionamiento de ambos sensores (tanto de voltaje como de Ca^{+2} intracelular)

no está estrictamente acoplado a la apertura del poro, y por lo tanto la activación de estos sensores no es necesaria para que el canal se abra. En este contexto los sensores de voltaje y de Ca^{+2} actúan como facilitadores del proceso de apertura del canal cuando ellos entran en su estado activado y con ligando unido respectivamente (Figura 1.2). Es posible encontrar diversas evidencias que sugieren que el modelo alostérico es el que mejor describe el comportamiento del BK frente a los estímulos de voltaje y de Ca^{+2} intracelular (Cox et. 1997a; Cox et al. 1997b; Cui et al. 1997; Horrigan & Aldrich, 1999; Horrigan et al. 1999; Cox & Aldrich, 2000; Rothberg & Magleby, 2000; Horrigan & Aldrich, 2002, revisado en Magleby, 2003). Este tipo de modelo es distinto al propuesto por Hodgkin y Huxley para explicar la corriente llevada por los canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv) en el axón del calamar, en cuyo caso es necesaria la activación de los cuatro dominios sensores de voltaje para la apertura de poro (Hodgkin & Huxley, 1952d).

En el modelo alostérico propuesto, el poro del canal puede pasar al estado abierto con el sensor de voltaje en estado de reposo y sin tener Ca^{+2} unido. En estas condiciones la razón entre canales abiertos y cerrados está dominada por la constante de equilibrio L (Figura 1.2). Sin embargo el valor de esta constante es muy pequeño, por lo que la probabilidad de encontrar el canal abierto en estas condiciones es muy baja (Horrigan & Aldrich, 1999). Cuando el sensor de voltaje es activado a causa de la despolarización de la membrana, la constante de equilibrio que controla la apertura del poro aumenta D veces. Este número D es llamado factor alostérico y se relaciona con la energía que aporta el sensor de voltaje para facilitar la apertura del poro. De la misma manera, cuando el dominio sensor de Ca^{+2} une su ligando, la probabilidad del canal abierto aumenta debido al factor alostérico C (Figura 1.2). De esta manera cuando ambos sensores se activan (cuando hay despolarización y Ca^{+2} intracelular unido), la

constante de equilibrio que determina la apertura del poro, aumenta de L a LCD (ya que los factores alostéricos son números mayores que 1). De esta manera, el modelo alostérico supone módulos separados que actúan alostéricamente sobre el sitio activo (la compuerta del poro en el caso de los canales).

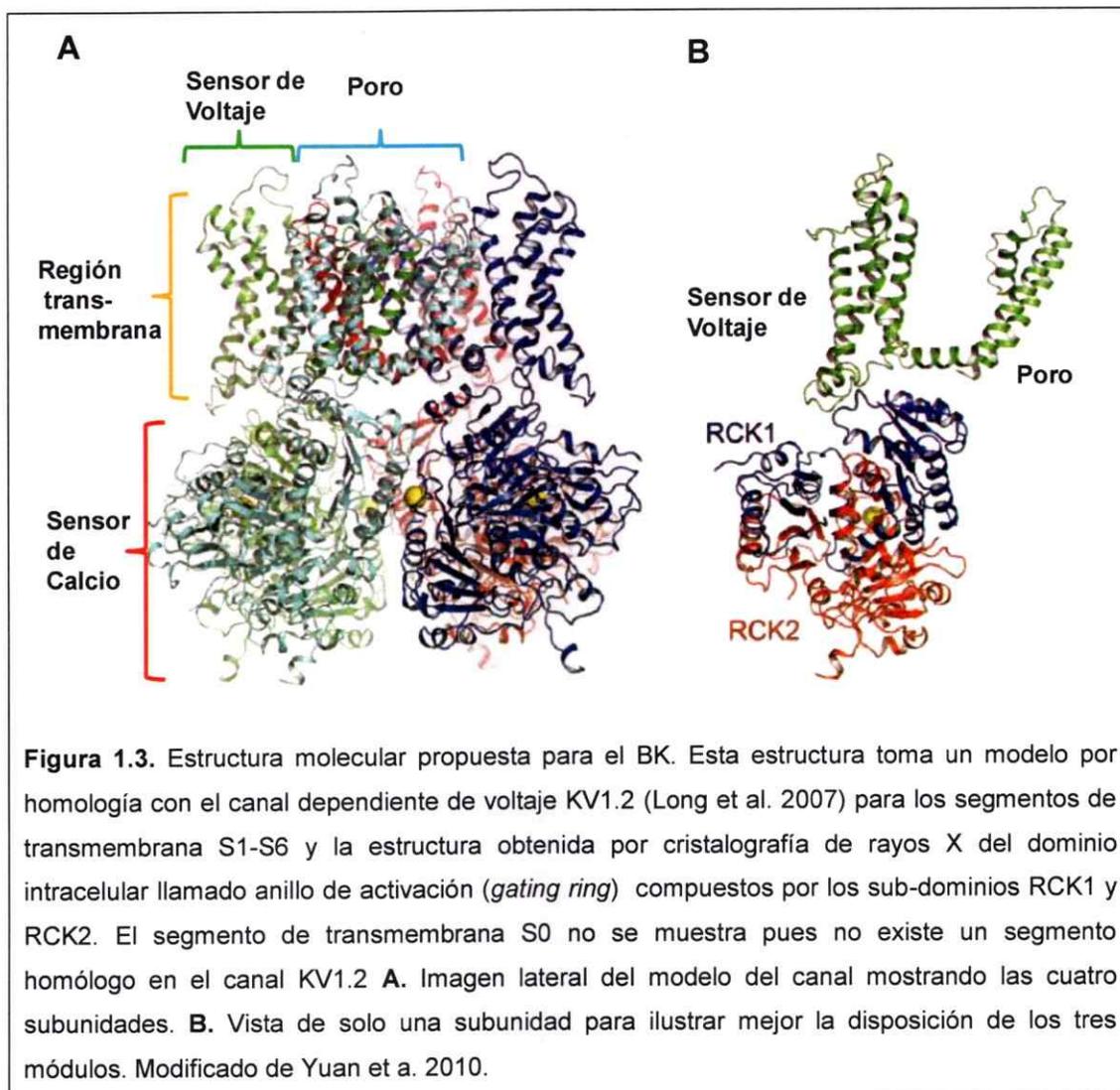


Una de las evidencias más contundentes que sostienen la tesis del modelo alostérico es la demostración de que el sensor de voltaje es capaz de activar la apertura del poro en ausencia total de Ca^{+2} intracelular (Horrigan et al. 1999). Al mismo tiempo, al ligar Ca^{+2} la probabilidad de encontrar el canal abierto aumenta alrededor de 2000 veces, cuando los sensores de voltaje están en estado de reposo (Horrigan & Aldrich, 2002).

En términos del mecanismo físico del funcionamiento del BK, este modelo sugiere que los diferentes módulos existen como entidades estructurales definidas y separadas unas de otras. Esta imagen estructural del canal utilizando módulos separados se ha mostrado experimentalmente de manera parcial, ya que no se ha obtenido aún una estructura completa del BK utilizando cristalografía de rayos X, que es la técnica de resolución más alta utilizada en la actualidad. Se ha publicado dos estructuras del dominio intracelular sensible a Ca^{+2} obtenidas con esta técnica, con una resolución de 3.1 Å (PDB ID 3NAF, Wu et al. 2010) y 3.0 Å (PDB ID 3MT5, Yuan et al. 2010), respectivamente. En ambas estructuras publicadas los ocho dominios intracelulares RCK se disponen en forma de anillo (denominado anillo de activación o *gating ring*). Esta disposición particular de los dominios RCK se demostró anteriormente en canales de K^+ de organismos procariontes que tienen cierta identidad de secuencia con el BK (Jiang et al, 2001; Jiang et al 2002). También está disponible una estructura cristalina para una parte del dominio sensor de voltaje que comprende los segmentos S3 y S4 (Unnerstale et al. 2009). Por otro lado, una estructura del canal completo fue obtenida con una baja resolución (1.7 nm) utilizando la técnica de crio-microscopía electrónica y procesamiento digital de imágenes (Wang & Sigworth, 2009). Sin embargo la información obtenida en este estudio no deja claro cuál es la disposición de cada uno de los segmentos de trans-membrana del dominio sensor de voltaje del BK respecto al dominio formador del poro.

Para suplir la carencia de información acerca de la disposición de los segmentos de transmembrana S1 a S6 se ha utilizado la estructura disponible del canal completo $K_v1.2/2.1$ obtenida con una resolución de 2.4 Å (Long et al. 2007). La estructura obtenida del sensor de voltaje correspondería a la conformación relajada que se alcanza cuando el canal se encuentra abierto durante un tiempo prolongado (Villalba-Galea et al. 2008), pues las condiciones de cristalización así lo favorecen. En esta estructura las cuatro hélices del sensor de voltaje atraviesan la membrana (S1 a S4) formando un dominio estructural claramente separado del dominio formador del poro (S5 a S6), dando un apoyo estructural a la evidencia de que los 4 sensores de voltaje funcionan de manera independiente (discutido en Horn, 2009, Figura 1.3).

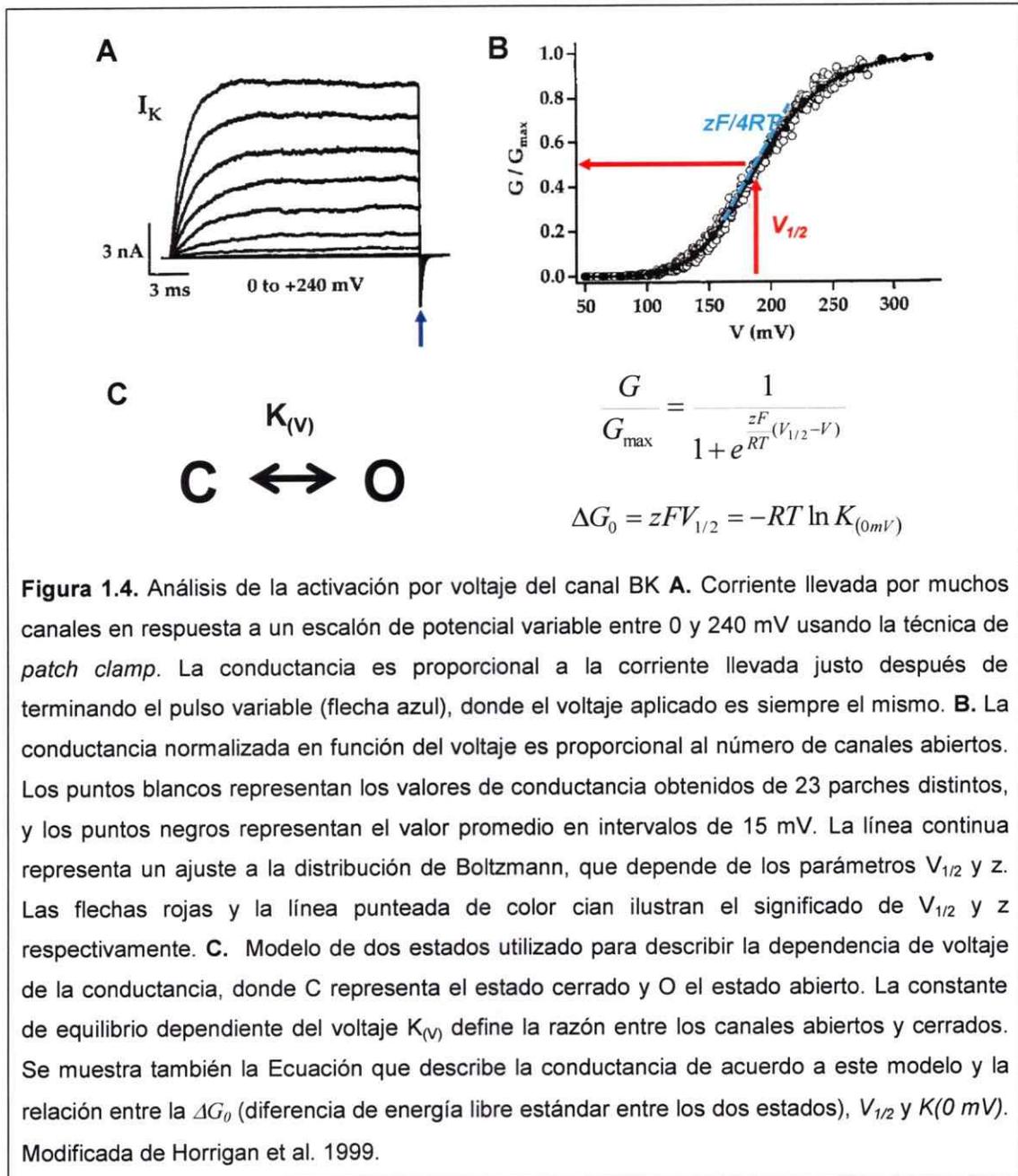
Sobre la base de esta información se ha construido un modelo por homología de los segmentos de trans-membrana del BK, uniéndolo con el anillo de activación (Figura 1.3). Pero este modelo por homología carece del segmento S0 pues como se ha mencionado, éste no está presente en ningún canal de la familia K_v por lo que la posición del segmento S0 en el sensor de voltaje permanece actualmente desconocida. A pesar de la información incompleta de la estructura del BK, el modelo propuesto muestra una imagen de este canal con sus dominios sensibles a voltaje y Ca^{+2} intracelular como módulos separados que actúan a distancia sobre el dominio que forma el poro por donde pasa el ion K^+ y que lo activan dependiendo del estímulo, lo que está de acuerdo con el modelo alostérico de activación que se ha descrito más arriba (Figuras 1.2 y 1.3).



El sensor de voltaje del canal BK: un caso especial dentro de los canales activados por voltaje

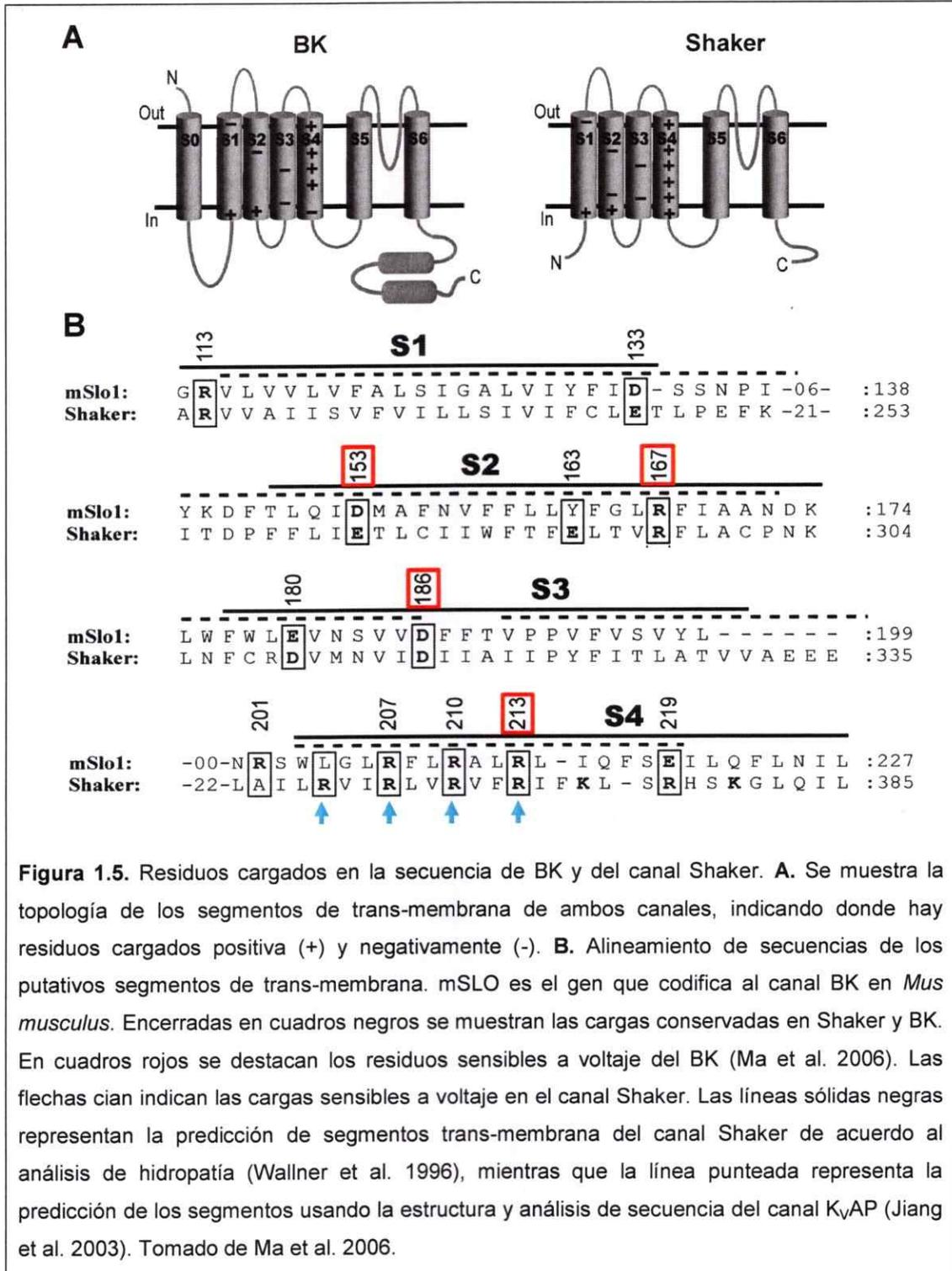
Como ya se ha mencionado, el canal BK es activado por despolarización de la membrana (Pallotta et al. 1981; Latorre et al. 1982; Meera et al. 1996; Stefani et al. 1997). Como regla general, la dependencia de voltaje de la activación de un canal se origina por cambios en la distribución de carga dentro del campo eléctrico de la membrana. Las cargas involucradas pueden ser tanto residuos cargados como dipolos presentes en la estructura de la proteína (Baumann & Mueller, 1974; Yantorno et al. 1982). La forma más utilizada para caracterizar la activación por voltaje de un canal es el análisis de la conductancia en función del voltaje aplicado (curva G/V). Aplicando la distribución de Boltzmann a un modelo de dos estados (cerrado/abierto), la curva G/V teórica tiene una forma sigmoidea, siguiendo los puntos experimentales (Figura 1.4). En este análisis el voltaje al cual la conductancia es la mitad del máximo es llamado $V_{1/2}$ y se relaciona con la diferencia de energía entre el estado abierto y cerrado (Figura 1.4). La pendiente de la curva en $V = V_{1/2}$ es igual a $zF/4RT$, donde zF es la carga eléctrica por mol, que es desplazada en el campo eléctrico y que está asociada con la apertura del canal.

Al aplicar un pulso de voltaje se produce un cambio súbito en el campo eléctrico de la membrana, lo que provoca una redistribución de las cargas. Esto genera una corriente transitoria que puede ser medida en condiciones experimentales adecuadas (p ej. Armstrong y Bezanilla, 1974). Integrando esta corriente transitoria en el tiempo es posible calcular la cantidad de carga que se ha desplazado tras el cambio del voltaje aplicado. La distribución de carga desplazada en función del voltaje se llama curva Q/V (por carga versus voltaje) y también puede analizarse utilizando la distribución de Boltzmann como en el caso de la curva G/V (Figura 1.4).



De esta misma manera el voltaje al cual la mitad de la carga total ha sido desplazada está relacionado con la diferencia de energía entre los estados de reposo y activado del dominio sensor de voltaje.

Para el BK, el $V_{1/2}$ de la conductancia en ausencia de Ca^{+2} está entre 180 y 210 mV en 0 mM Ca^{+2} intracelular, mientras que el valor de z es de 1.0 (Horrigan et al. 1999; Cox & Aldrich, 2000; Orio & Latorre, 2005). Respecto a la cantidad de carga que se mueve en el proceso de activación por potencial eléctrico, se ha calculado que en el BK la carga total que se desplaza es de ~ 4.4 cargas elementales por canal (Stefani et al. 1997). Este valor es menor al encontrado en el canal Shaker, representante más estudiado de la familia K_v , que tiene ~ 13 cargas elementales por canal asociadas a la activación por voltaje (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Seoh et al. 1996). En los canales K_v los residuos cargados involucrados en la activación son cuatro argininas que se encuentran en el segmento S4 (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Seoh et al. 1996; Figura 1.5). A pesar de que las secuencias muestran que el BK tiene agrupaciones de cargas en el segmento S4 similares a las encontradas en los canales K_v , se ha demostrado que las cargas que contribuyen mayoritariamente a la activación por potencial en BK son D153 y R167 en el segmento S2, D186 en el S3 y R213 en el S4 (Ma et al. 2006, Figura 1.5). Se ha demostrado que al neutralizar los otros residuos cargados del segmento S4 en el BK (Figura 1.5), se altera el equilibrio entre las conformaciones de reposo y activa del sensor de potencial, sin reducir la carga asociada a la apertura (Horrigan et al. 1999; Ma et al. 2006). Por ejemplo la mutación R207Q estabiliza el estado activado del sensor de voltaje, haciendo necesaria menos energía eléctrica para activar el sensor (Diaz et al. 1998). El resultado es el desplazamiento de la curva conductancia en función del voltaje (G/V), hacia voltajes más negativos. En el mutante R207Q el sensor de voltaje muestra un $V_{1/2}$ de -105 mV mientras que el canal silvestre se midió un $V_{1/2}$ de 173 mV (Horrigan et al. 1999; Ma et al. 2006). Esto significa que la diferencia de energía entre el estado activado y en reposo del sensor de voltaje cambia desde 9.7 kJ/mol a -5.9 kJ/mol cuando se realiza la mutación R207Q (Ma et al. 2006).



La fluorometría es una herramienta experimental que ha sido utilizada exitosamente para estudiar cambios de conformación en las proteínas. Esta técnica consiste en medir los cambios de intensidad de la emisión de una molécula fluorescente, la cual está unida a un lugar específico dentro de la estructura de la proteína. Los cambios en la intensidad de la fluorescencia ocurren debido al cambio de ambiente en el que se encuentra la sonda fluorescente (revisado en Lakowicz, 2006). Esta aproximación ha sido utilizada para estudiar la activación por voltaje del BK. De esta manera ha sido posible establecer una correlación entre la cinética de activación de la conductancia de K^+ y la fluorescencia de una sonda ubicada en el segmento S4 en función del potencial eléctrico aplicado (Savalli et al. 2006). Posteriormente se demostró que también existe dependencia de voltaje en la fluorescencia de la sonda cuando la marca se ubica en la cercanías del segmento S2 (Pantazis et al. 2010a). En este último reporte se evaluó el efecto de neutralizar de manera independiente las cargas D153 (en el segmento S2) y R213 (en el segmento S4) sobre la fluorescencia con la sonda ubicada o bien en el segmento S2 o bien el segmento S4. El resultado obtenido es que neutralizando la carga de un segmento se observa un efecto sobre la dependencia de voltaje de ambas marcas, tanto para la carga D153 como para la R213. Esto sugiere que el cambio de conformación que ocurre en el sensor de voltaje del BK es un proceso cooperativo y requiere que al menos ambos segmentos, S2 y S4, cambien su conformación de manera concertada.

Por otro lado distintas aproximaciones experimentales han demostrado que en el canal Shaker es el segmento S4 el que sufre los cambios de conformación más importantes en el dominio sensor de voltaje (Baker et al. 1998; Jiang et al. 2003; Gandhi et al. 2003; Ruta et al. 2005; Gonzalez et al. 2005; Phillips et al. 2005; Chanda et al., 2005; Posson et al. 2005; Ahern & Horn, 2004; revisado en Tombola et al. 2005; Chanda & Bezanilla.

2008). Estos resultados sugieren que el sensor de voltaje del canal BK opera de manera diferente a la que funciona el sensor de voltaje en la familia K_v , aunque a partir de la identidad en la secuencia que existe entre los canales K_v y el BK se puede pensar lo contrario, es decir que funcionan de manera similar.

El segmento S0

Además de lo recién expuesto es necesario tener en cuenta que el BK tiene el segmento de trans-membrana S0. Esta parte del dominio sensor de voltaje fue descrita por primera vez como una parte fundamental del BK para la interacción con la denominada subunidad beta1 (Wallner et al. 1996, Meera et al. 1997). Uno de los efectos de esta subunidad accesoria es la de modificar la operación del sensor de voltaje del BK (Meera et al. 1996; Dworetzky et al. 1996; Orio & Latorre, 2005; Contreras et al. 2012). También algunos experimentos sugieren que el segmento S0 define el punto de operación del sensor de voltaje, pues mutaciones puntuales en este segmento muestran un desplazamiento del $V_{1/2}$ de la curva G/V hacia voltajes negativos, indicando que este segmento participa en la estabilización de la conformación activa del sensor de voltaje (Kóval et al. 2007).

Además se ha reportado que el residuo W203 del segmento S4 es capaz de apagar una marca fluorescente introducida en el segmento S0, lo que sugiere que existe un acercamiento entre los segmentos S0 y S4 al activar el BK por voltaje (Pantazis et al. 2010b).

Como se mencionó anteriormente, la estructura del canal BK obtenida a partir de criomicroscopía no logró dar pistas concretas acerca de la posición del segmento S0 en relación al dominio sensor de voltaje (Wang & Sigworth, 2009). Por otro lado utilizando experimentos de *crosslinking* por formación de enlaces di-sulfuro entre residuos de

cisteína introducidos, se ha sugerido que el segmento S0 estaría en las cercanías del segmento S4, teniendo contacto con los segmentos S1 y S3, y en menor medida con el segmento S2, pero alejado de los segmentos S5 y S6 (Liu et al. 2008a; Lui et al. 2010). Aunque la distancia entre los núcleos de azufre de un enlace di-sulfuro es de 3 Å, se pueden formar enlaces di-sulfuro entre residuos que se encuentran hasta 15 Å de distancia en la estructura cristalina de una proteína (Butler & Falke, 1996). Esto hace que los resultados sean el producto tanto de la cercanía relativa entre los distintos segmentos pero también de la flexibilidad de cada parte de la cadena polipeptídica. Los reportes mencionados más arriba apuntan a que el segmento S0 cumple un rol importante en la funcionalidad del dominio sensor de voltaje en el BK y es posible que esté involucrado en los cambios de conformación que sufre el sensor.

La subunidad beta1: un notable regulador funcional del canal BK

La funcionalidad del canal BK puede verse afectada además por otro tipo de factores. Dentro de estos factores uno especialmente interesante es el efecto de las subunidades regulatorias beta. Estas subunidades corresponden a proteínas de dos segmentos de trans-membrana (TM1 y TM2) con sus extremos amino y carboxilo intracelulares y con un largo bucle extracelular. Hasta ahora se han descrito cuatro distintas subunidades, desde beta1 hasta beta4. El fenotipo observado al co-expresar estas subunidades accesorias con la subunidad alfa (formadora del poro), da como resultado efectos diversos como cambios en la afinidad aparente a Ca^{+2} , cambios en la cinética de activación o desactivación de las corrientes e inactivación rápida de tipo bola-cadena, dependiendo de la subunidad (Knaus et al. 1994a; Knaus et al. 1994b; McManus et al. 1995; Uebele et al. 2000; Wallner et al. 1999; Xia et al. 2000; revisado en Orio et al. 2002). Estas distintas subunidades beta se expresan diferencialmente en

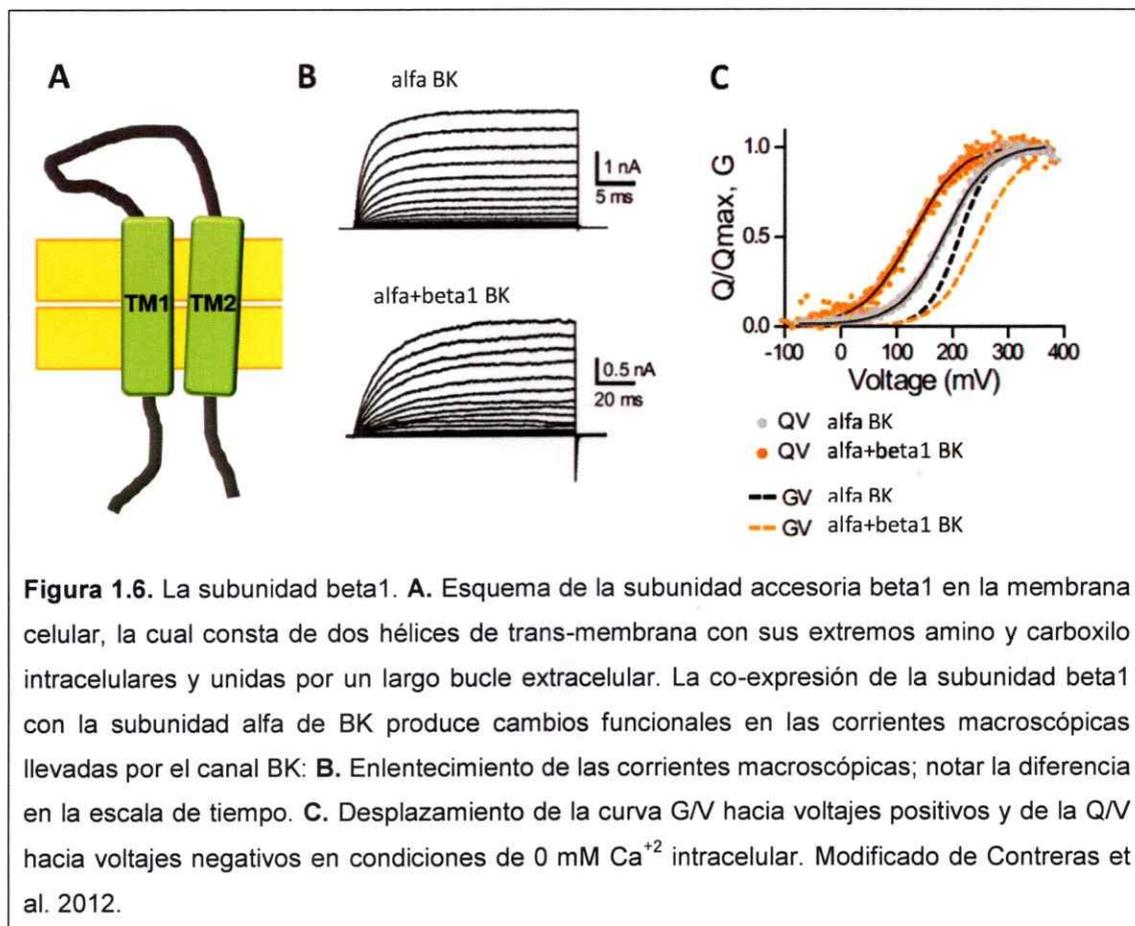
los tejidos provocando una fina regulación funcional que determina el papel que desempeña el BK en los distintos tipos celulares donde se expresa (revisado en Orio et al. 2002).

La subunidad beta1 fue la primera en ser descubierta (Knaus et al. 1994a; Knaus et al. 1994b) y es esta subunidad accesoria en la que centrará su atención esta tesis. Esta subunidad se expresa principalmente en el músculo liso y se cree que cumple un rol en la mantención del tono muscular (revisado en Orio et al. 2002). Funcionalmente su co-expresión con la subunidad alfa produce un notorio enlentecimiento de las cinéticas de activación y desactivación del BK. Además produce un aumento aparente en la sensibilidad a Ca^{+2} , desplazando las curvas G/V hacia voltajes negativos al aumentar la concentración de Ca^{+2} intracelular. Aunque en condiciones de 0 mM Ca^{+2} intracelular la curva G/V se encuentra desplazada hacia voltajes positivos (McManus et al. 1995; Meera et al. 1996; Dworetzky et al. 1996; Orio & Latorre, 2005; Contreras et al. 2012; Figura 1.6).

También se ha demostrado que la presencia de la subunidad beta1 hace al canal BK sensible a la acción de 17β -estradiol desplazando la curva G/V hacia voltajes negativos (Valverde et al. 1999). En este reporte se demostró que el efecto del 17β -estradiol ocurre de manera directa sobre el canal BK sin existir una señal intermediaria, demostrando que puede existir una regulación hormonal sobre el canal BK.

La subunidad beta1 tiene un efecto dual sobre el canal BK en ausencia de Ca^{+2} , pues como se ha mencionado anteriormente, la curva de conductancia (G/V) se desplaza hacia voltajes positivos, pero la curva de carga desplazada por el sensor de voltaje (Q/V) se desplaza hacia voltajes negativos (Bao & Cox, 2005; Contreras et al. 2012). Esto además indica directamente que la subunidad beta1 modifica la función del

dominio sensor de voltaje, y por lo tanto la estructura del mismo podría ser diferente cuando esta subunidad accesoria está presente.



Con respecto a la información estructural de la subunidad beta1 se sabe que el segmento S0 junto con el extremo amino terminal de la subunidad alfa son fundamentales para permitir la interacción entre ambas proteínas (Wallner et al. 1996; Morrow et al. 2006). También se tiene evidencia de que bucle extracelular de la subunidad beta1 podría encontrarse cercano al poro en la subunidad alfa ya que la presencia esta subunidad modifica la unión de toxinas provenientes del veneno del escorpión que bloquean el poro (Hanner et al. 1997; Hanner et al. 1998). Esta cercanía

es apoyada por experimentos donde fue posible unir covalentemente una de estas toxinas (la caribdotoxina) con el mencionado bucle extracelular, utilizando la técnica de *crosslinking* entre residuos de cisteína introducidos (Munujos et al. 1995).

Utilizando construcciones quiméricas entre las subunidades beta1 y beta2IR (sin bola de inactivación) se logró determinar que los dominios citoplasmáticos son responsables del efecto que estas subunidades tienen sobre la corriente llevada por el BK (Orio et al. 2006). Este estudio sugiere que la subunidad beta1 podría interactuar ya sea con el dominio sensor de voltaje o con los dominios que asocian su activación con la apertura del canal. Por otro lado existe información que sugiere que el bucle extracelular que une los segmentos TM1 y TM2 es importante para el efecto de la subunidad beta1 sobre la activación del BK por Ca^{+2} y por voltaje (Fernandez-Fernandez et al. 2004; Gruslova et al. 2011).

Estructuralmente, la posición relativa de los dos segmentos de trans-membrana de la subunidad beta1 permanece desconocida. Sin embargo una pista fue arrojada por un grupo de investigadores que utilizando la técnica de *crosslinking* postularon que el segmento TM1 podría estar en la cercanías de los segmentos S1 y S2 de la subunidad alfa, mientras que el segmento TM2 estaría en la vecindad del segmento S0 (Liu et al. 2008b; Liu et al. 2010). La co-expresión de las subunidades alfa y beta1, cada una llevado dos sustituciones de residuos de cisteína en ciertas posiciones, dieron como resultado dos subunidades alfa entrecruzadas con una subunidad beta1. Estos resultados sugieren que los dos segmentos trans-membrana de la subunidad beta1 interactúan con sensores de voltaje de subunidades alfa adyacentes dentro del mismo canal (Liu et al. 2010).

LRET, una regla espectroscópica

Una técnica espectroscópica llamada Transferencia de Energía Resonante de Förster (FRET, por su sigla correspondiente en inglés) ha sido utilizada para medir cambios de conformación en macromoléculas (revisado en Lilley & Wilson, 2000; Selvin 2002). Esta técnica se basa en la interacción de tipo dipolo-dipolo que ocurre entre moléculas que se excitan con radiación electromagnética, típicamente dos fluoróforos. Esta interacción se produce de la siguiente forma: primero una molécula que llamaremos dador, es excitada al ser iluminada con luz de una longitud de onda específica. Cuando el dador está en estado excitado, eventualmente vuelve a su estado basal perdiendo la energía que ganó en el proceso de excitación. En general, el estado excitado del dador se extingue a través de un proceso radiativo (emisión de un fotón), pero también existen mecanismos no radiativos (p. ej. apagamiento colisional). La probabilidad por unidad de tiempo de que el dador deje el estado excitado está definida por la constante de rapidez k_D que incluye tanto la vía radiativa como las no radiativas (excepto la interacción FRET). Esto predice que la cantidad de dadores excitados en el tiempo sigue un decaimiento exponencial, donde la constante de tiempo del decaimiento es $\tau_D = k_D^{-1}$. La emisión de fluorescencia del dador es proporcional a la cantidad de dadores en estado excitado, por lo que es posible calcular k_D a partir del curso temporal del decaimiento de la fluorescencia del dador.

Si en las cercanías del dador excitado existe otra molécula capaz de excitarse con radiación electromagnética, la energía del dador puede transferirse por resonancia a esta segunda molécula que llamaremos aceptor. A través de esta transferencia de energía no radiativa el dador vuelve a su estado basal, lo que significa un mecanismo adicional de decaimiento del dador. La transferencia de energía se produce porque el dipolo oscilante del dador en estado excitado puede inducir un dipolo oscilante en el

aceptor por medio de resonancia. Llamaremos k_T a la probabilidad por unidad de tiempo de que un dador en estado excitado se relaje al estado basal transfiriéndole la energía al aceptor. Dada la condición de que existe una nueva vía de decaimiento al estado basal para el dador debido a la presencia del aceptor, el número de dadores en estado excitado sigue también un decaimiento exponencial pero con un tiempo de vida más corto $\tau_{DA} = (k_D + k_T)^{-1}$. Podemos entonces calcular k_T a partir de la constante de tiempo del decaimiento del dador en presencia del aceptor τ_{DA} , si conocemos k_D a partir del decaimiento del dador en ausencia del aceptor. Esta forma de interacción fue descrita por Theodor Förster en 1948 (Förster, 1948; revisado en Lakowicz, 2006) en términos de k_D y k_T :

$$k_T = k_D \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad \text{Ecuación 1}$$

En la Ecuación 1, r es la distancia entre el dador y el aceptor, y R_0 es la distancia a la cual k_T es igual a k_D . R_0 resulta ser una constante que depende principalmente de los espectros de emisión del dador y de absorción del aceptor y de la orientación relativa entre los dipolos de transición de ambas moléculas (Förster, 1948; revisado en Selvin, 2002; Lakowicz, 2006):

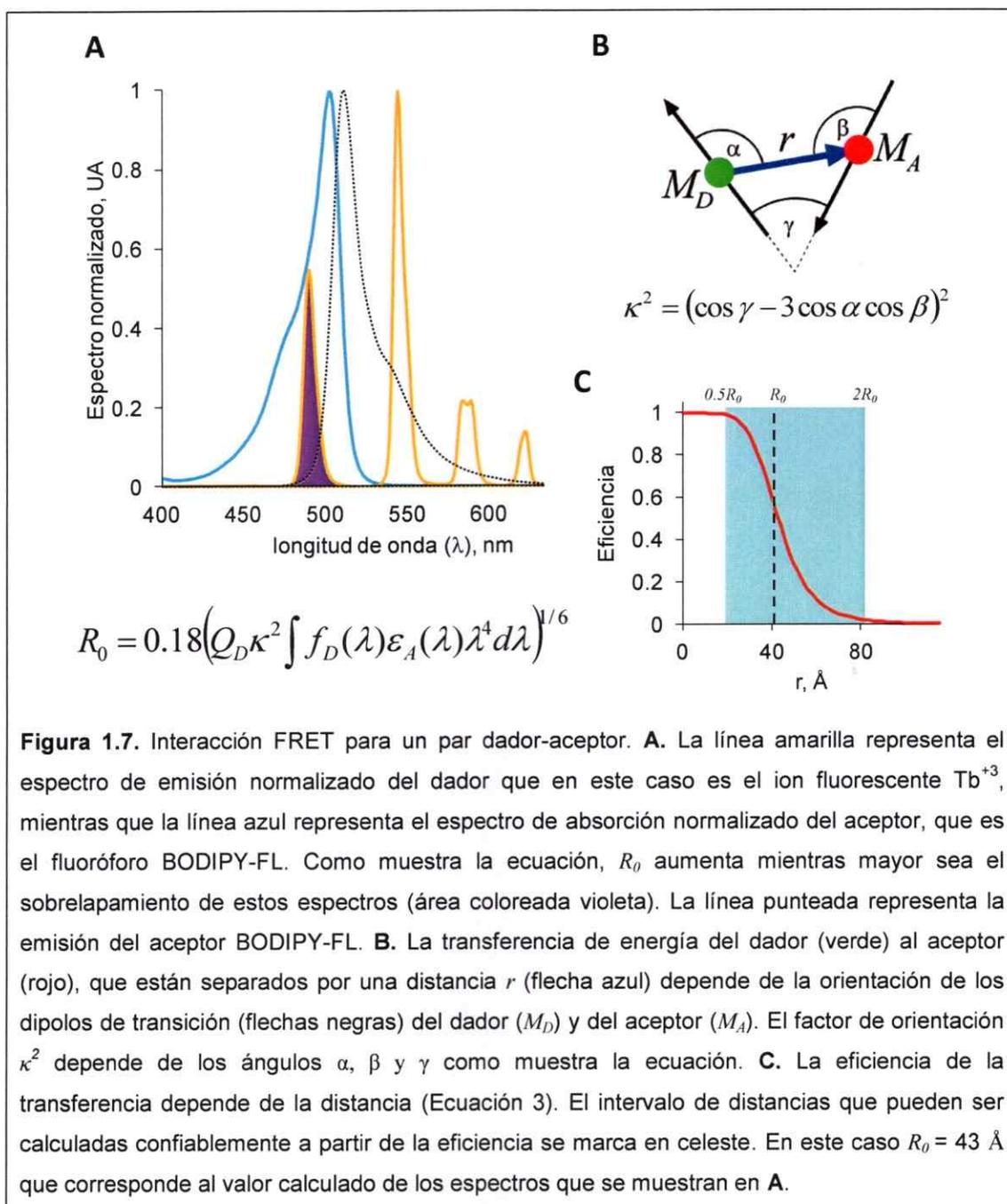
$$R_0 = 0.18 \left(Q_D K^2 \int f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right)^{1/6} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde Q_D es el rendimiento cuántico del dador, que es la fracción de dadores que se relajan emitiendo un fotón (sin tomar en cuenta la interacción FRET). $f_D(\lambda)$ y $\varepsilon_A(\lambda)$ son puntos del espectro de fluorescencia del dador y el espectro de absorción del aceptor respectivamente. Por lo tanto la integral sobre todos los valores de λ es una medida de cuánto se superponen ambos espectros (Figura 1.7). κ^2 es el llamado factor de orientación que puede tomar valores entre 0 y 4 dependiendo de los ángulos relativos entre dipolos de transición (Figura 1.7). Es claro que para una orientación definida de los dos dipolos de transición, R_0 crece cuanto: más alto sea el rendimiento cuántico del dador, más grande sea el coeficiente de extinción del aceptor, mayor sea la superposición de los espectros de emisión y absorción, y más largas sean las longitudes de onda en que se sobreponen ambos espectros (Ecuación 2).

La eficiencia de la transferencia, E , está definida como la fracción de dadores que vuelven al estado basal transfiriendo la energía por medio de FRET, y se calcula como:

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_D} = \frac{1}{1 + (r / R_0)^6} \quad \text{Ecuación 3}$$

Como muestra la Ecuación 3, la eficiencia de la transferencia varía con la sexta potencia de la distancia, r , por lo que pequeños cambios en la distancia se ven reflejados en grandes cambios de la eficiencia (revisado en Selvin 2002), aunque solo en un intervalo corto de distancias en la vecindad de R_0 (Figura 1.7). Si se conocen las propiedades espectroscópicas de las moléculas involucradas y se conoce el valor de κ^2 es posible calcular el valor de R_0 . De esta manera es fácil conocer la distancia que separa a las dos moléculas utilizando la Ecuación 1 si conocemos k_D y k_T , o la Ecuación 3 si conocemos la eficiencia de la transferencia, E .



Podemos entonces considerar la técnica de FRET una “regla espectroscópica” capaz de medir distancias en el orden de las decenas de angstroms (Å) siempre y cuando se tenga la certeza de que el factor de orientación es constante. Experimentalmente se

ha utilizado FRET para estudiar cambios de conformación en proteínas o complejos proteicos, marcando con sondas fluorescentes residuos de cisteína introducidas en la secuencia peptídica (revisado en Lilley & Wilson, 2000). Actualmente esta técnica ha sido perfeccionada al punto de poder observar FRET en moléculas únicas (p ej. Akuyz et al. 2013).

El factor de orientación κ^2 resulta ser a menudo difícil de calcular para fluoróforos convencionales cuya emisión en general es anisotrópica y sus estados excitados tienen un tiempo de vida del mismo orden de magnitud que el de los movimientos moleculares del mismo fluoróforo. Esto hace que el valor obtenido para la distancia calculada entre las dos sondas sea poco confiable.

Existe una variante del FRET que utiliza como dador un ion fluorescente, típicamente los lantánidos Tb^{+3} o Eu^{+3} . Esta variante es denominada LRET (por sus siglas en inglés, *Lanthanide based Resonance Energy Transfer*) y tiene ciertas ventajas sobre el FRET convencional que utiliza sondas fluorescentes orgánicas. Esta técnica ha sido utilizada efectivamente en el pasado para medir distancias en macromoléculas como DNA, proteínas solubles y proteínas de membrana (Ka Luk, 1971; Horrocks et al. 1975; Khan et al. 1978; Selvin & Hearst, 1994; Getz et al. 1998; Cha et al. 1999; Posson et al. 2005; Posson & Selvin, 2008; Hyde et al. 2012; revisado en Selvin, 2002). La mayor ventaja del LRET sobre el FRET para medir distancias es que la emisión del dador es no polarizada y el tiempo de vida de su estado excitado es del orden de los milisegundos. Esto le da tiempo suficiente al aceptor para adoptar todas las orientaciones posibles, por lo que el error en el cálculo de κ^2 es insignificante (revisado en Selvin, 2002). Ya que en estas condiciones ambos dipolos de transición se orientan sin ninguna preferencia, el valor promedio de κ^2 sobre todas las orientaciones posibles resulta ser 2/3.

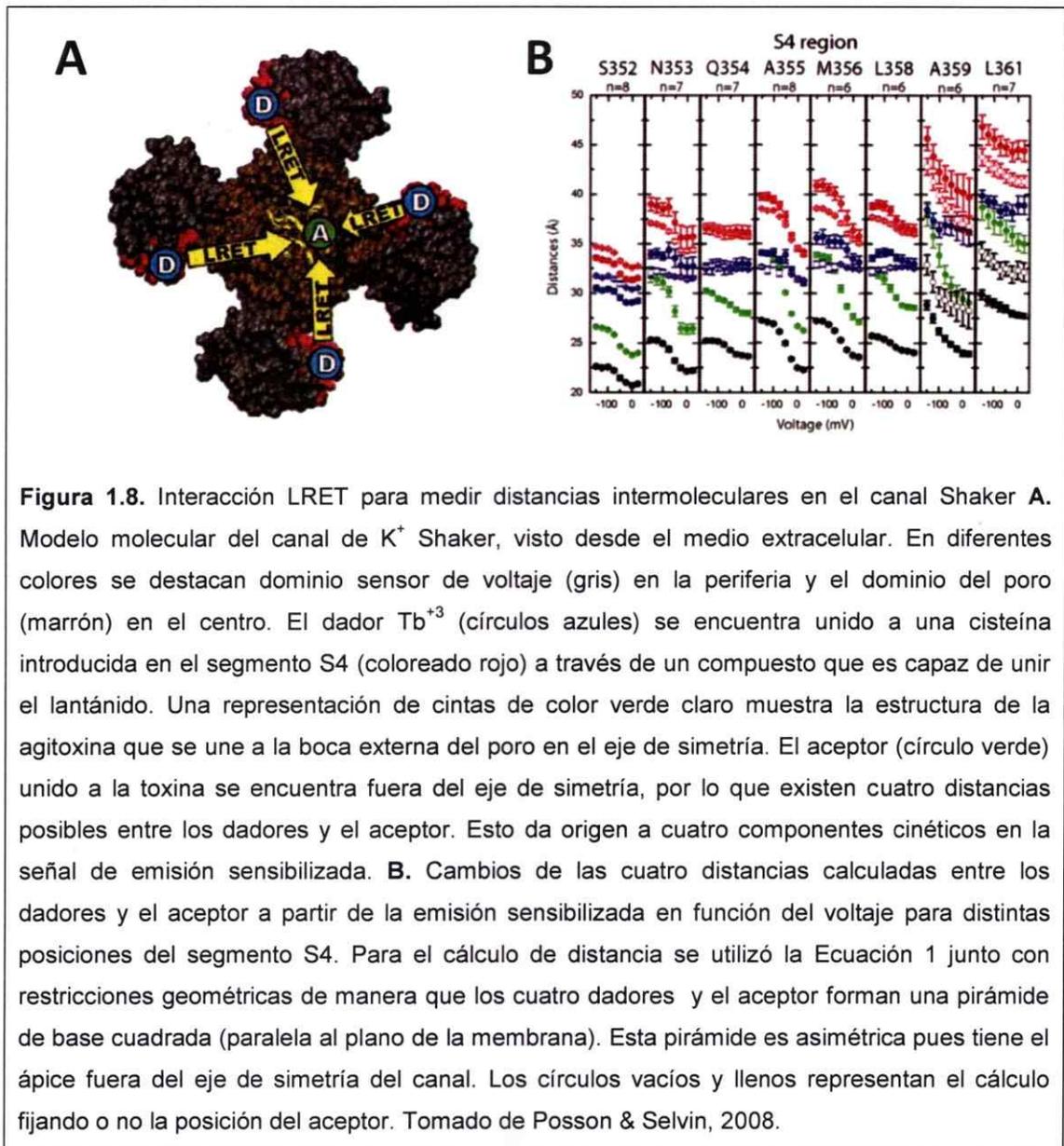
Los estados excitados de los lantánidos tienen un tiempo de vida del orden de milisegundos, varios órdenes de magnitud mayores que los fluoróforos orgánicos convencionales que tienen tiempos de vida de nanosegundos. Si el aceptor es un fluoróforo convencional, una vez que éste ha sido excitado por LRET, eventualmente volverá a su estado basal emitiendo un fotón. Este tipo de emisión se llama *emisión sensibilizada del aceptor*. Como se ha mencionado el tiempo de vida del aceptor excitado es extremadamente corto y se puede considerar que cada vez que ocurre una transferencia desde el dador, el aceptor inmediatamente emite un fotón. Es por esta razón que en el caso del LRET el curso temporal de la emisión sensibilizada es proporcional decaimiento del dador. Por lo tanto es posible calcular el tiempo de vida del dador en presencia del aceptor analizando el decaimiento de la señal de emisión sensibilizada. En la práctica esto se logra utilizando un filtro óptico adecuado que bloquea la fluorescencia del dador pero deja pasar la fluorescencia del aceptor. El cálculo de τ_{DA} a partir de la emisión sensibilizada tiene además dos ventajas importantes. La primera es que esta señal no tiene contaminación de la fluorescencia emitida por la población de dadores que no "ven" al aceptor. La segunda ventaja es que la amplitud de la señal es proporcional a la magnitud de k_T (Heyduk & Heyduk, 2001):

$$F_{SE}(t) = NQ_A k_T e^{-(k_T + k_D)t} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde $F_{SE}(t)$ es la amplitud señal de emisión sensibilizada en función del tiempo t , N es el número de dadores y Q_A es el rendimiento cuántico del aceptor. Por lo tanto para distancias más cortas la señal de emisión sensibilizada tiene mayor amplitud y decae más rápido. Esto es de mucha utilidad cuando hay más de una distancia entre dadores

y aceptor (Figura 1.8), pues de esta manera el rápido decaimiento del dador que se encuentra más cercano no queda enmascarado por el decaimiento más lento correspondiente al dador más alejado del aceptor (Heyduk & Heyduk, 2001). La relación entre la amplitud de la señal y la constante de tiempo permite además reducir el número de parámetros libres al ajustar este tipo de decaimientos de emisión sensibilizada para obtener los tiempo de vida del dador en presencia del aceptor (Heyduk & Heyduk, 2001; Posson & Selvin, 2008; Hyde et al 2012).

Dado que el espectro de emisión de los lantánidos tiene forma de picos agudos separados por regiones donde virtualmente no hay emisión (Figura 1.7) es relativamente fácil separar la emisión sensibilizada utilizando un filtro óptico adecuado (Selvin, 2002). Las características mencionadas anteriormente hacen del LRET una excelente herramienta para medir distancias intermoleculares. Esta técnica también se ha utilizado exitosamente en el canal Shaker para evaluar los movimientos que sufre el segmento S4 (Cha et al. 1999; Posson et al. 2005; Posson & Selvin 2008, Hyde et al. 2012). En estos casos se utilizó Tb^{+3} como dador utilizando compuestos que unen el lantánido que a su vez estaban unidos a cisteínas introducidas en el sensor de voltaje y como aceptor un fluoróforo (Fluoresceína, BODIPY-FL o Atto465) unido a las mismas cisteínas introducidas en el sensor de voltaje o a una toxina que se une al poro del canal. De esta manera es posible medir respectivamente la distancia entre sensores de voltaje y la distancia entre el sensor de voltaje y la toxina que se encuentra en las cercanías del poro. La Figura 1.8 muestra con más detalle esta última aproximación (Posson & Selvin 2008).



Como los canales de K^+ son homotetrámeros, se puede suponer que en promedio los cuatro dadores se encuentran en los vértices de un cuadrado. En este caso particular el aceptor que se encuentra anclado a una toxina específica para canales de K^+ , la agitoxina (García et al. 1994).

Ya que el aceptor está fuera del eje de simetría del canal (Figura 1.8), existen cuatro diferentes poblaciones de dadores, donde cada una de estas poblaciones está a una distancia diferente del aceptor. Asimismo cada población tiene asociada un valor distinto de k_T (Ecuación 1). Las cuatro poblaciones de dadores generan entonces cuatro componentes cinéticos distinguibles en la señal de emisión sensibilizada (ver Ecuación 4). De esta manera es posible resolver no solo la distancia respecto al eje de simetría sino que también el ángulo relativo a la posición del aceptor desde el centro de simetría lo que suma otra potencial ventaja a esta técnica (Posson et al. 2005; Posson & Selvin 2008; Hyde et al 2012).

Otra ventaja técnica del LRET es la posibilidad de introducir motivos estructurales de unión a lantánidos (LBT, del inglés *Lanthanide Binding Tag*) que unen Tb^{+3} con alta afinidad y que corresponden a secuencias peptídicas que pueden ser introducidas en la cadena de la proteína objetivo (MacNaus et al. 1990; Franz et al. 2003; Nitz et al. 2003; Nitz et al, 2004; Sculimbrene & Imperiali, 2006; Sandtner et al. 2007, Hyde et al. 2012). Esto evita la necesidad utilizar compuestos que se unen a cisteínas introducidas por mutaciones puntuales y por lo tanto el marcaje incompleto e inespecífico del dador (Figura 1.9).

Por otro lado ciertos metales de transición (p. ej Ni^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2}) pueden actuar como aceptores para el dador Tb^{+3} (Ka Luk, 1971; Horrocks et al. 1975; Khan et al. 1978). Este tipo de aceptores no dan emisión sensibilizada, por lo que el cálculo de τ_{DA} sólo puede obtenerse a partir de la señal de fluorescencia del dador en presencia del aceptor. El uso de metales de transición como aceptores del LRET ha sido utilizado para medir distancias intramoleculares en el sensor de voltaje del canal Shaker (Sandtner et al. 2007). Para esto se insertó la secuencia LBT en el segmento bucle extracelular que une los segmentos S3 y S4 de manera que el dador Tb^{+3} se una a este

sitio. Al mismo tiempo se introdujeron secuencias peptídicas que pueden unir metales de transición en otras posiciones del sensor voltaje, para medir la distancia entre la posición del Tb^{+3} y los sitios de unión a metales introducidos (Sandtner et al. 2007).

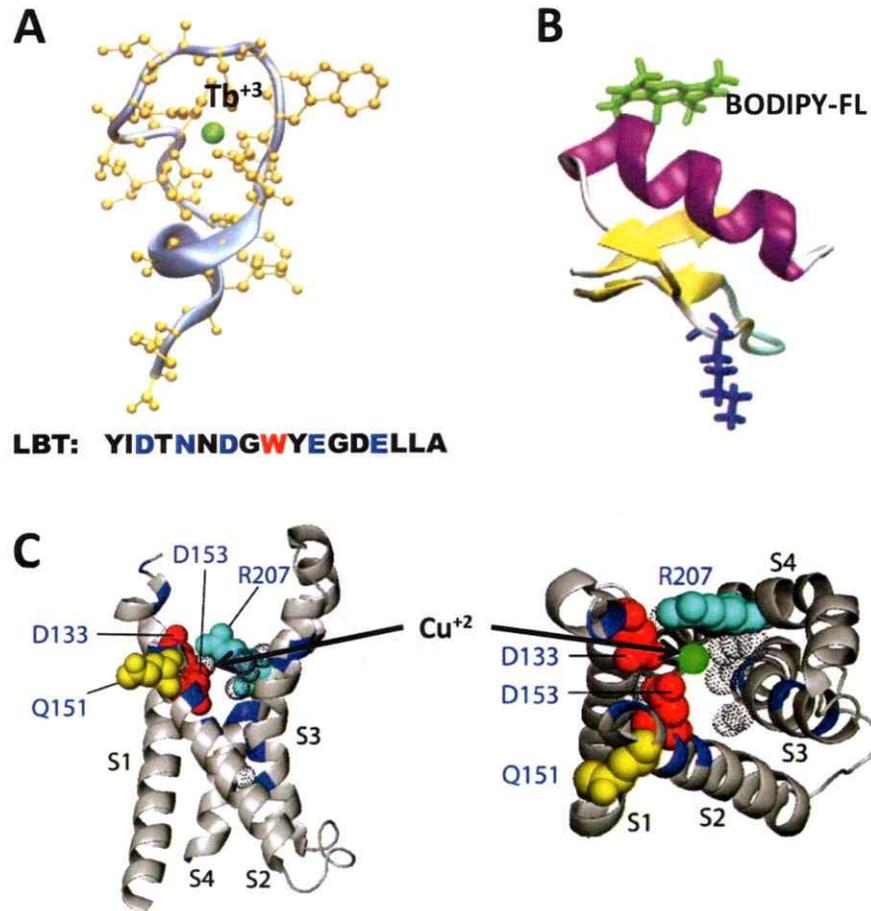


Figura 1.9. Dador y aceptores de LRET. **A.** El LBT (*Lanthanide Binding Tag*) une el lantánido Tb^{+3} (bola verde) con alta afinidad, protegiéndolo del apagamiento colisional con las moléculas de agua del solvente (Nitz et al. 2004). Se indica la secuencia peptídica en código de una letra. El residuo de triptófano actúa como antena para excitar al Tb^{+3} . **B.** Modelo molecular de la iberiotoxina marcada con el fluoróforo BODIPY-FL, el cual puede actuar como aceptor de LRET para el dador Tb^{+3} -LBT, con un R_0 de 43 Å. En azul se destaca la lisina 27 que se une al poro selectivo a K^+ en el BK. **C.** Representación molecular del sitio de unión a Cu^{+2} (bola verde) en el sensor de voltaje del canal BK descrito en Ma et al. (2008). Este metal de transición puede interactuar con el Tb^{+3} -LBT vía LRET con un R_0 de 20 Å. Tomado de Ma et al. 2008.

La ventaja que tiene usar estos metales de transición como aceptores de la transferencia usando el dador Tb^{+3} es que debido al bajo coeficiente de extinción de estos metales, el valor de R_0 es de entre 10 y 20 Å. Esto permite resolver distancias más pequeñas que con aceptores orgánicos que tienen valores más grandes de R_0 (p ej: Tb^{+3} -LBT/BODIPY-FL, 43 Å; Tb^{+3} -LBT/MTSR, 55 Å; comparar con Posson et al. 2005; Posson & Selvin, 2008).

Todo lo expuesto hasta este punto indica que el LRET es una herramienta que tiene gran potencial para explorar la estructura del canal BK la cual se desconoce en su detalle. Las aproximaciones experimentales para utilizar LRET como una regla espectroscópica son aplicables al canal BK ya que se sabemos que se puede utilizar la secuencia LBT para unir el dador Tb^{+3} a la proteína (Sandtner et al. 2007) y además es posible utilizar como aceptores tanto fluoróforos conjugados a toxinas de muy alta afinidad como iberiotoxina (Candia et al. 1992), así como el ion Cu^{+2} , ya que se ha reportado un sitio de unión a este metal de transición en el sensor de voltaje del BK (Ma et al. 2008) (Figura 1.9).

Este tipo de aproximación experimental puede potencialmente dar las primeras luces acerca de la disposición estructural que este canal tiene y de las diferencias y similitudes que compartiría con los miembros más representativos de los canales de K^+ activados por voltaje. Además, se hace especialmente interesante estudiar con esta técnica el sensor de voltaje y los cambios de conformación que ocurren al ser activado por potencial eléctrico o los re-arreglos que inducen la co-expresión con la subunidad beta1 para poder proponer un modelo estructural que dé cuenta de las modificaciones en la arquitectura del canal BK.

Hipótesis de trabajo y objetivos

Hipótesis

“Las características funcionales del canal BK tienen un correlato estructural, es decir cada estado funcional del canal tiene asociada una arquitectura característica. Estos cambios en la arquitectura del canal frente a las distintas perturbaciones del medio pueden ser detectados experimentalmente con un sistema de detección adecuado”.

Objetivos

El objetivo general de este proyecto es construir un modelo estructural del canal BK y resolver los cambios estructurales que sufre cuando el canal visita distintos estados de conformación del sensor de voltaje. Para esto propongo utilizar la técnica de LRET como una regla espectroscópica, dado su poder de resolución en una preparación *in vivo*. Con esta técnica se pueden medir las distancias intra-moleculares que existen entre distintos puntos del sensor de voltaje del canal BK, utilizando para ello sondas fluorescentes que marcan distintos puntos del canal y que son capaces de interactuar vía LRET.

Las distancias serán medidas en distintos estados conformacionales del sensor de voltaje del BK, perturbándolo con pulsos de voltaje despolarizante y con la co-expresión de la subunidad accesoria beta1. Las distancias medidas serán utilizadas como una restricción espacial para generar un modelo de la arquitectura del canal BK.

Objetivos específicos:

1. Construir una estación experimental de LRET acoplado a TEVC (*voltage clamp* de dos microelectrodos) para ovocitos de *Xenopus laevis* en el laboratorio del Dr. Ramón Latorre. Como no existe ningún equipo similar Chile, es necesario aprender los detalles técnicos tanto de construcción como de ejecución incluyendo el *hardware* y *software* necesario para llevar a cabo esta tarea.

2. Generar construcciones del canal BK con motivos de unión a Tb^{+3} , LBT, en distintas posiciones del sensor de voltaje. Expresar los canales en ovocitos de *Xenopus laevis*. Comprobar que dichas construcciones mantienen las propiedades electrofisiológicas del canal BK. Comprobar que el LBT se pliega correctamente y es capaz de unir Tb^{+3} , midiendo el decaimiento temporal de la fluorescencia en ausencia de cualquier aceptor.

3.1. Agregar $CuCl_2$ a la bañera de manera que el Cu^{+2} se una a su sitio en el sensor de voltaje (descrito en Ma et al. 2008). Este ion actuará como aceptor de LRET para el dador Tb^{+3} -LBT con un R_0 de 20 Å. Comprobar interacción de LRET observando la aceleración del decaimiento del dador.

3.2. Construir el conjugado de la iberiotoxina, que se une específicamente al poro del BK, con el fluoróforo BODIPY-FL que actuará como aceptor de LRET y que tiene un R_0 de 43 Å con el dador LBT- Tb^{+3} , adecuado para calcular distancias de entre 30 y 50 Å. Comprobar que se observa LRET midiendo la emisión sensibilizada del aceptor.

4. Observar cambios en la eficiencia de la interacción LRET al perturbar la estructura del canal. Esto será realizado cambiando el voltaje de membrana, controlándolo con la técnica de TEVC y también co-expresando las construcciones del canal BK-LBT con la subunidad accesoria beta1.

5. Construir un modelo geométrico que dé cuenta de los decaimientos de emisión sensibilizada del BODIPY-FL, utilizando la metodología descrita en Hyde et al. (2012) para el análisis de emisión sensibilizada. Los resultados de LRET usando Cu^{+2} como aceptor son utilizados como una restricción en el modelo geométrico. Describir los cambios de conformación del sensor voltaje de acuerdo a los mapas espaciales obtenidos.

6. Construir un modelo molecular del canal BK utilizando dinámica molecular. Las distancias intermoleculares obtenidas experimentalmente son utilizadas como restricciones en esta simulación.

2. Materiales y métodos

Generación de construcciones BK-LBT y expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Todos los experimentos fueron realizados utilizando el vector BK-c que contiene la secuencia del gen hSLO obtenida de miometrio humano. La secuencia original fue clonada y donada por la Dra. Ligia Toro (University of California Los Angeles), nº de acceso en Gene Bank U11058. El primer aminoácido de la secuencia corresponde a la metionina 10 de la secuencia peptídica de la subunidad alfa del canal BK y que tiene las 3 cisteínas del lado extracelular mutadas por serinas (C14S, C142S y C277S). Se insertó la secuencia LBT (YIDTNDGWYEGDELLA) en la secuencia de BK-c entre los residuos D15-S16, W22-W23, S134-S135 ó D147-F148 para dar origen a las construcciones BKNTLBT, BKS0LBT, BKS1LBT y BKS2LBT (Figura 2.1).

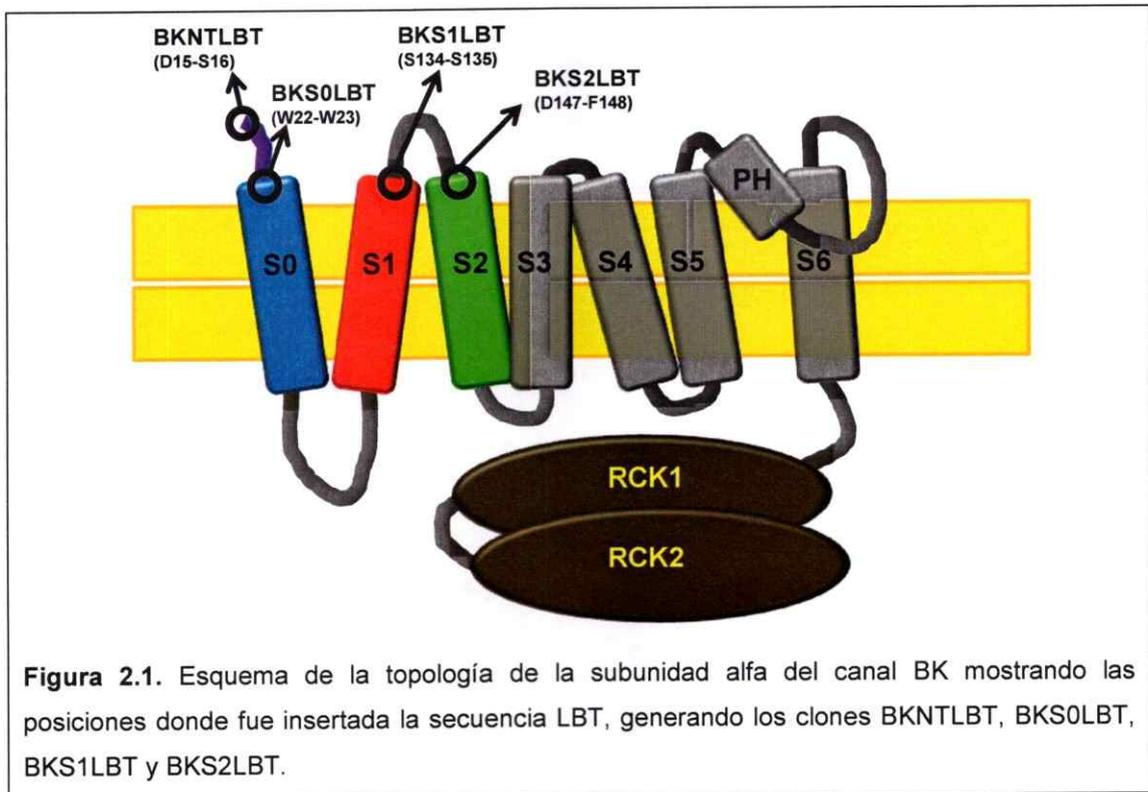


Figura 2.1. Esquema de la topología de la subunidad alfa del canal BK mostrando las posiciones donde fue insertada la secuencia LBT, generando los clones BKNTLBT, BKS0LBT, BKS1LBT y BKS2LBT.

La inserción de la secuencia LBT se llevó a cabo en dos pasos secuenciales de PCR. En la reacción primaria se utilizaron partidores diseñados *ad-hoc* que cuentan con una secuencia de 21 pb complementaria a los extremos de la secuencia LBT en la parte 3' del partidor, y otra parte de 24 pb complementaria a las secuencias que flanquean la posición donde se insertará el motivo LBT en la secuencia del plasmidio BK-c (Figura 2.2). Las secuencias de los pares de partidores diseñados para la inserción de la secuencia LBT se indican más abajo y fueron sintetizados a pedido (Integrated DNA Technologies, USA):

Posición D15-S16 (BKNTLBT)

BKNTLBTfw

5' GCCACCATGGAGGTACCGTCCGACTATTGGGATACCAACAACGAT 3'

BKNTLBTrev

5' CCACCACATTCGTTGGCCCCGGCTCGCCAGCAGTTCATCGCCTTC 3'

Posición W22-W23 (BKS0LBT)

BKS0LBTfw

5' GACAGCCGGGGCCAACGAATGTGGTATTGGGATACCAACAACGAT 3'

BKS0LBTrev

5' CATGCTGCTAGCCAGGAAAGCCCA CGCCAGCAGTTCATCGCCTTC 3'

Posición S134-S135 (BKS1LBT)

BKS1LBTfw

5' CTTGTAATACTTCATAGATTCA TATTGGGATACCAACAACGAT 3'

BKS1LBTrev

5' CTGGGAGGATTCTATTGGGTTTGA CGCCAGCAGTTCATCGCCTTC 3'

Posición D147-F148 (BKS2LBT)

BKS2LBTfw

5' TCCTCCCAGAATTTCTACAAAGATTATTGGGATACCAACAACGAT 3'

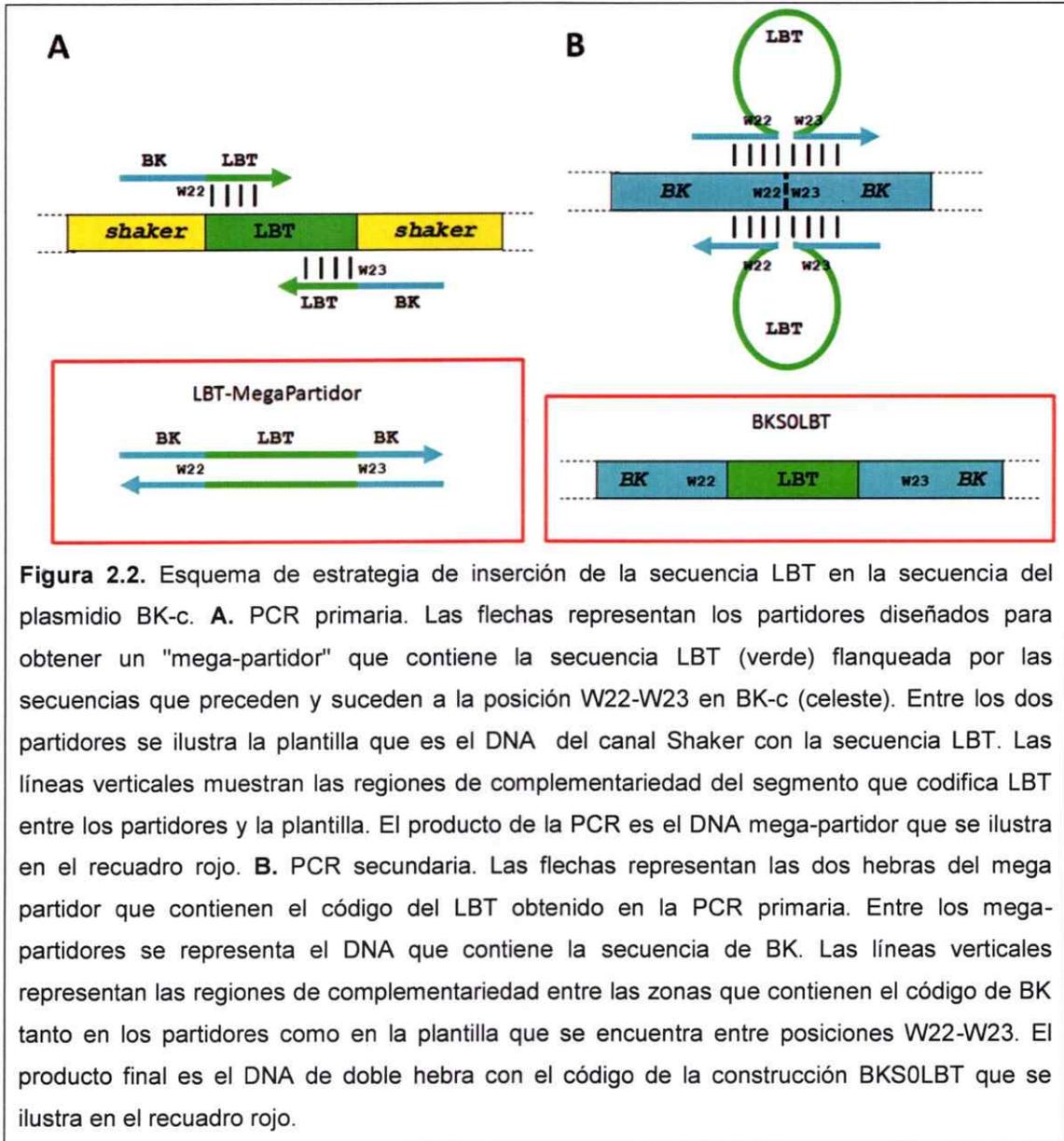
BKS2LBTrev

5' AGCCATGTCGATCTGTAATGTGAA CGCCAGCAGTTCATCGCCTTC 3'

Donde la secuencia en azul corresponde a la parte complementaria al BK-c 24 pb rio arriba (PARTIDORfw) y 24 pb rio abajo (PARTIDORrev) de la posición de inserción. Las secuencias en verde subrayadas corresponden a la región complementaria a la secuencia LBT (Figura 2.2). El DNA plasmidial que se utilizó como plantilla en la primera reacción de PCR contiene la secuencia del canal Shaker con la secuencia que codifica el LBT. Este clon Shaker-LBT fue donado amablemente por el Dr. Francisco Bezanilla.

La reacción primaria fue realizada utilizando la enzima pfu II (Invitrogen, USA) utilizando las indicaciones del fabricante. Esta PCR genera como producto una secuencia de DNA doble hebra de ~100 pb que contienen la secuencia LBT completa, flanqueada por secuencias complementarias a la secuencia del BK donde se insertará el LBT (Figura 2.2A, recuadro rojo). Estas dos hebras complementarias son llamadas *mega-partidores*. La segunda PCR utiliza los mega-partidores producto de la primera PCR para insertar la secuencia LBT en el canal BK siguiendo el protocolo rutinario del kit de mutagénesis Quick Change II (Agilent Technologies, USA) usando las instrucciones del fabricante. La Figura 2.2B muestra esquemáticamente la estrategia de inserción de la secuencia LBT entre las posiciones W22-W23 (BKS0LBT). La anterior estrategia fue utilizada para generar las cuatro construcciones BK-LBT. Todas

las inserciones LBT en la secuencia del BK fueron confirmadas por secuenciación a pedido en un secuenciador de electroforesis capilar (Macrogen, Korea del sur).



Para la expresión de la subunidad beta 1, se utilizó otro vector basado en el plasmidio pGEM con la secuencia que corresponde a la subunidad beta 1 clonada a partir de músculo liso de la tráquea bovina (nº de acceso en Gene Bank U25138). Esta

secuencia fue originalmente clonada y donada por al Dra Ligia Toro (University of California Los Angeles).

Para la expresión de las proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis*, se obtuvo el cRNA de cada construcción BK-LBT y de la subunidad beta1, a partir de los DNA plasmidiales correspondientes. Para tal efecto, el DNA plasmidial fue linearizado con la enzima NotI (Fermentas) y posteriormente sometido a una reacción de transcripción *in vitro* con la enzima RNA polimerasa T7 (kit mMessege Machine, Ambion). La reacción fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La preparación de cRNA mensajero fue diluida en agua hasta una concentración de 1 µg/µl, medida con un espectrofotómetro UV 1700 (Shimadzu Corp. Japón) registrando la absorbancia a 280 nm, separada en porciones de 2 µl y guardadas a -80°C en un congelador hasta el momento que fueron utilizadas. Para la co-expresión de BK con la subunidad beta 1, se utilizó una mezcla de cRNA de la construcción BK-LBT correspondiente y de cRNA de la subunidad beta 1 con una concentración de 0.5 µg/µl para cada cRNA (razón molar ~1:5 entre alfa y beta1). Para micro-inyección de cRNA en los ovocitos se usó un micro-inyector Nanoliter 2000 (World Precision Instruments). Se inyectó 50 nl de cRNA para cada ovocito. La síntesis de las proteínas alcanza un nivel adecuado para hacer los experimentos electrofisiológicos y de fluorescencia después de 3 a 5 días durante los cuales los ovocitos inyectados se mantuvieron en solución ND96 (NaCl 96mM, KCl 2mM, CaCl 1.8 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 5 mM pH 7.6) a 20°C.

Electrofisiología

Para la caracterización funcional de los canales BK-LBT se utilizó la técnica de *patch clamp* en la configuración *inside out* (Hamill et al. 1981). La solución "0 Ca⁺²" utilizada para llenar la pipeta de *patch* fue la misma que la que se usó en la cámara de registro y contenía: K⁺-MES 110 mM, EGTA 5 mM, KCl 2 mM, HEPES 10 mM pH 7.4. Las pipetas de *patch* se prepararon a partir de capilares de vidrio de 1.65 mm de diámetro externo y 1.2 mm de diámetro interno (A-M Systems Inc. USA), estirados en un equipo estirador de pipetas P-97 (Sutter Instruments, USA). Las pipetas luego fueron pulidas en una microforja MF-830 (Narishige, Japon) de manera que la punta tuviese un diámetro de entre 10 y 15 μm , con una resistencia entre 300 y 500 k Ω . El equipo electrónico del *patch clamp* fue un Axopatch 200B (Axon Instruments), en modo *Voltage Clamp*. La temperatura de la pieza fue controlada a 20°C para todos los experimentos. La transformación de las señales análogas en números digitales fue realizada por una tarjeta PCI 6052E (National Instruments, USA), conectada a una interfaz BNC 2110 (National Instruments, USA). Las señales análogas fueron filtradas antes de digitalizarlas usando un filtro Bessel pasa bajos de 8 polos 900C/9L8L (Frequency Devices, USA) con una atenuación de -3dB a 20 kHz. La frecuencia de adquisición fue de 50 kHz. Para generar los comandos de voltaje y registrar las corrientes obtenidas se utilizó un computador con estructura IBM PC cargado con el software de adquisición BasicPatch desarrollado por el Dr. Patricio Orio (Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso) basado en la plataforma LABVIEW para el sistema operativo Windows XP (Microsoft, USA). Los giga sellos (>1G Ω) de membranas en configuración *inside out* fueron sometidos a trenes de pulsos de voltaje entre -50 mV y 250 mV con incrementos de 10 mV, de 50 ms de duración,

manteniendo -50 mV entre pulsos. Debido a la baja resistencia de las pipetas no se utilizó compensación de la resistencia en serie. Se caracterizó la corriente llevada por los canales BK-LBT construyendo la curva de conductancia en función del voltaje (G vs V) a partir de la intensidad de la corriente medida 100 μ s después del final de cada pulso. De esta manera se obtienen los parámetros de voltaje medio de activación y de carga asociada con la apertura, en condición de equilibrio para cada pulso.

Para los experimentos de LRET se controló el voltaje de todo el ovocito usando un equipo de *voltage clamp* CA1 (Dagan corp.) en modo de dos micro-electrodos. La solución externa contenía NMG-MES 120 mM, HEPES 10 mM, Ca(Mes)₂ 2 mM, Tb(Cl)₃ 10 μ M, pH 7.4, para mantener las condiciones experimentales utilizadas anteriormente en experimentos de LRET (Sandtner et al. 2007, Hyde et al. 2012). Los micro-electrodos fueron hechos a partir de los mismo capilares de vidrio utilizados para el *patch clamp* con puntas menores que 2 μ m de diámetro y llenos con NaCl 3M, que registran una resistencia de entre 200 y 500 k Ω .

Para los experimentos de emisión sensibilizada se agregaron hasta 3.5 μ l de un concentrado de Iberiotoxina conjugada con el fluoróforo BODIPY-FL (Invitrogen), de manera que la concentración final fuese de entre 200 y 600 nM en la cámara de registro. El volumen final de solución en la cámara fue de 120 μ l. La Iberiotoxina con la mutación D20C y el fluoróforo BODIPY-FL unido a la cisteína 20 (en adelante IBTX-BODIPY) fue sintetizada en fase sólida por el Dr. Stephen Kent de la Universidad de Chicago, quien la donó gentilmente para realizar esta tesis. La cámara de registro se lavó previamente con una solución de BSA 0.1% P/V para evitar que la toxina se pegue a sus paredes de plástico. El concentrado de IBTX-BODIPY se encuentra a una concentración aproximada de 20 μ M. Esta concentración fue medida en un

espectrofotómetro UV 1700 (Shimadzu Corp. Japón) midiendo la absorbancia a 505 nm que corresponde al máximo de absorción del BODIPY-FL, con un coeficiente de extinción molar de $80000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. La toxina marcada fue agregada después de confirmar la presencia de una señal robusta de fluorescencia del dador y se utilizó el *voltage clamp* para monitorear el bloqueo de la corriente *in situ*. Para los experimentos con Cu^{+2} como aceptor se agregó CuCl_2 en concentraciones crecientes entre $50 \mu\text{M}$ y $500 \mu\text{M}$. Los registros de fluorescencia fueron registrados desde 4 ms antes de cada pulso del láser y durante 40 ms tanto para los experimentos de dador solo como para el dador en presencia del aceptor. El voltaje fue controlado a -80 mV o 200 mV durante la adquisición de la fluorescencia, estableciendo el voltaje 50 ms antes del inicio de la adquisición para asegurar la condición de estado estacionario.

Descripción de la estación de LRET-TEV

Se construyó una estación de LRET en el laboratorio del Dr. Ramón Latorre usando el diseño utilizado en el laboratorio del Dr. Francisco Bezanilla de la Universidad de Chicago (Figura 2.3) (Sandtner et al. 2007). La estación de trabajo LRET está construida alrededor de un microscopio invertido IX50 Olympus (Olympus, Allentown, Pennsylvania, USA). Para excitar la muestra se utiliza un láser Minilite II de estado sólido Nd:YAG (del inglés *neodymium-doped yttrium aluminum garnet*; $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) que emite impulsos de luz de 266 nm de longitud de onda y una duración de 5 ns (Continuum, Santa Clara, California, USA)(Figura 2.3). El rayo pasa primero por un filtro UG11 y un prisma de Pellin-Broca fabricado de sílice fundido (Thorlabs Inc. Newton, New Jersey, USA) para bloquear los armónicos de 532 nm y 1064 nm provenientes del láser.

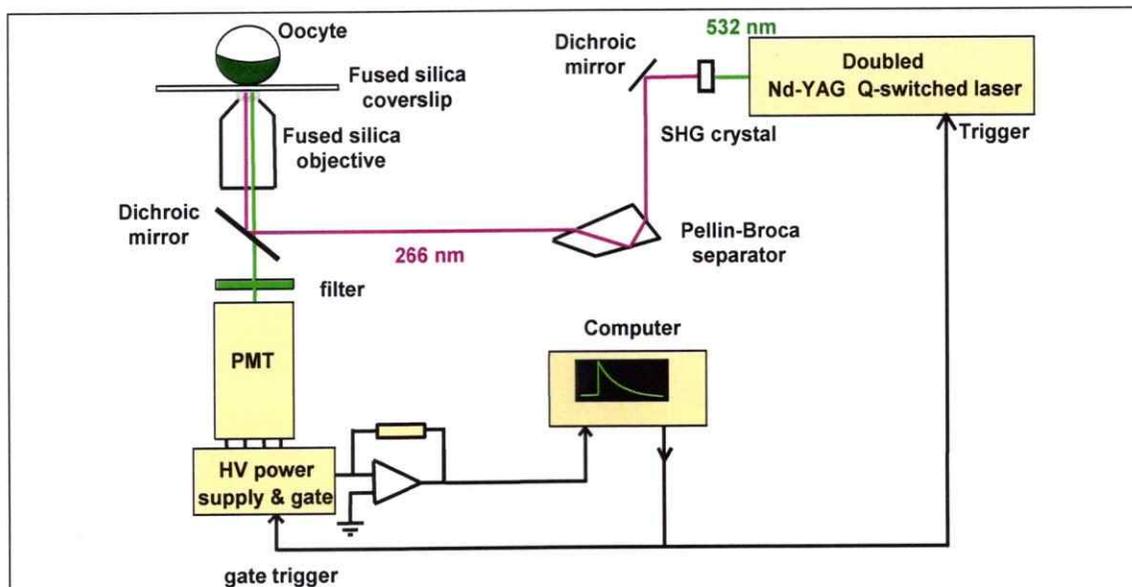
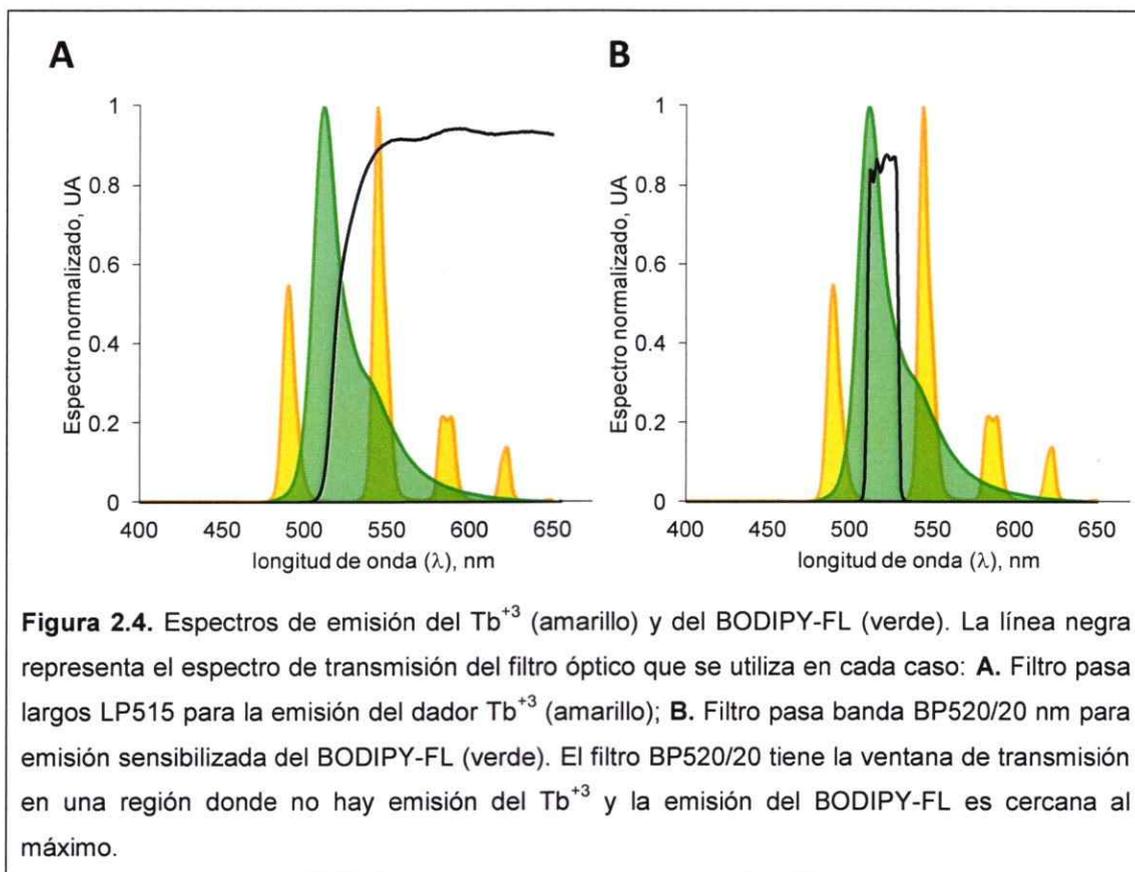


Figura 2.3. Esquema de la estación de trabajo de LRET. Se detalla el camino óptico desde el láser hasta la muestra, desde ésta hasta el fotomultiplicador (PMT) y finalmente la etapa de digitalización. Tomado de Sandtner et al. 2007.

El rayo UV se dirige hacia la entrada del microscopio a través de un periscopio que tiene dos espejos dicróicos de aluminio UV-reflectantes (Thorlabs, USA). Para dirigir el rayo hacia la muestra se utilizan cubos que tienen espejos dicróicos que reflejan los 266 nm pero que son transparentes a la luz visible y que fueron hechos a pedido (Chorma Technology, USA). Para colectar la señal del dador Tb^{+3} -LBT se utiliza un cubo con un filtro óptico que deja pasar longitudes de onda mayores que 515 nm, LP515 (Figura 2.4). Para colectar solo la señal de emisión sensibilizada del aceptor, que corresponde a la fluorescencia del BODIPY, se usa un cubo con un filtro óptico pasa banda de 20 nm de ventana centrado en 520 nm, BP520/20 (Figura 2.4).



El microscopio está equipado con un lente de inmersión en glicerol cuya óptica es completamente de cuarzo (Partec, Alemania) para poder excitar la muestra a 266 nm. La cámara de registro donde descansan los ovocitos está hecha de una placa de petri plástica al fondo de la cual se le ha hecho una ventana transparente a la luz UV hecha con cubreobjetos de sílice fundida (Esco Optics Inc. Oak Ridge, New Jersey, USA). El volumen de la cámara es de aproximadamente 120 μ l. La detección de la fluorescencia la hace un tubo fotomultiplicador H10304 (Hamamatsu, Japón) controlado por el sistema de adquisición para que se mantenga apagado durante los primeros 20 μ s del pulso láser para evitar dañar el fotocátodo. La salida del tubo fotomultiplicador está conectada a un conversor corriente/voltaje de una sensibilidad de 100mV/ μ A y

constante de tiempo de 1 μ s. (Lazo de realimentación negativa compuesto por una resistencia de 100 k Ω en paralelo con un condensador de 10 pF). Este convertor corriente voltaje fue construido manualmente por el autor de esta tesis utilizando un amplificador operacional OPA627 (Texas Instruments, USA). La salida del convertor está conectada a un filtro Bessel de 8 polos con una frecuencia de -3 dB a 50 kHz (Frequency Devices, USA). Las señales de corriente y fluorescencia son digitalizadas con un convertor análogo/digital de 16 bit SBC6711 (Innovative Integration, Inc. Indianapolis, Indiana, USA) con una frecuencia de muestreo de 500 kHz. El programa utilizado para la adquisición (Gpatch M) fue desarrollado y entregado generosamente por el Dr. Francisco Bezanilla.

Protocolo experimental de LRET

Los ovocitos que han expresado los clones BK-LBT son colocados en la cámara de registro con la solución externa que contiene 10 μ M TbCl₃. Para mejorar la captura de la señal de fluorescencia es posible enfocar la membrana del ovocito mirando a través del ocular. Una vez enfocada la membrana del ovocito, se da un protocolo de 16 pulsos del láser, cada 100 ms. La potencia del láser debe ser ajustada de manera de obtener una señal de fluorescencia de dos tercios del rango dinámico del sistema de adquisición, pero debe ser regulada para no dañar la membrana del ovocito. Los 16 trazos de intensidad de la fluorescencia en función del tiempo resultantes son promediados para mejorar la relación señal/ruido. La señal de fluorescencia es evaluada en el mismo momento para proceder con la adición del aceptor (IBTX-BODIPY o CuCl₂). Para seleccionar los ovocitos aptos es necesario observar una relación de amplitudes mínima de 1:1 entre los componentes medio (~800 μ s) y lento (~2.5 ms) de la señal de fluorescencia (Figura 2.5). La selección se puede hacer

rápidamente utilizando el programa Analysis (UCLA) o por simple inspección del trazo para el ojo entrenado. Cuando se utiliza IBTX-BODIPY, se impala el ovocito con los dos micro-electrodos del *voltage clamp* para monitorear el curso temporal del bloqueo midiendo la disminución la corriente en respuesta a pulsos de voltaje de 0 a 100 mV de 50 ms de duración. El bloqueo tarda unos 5 a 10 minutos.

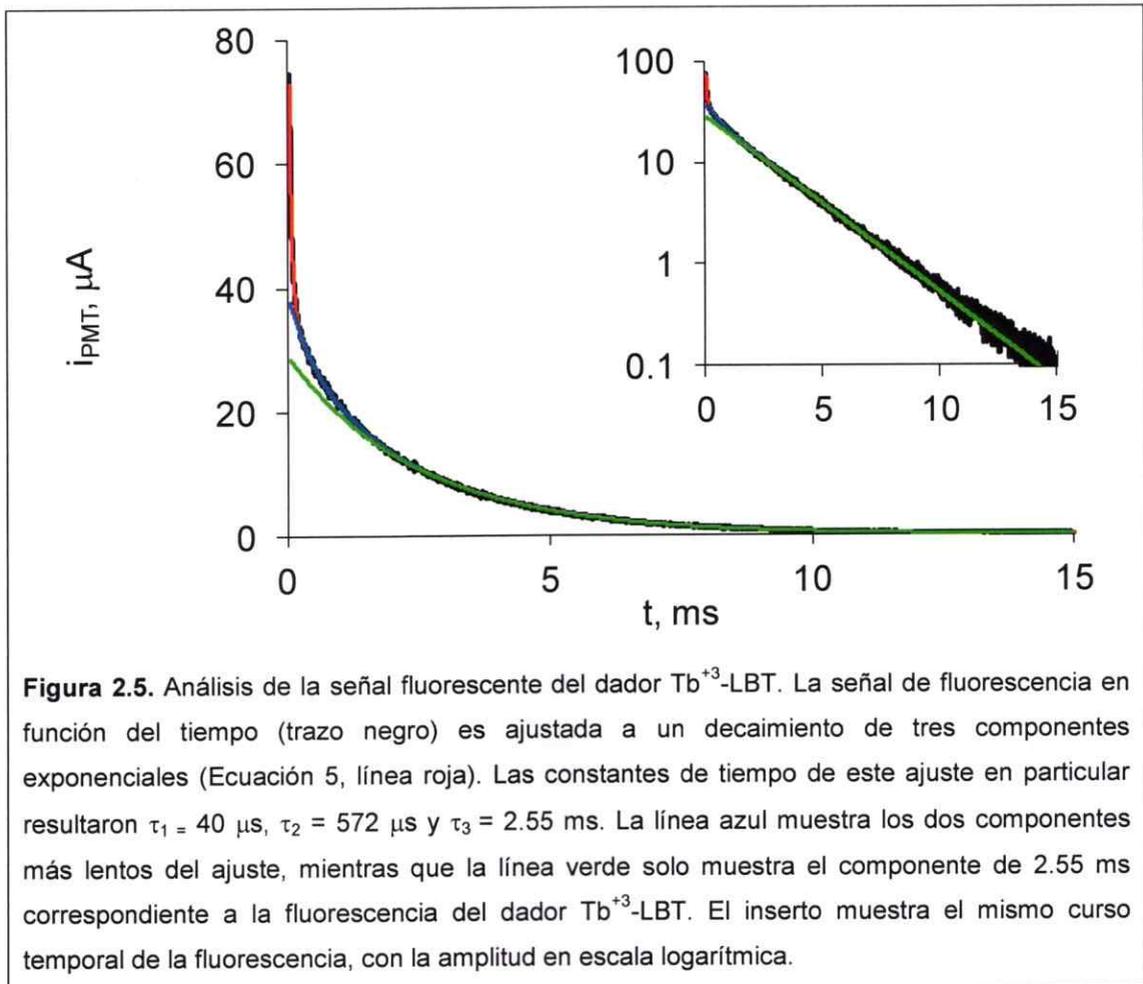
Análisis de la señal del dador solo

Para el análisis de la señal de emisión del dador solo se utilizó un programa desarrollado en la plataforma MATLAB (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Este programa sustrae la línea base y luego ajusta el trazo de fluorescencia a un decaimiento exponencial de 3 componentes (Ecuación 5) usando una minimización de la suma de cuadrados.

$$F(t) = A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + A_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Los dos componentes más rápidos del ajuste corresponden al artefacto producido por el láser y a la emisión del Tb^{+3} en solución y tienen constantes de tiempo de alrededor de 70 μs y 800 μs respectivamente (τ_1 y τ_2). El tercer componente es el más lento de todos y corresponde a la emisión del dador Tb^{+3} unido a la secuencia LBT (Tb^{+3} -LBT) (Figura 2.5). La emisión del Tb^{+3} -LBT es más lenta que la del Tb^{+3} en solución esencialmente porque en este último caso el agua provee de una vía de decaimiento no radiativa (Nitz et al. 2004). Como el conteo de fotones es un proceso que sigue una distribución de Poisson, es necesario normalizar cada diferencia cuadrática por el valor del ajuste antes de realizar la suma de cuadrados. De esta manera no se subestima la

constante de tiempo del decaimiento lento que tiene una menor amplitud. El valor de k_D , que es la constante de rapidez con que decae el dador en ausencia del aceptor, es obtenido como el valor recíproco de la constante de tiempo más lenta obtenida del ajuste a la Ecuación 5. El valor esperado para k_D es de 410 s^{-1} . ($\tau_D = 2.45 \text{ ms}$) (Nitz et al. 2004; Sandtner et al. 2007).



Es necesario obtener un valor de τ_D para cada construcción BK-LBT puesto que es posible que el plegamiento del motivo LBT sea ligeramente distinto en cada una (Nitz et al. 2004; Sandtner et al. 2007; Hyde et al. 2012).

Análisis de señales de fluorescencia usando Cu^{+2} como aceptor

Este análisis toma en cuenta consideraciones similares a las del análisis de la fluorescencia del dador solo. Para analizar los datos del decaimiento, se ajusta una curva determinada por la Ecuación 6:

$$F(t) = A_1 g(t) + A_D e^{-t/\tau_D} + A_{DA} e^{-t/\tau_{DA}} \quad \text{Ecuación 6}$$

El primer término corresponde al artefacto producido por el láser y a la fluorescencia del Tb^{+3} en solución, donde $g(t)$ es un decaimiento de cinética fija obtenido del análisis de muchos ovocitos sin inyectar ($n > 50$). El segundo término es el componente del dador en ausencia del aceptor, cuya constante de tiempo es τ_D calculada previamente y que fue la misma utilizada para el análisis de la emisión sensibilizada. El tercer término de la Ecuación es el componente del dador en presencia del aceptor donde τ_{DA} es el tiempo de vida del dador en presencia del aceptor ($\tau_{DA} = (k_D + k_T)^{-1}$). Esta constante cinética no cambia para las distintas concentraciones de CuCl_2 ya que se supone que la posición del Cu^{+2} no varía, sólo la probabilidad de encontrarse en su sitio. A_1 , A_D y A_{DA} corresponden a las amplitudes del artefacto, el componente del dador solo y el componente del dador en presencia del aceptor, respectivamente.

Cálculo de distancias

A partir de la constante de tiempo del dador solo (τ_D) y del de tiempo de vida del dador en presencia del aceptor (τ_{DA}) se calcula la distancia como (Selvin, 2002):

$$r = R_0 \left(\frac{\tau_{DA}}{\tau_D - \tau_{DA}} \right)^{\frac{1}{6}} \quad \text{Ecuación 7}$$

El cálculo de distancias se realizó utilizando la Ecuación 7 y los datos obtenidos (τ_{DA}) de los experimentos usando el aceptor Cu^{+2} , que está unido un sitio en el sensor de voltaje descrito en Ma et al. (2008). El valor de τ_D fue obtenido como se describe más arriba en esta sección. El valor de R_D utilizado fue de 20 Å (Sandtner et al. 2007). Como se detalla más adelante, las distancias calculadas se usaron como restricción física del modelo geométrico que se utilizó para analizar los datos de emisión sensibilizada.

Obtención de la nube de posiciones posibles del aceptor BODIPY-FL

El análisis de los registros de emisión sensibilizada utiliza una nube de puntos que representa las posiciones probables del aceptor con respecto a la estructura molecular de la toxina bloqueando el poro del canal BK. Para obtener la nube de puntos se realizó una búsqueda de las posiciones posibles con los 4 ángulos diedros que se forman entre el carbono alfa de la iberiotoxina y el fluoróforo BODIPY-FL (Figura 2.6), en el sistema molecular completo de la toxina unida al poro del canal BK. Dado que no existe una estructura cristalina para la IBTX-BODIPY ni para el canal BK fue necesaria la construcción de un modelo molecular por homología. Se utilizó como plantilla el modelo cristalográfico de la caribdotoxina, una toxina homóloga a la iberiotoxina (Miller et al. 1985; Garcia-Calvo et al. 1991) unida al poro del canal KcsA (código PDB: 2a9H). De esta manera el poro del BK fue alineado con la secuencia del poro de KcsA mientras que la IBTX-BODIPY fue alineada con la secuencia de la caribdotoxina. Para los dominios sensores de voltaje del BK se utilizó como plantilla la estructura del canal de K^+ dependiente de voltaje $\text{K}_v1.2/2.1$ (código PDB: 2R9R). El segmento S0 fue modelado como una alfa hélice continua utilizando la secuencia primaria del S0 en el gen hSlo y empleando la homología estructural con una alfa hélice del $\text{K}_v1.2/2.1$. Este

segmento fue insertado cerca de los segmentos S1 y S3 de acuerdo a resultados publicados de experimentos de *crosslinking* (Liu et al. 2008a).

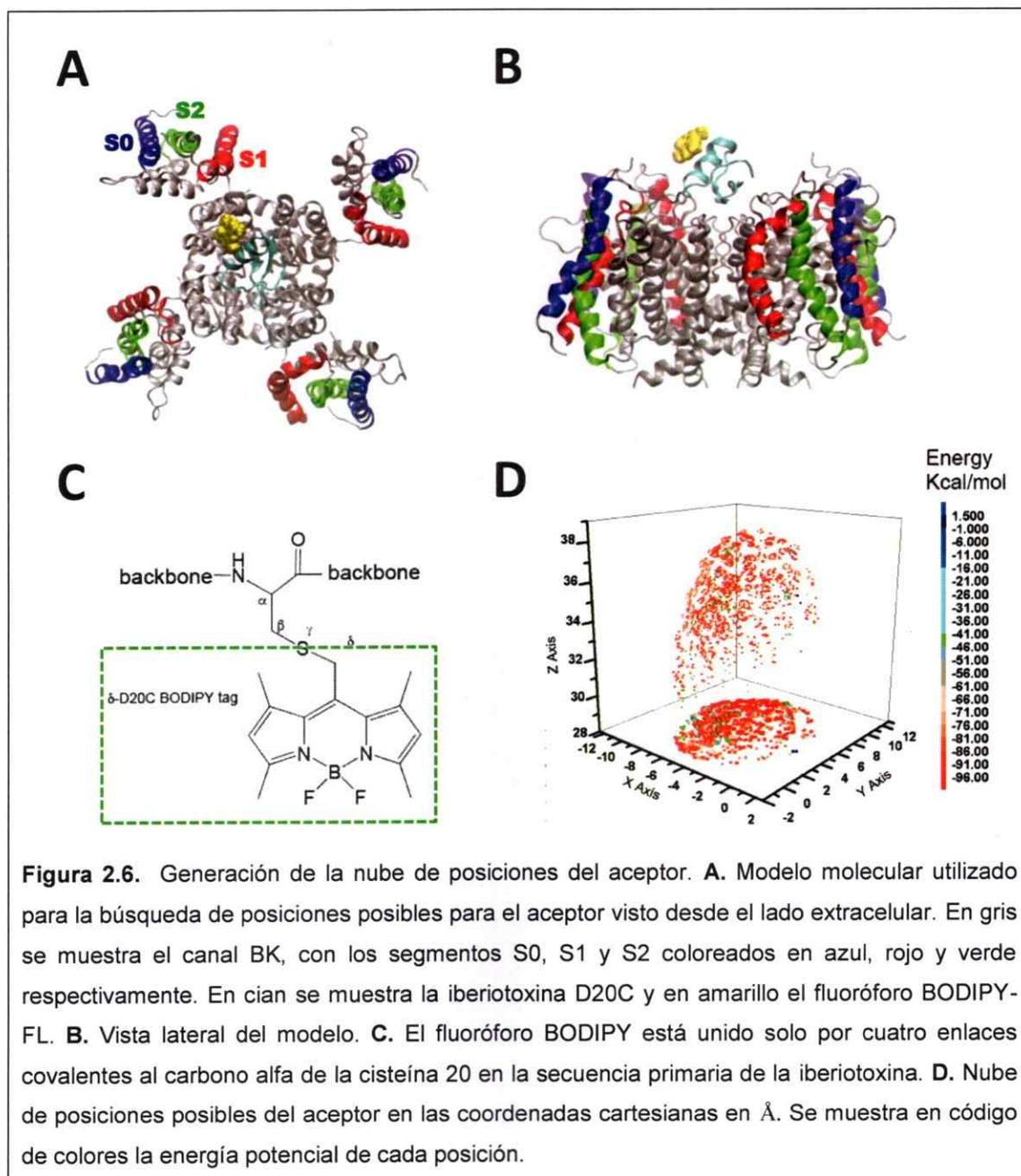


Figura 2.6. Generación de la nube de posiciones del aceptor. **A.** Modelo molecular utilizado para la búsqueda de posiciones posibles para el aceptor visto desde el lado extracelular. En gris se muestra el canal BK, con los segmentos S0, S1 y S2 coloreados en azul, rojo y verde respectivamente. En cian se muestra la iberiotoxina D20C y en amarillo el fluoróforo BODIPY-FL. **B.** Vista lateral del modelo. **C.** El fluoróforo BODIPY está unido solo por cuatro enlaces covalentes al carbono alfa de la cisteína 20 en la secuencia primaria de la iberiotoxina. **D.** Nube de posiciones posibles del aceptor en las coordenadas cartesianas en Å. Se muestra en código de colores la energía potencial de cada posición.

Para la molécula de BODIPY-FL unida covalentemente a la cisteína 20 de la iberiotoxina D20C, se utilizó como plantilla la estructura de la fosfatidilcolina-BODIPY

(Song et al. 2011). Los alineamientos fueron efectuados y evaluados con el programa ClustalW (Conway Institute, University College Dublin, Irlanda).

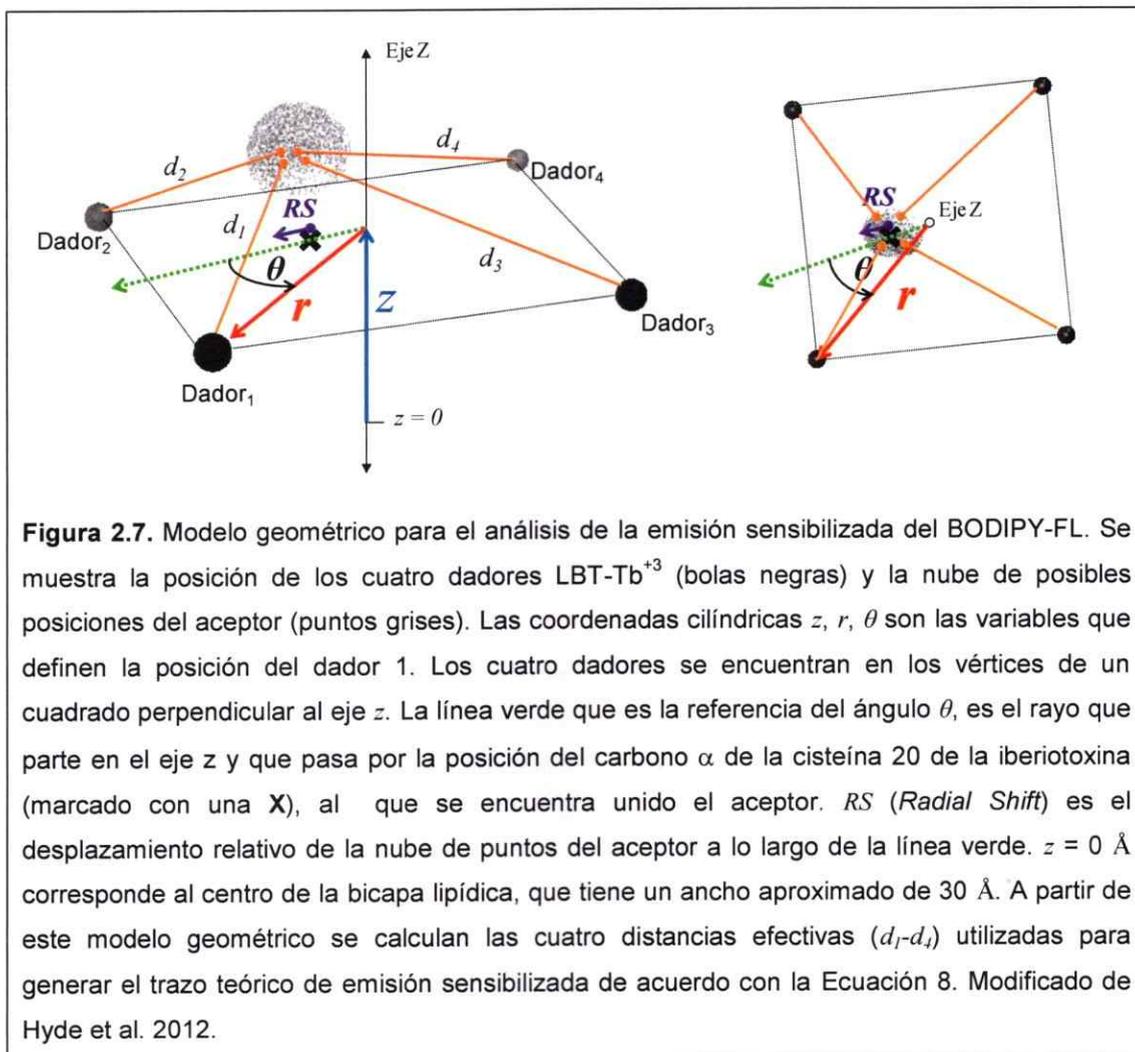
El modelo molecular completo se construyó utilizando el software MODELER v9 (Institute for Quantitative Biomedical Research, University of California San Francisco, USA). Este modelo fue insertado en una bicapa de lípidos hecha de POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) de 200 Å de ancho por 200 Å de largo y solvatado en una caja periódica de agua de 200 Å de ancho por 200 Å de largo, con 115 Å de altura, que contiene KCl 110 mM. En estas condiciones se realizó una simulación de dinámica molecular de 20 ns para relajar la estructura usando el programa NAMD v2.9 (Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois, USA).

Posteriormente cada uno de los 4 ángulos diedros (Figura 2.6) fue rotado 30° lo que da un total de 20736 posiciones, de las cuales fueron descartadas todas aquellas que generaran conflictos (distancias interatómicas de menos de 1.4 Å). También fueron descartadas todas las posiciones que dieran una energía potencial mayor que 10 kcal/mol, dando un total de 3290 puntos posibles para el centro de masa del aceptor (Figura 2.6). Todos los cálculos fueron realizados con la ayuda de los Drs. Danilo González y Daniel Aguayo (Centro de Bioinformática y Biología Integrativa, Universidad Andrés Bello).

Análisis de registros de emisión sensibilizada utilizando un modelo geométrico

Para el análisis de los registros de emisión sensibilizada obtenidos se usó un programa desarrollado en el laboratorio del Dr. Bezanilla por el Dr. H. Clark Hyde, utilizando la plataforma MATLAB (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). El programa calcula la posición de los cuatro dadores LBT-Tb⁺³ de la proteína respecto del aceptor a partir de

los datos de emisión sensibilizada, tomando ventaja de la arquitectura tetramérica del canal. Este modelo se construye suponiendo que en promedio los cuatro dadores se encuentran en los vértices de un cuadrado paralelo a la bicapa lipídica y el único aceptor se encuentra fuera del eje de simetría, dando origen a cuatro distancias diferentes entre los dadores y el aceptor (Figura 2.7).



Gracias a estas cuatro distancias es posible resolver las dimensiones del modelo geométrico piramidal que se genera: el tamaño de la base cuadrada, la altura de la pirámide, y finalmente el ángulo relativo en que están orientados los dadores y el

aceptor respecto al eje de simetría. Rigurosamente, este modelo geométrico no es una pirámide pues el ápice realmente es la nube de puntos probables en que puede estar el aceptor. El programa toma la nube de puntos del aceptor y las posiciones de los cuatro dadores y calcula la distancia efectiva entre cada dador y el aceptor. A partir de cada una de las cuatro distancias efectivas, se genera una señal teórica de emisión sensibilizada (Heyduk & Heyduk, 2001) de cuatro componentes, utilizando la Ecuación 4 para cada una de las distancias efectivas calculadas. De esta manera el curso temporal de la emisión sensibilizada correspondiente al modelo geométrico (Figura 2.7) está dado por:

$$F_{(t,z,r,\theta,RS)} = f \sum_{1,2,3,4} \bar{k}_{Ti(z,r,\theta,RS)} e^{-(\bar{k}_{Ti(z,r,\theta,RS)} + k_D)t} + Ae^{-t/\tau_{ns}}$$

Ecuación 8

Donde t es el tiempo, z define la altura a la que se encuentran los dadores y r la distancia radial de estos respecto del eje z . El plano que define $z = 0$ usa la misma referencia que la nube del aceptor, que a su vez corresponde al centro de la bicapa lipídica. θ es el ángulo formado por el vector que une al eje z con el dador más cercano al aceptor (definido como el *aceptor 1*) y el vector que une el eje z con la posición del carbono α del aminoácido de la toxina donde está unido el aceptor (Figura 2.7). Esta última posición está fija y es obtenida del mismo modelo molecular de donde se obtuvo la nube del aceptor. *RS (Radial Shift)* es un grado de libertad que se otorga a la posición de la nube del aceptor y es desplazamiento radial de la nube a lo largo del vector que une el eje z con el carbono α mencionado anteriormente. La posición de los tres dadores restantes se calcula rotando 90, 180 y 270 grados la posición del primer dador (Figura 2.7) respecto del eje z . k_{Ti} es la constante de rapidez de la transferencia entre el i -ésimo dador y el aceptor, y se calcula a partir de la distancia efectiva entre el

i -ésimo dador y la nube del aceptor (Ecuación 1). En este cálculo se ocupa el valor de R_0 igual a 43 Å, correspondiente al par dador/aceptor Tb⁺³-LBT/BODIPY-FL (Hyde et al. 2012). k_D es la rapidez con que decae el dador en ausencia del aceptor, obtenida previamente y f es una constante que define la amplitud de la señal. A y τ_{ns} definen el componente más rápido del decaimiento producido por el artefacto del láser, donde τ_{ns} está dentro del intervalo entre 20 y 80 μ s. La rutina de ajuste minimiza el error cuadrático entre la señal obtenida experimentalmente y la obtenida del modelo geométrico con la Ecuación 8, variando las tres coordenadas cilíndricas r , θ , z , y las amplitudes f y A . En principio RS se deja como parámetro libre para optimizar la posición del aceptor de manera que los ajustes sean satisfactorios. Una vez optimizada la posición del aceptor, el valor de RS se deja fijo para realizar los ajustes finales a todos los conjuntos de datos.

Es posible observar que dada la geometría del modelo, existe cierta correlación entre la coordenada z y la coordenada r , cuando se realiza el ajuste un decaimiento de emisión sensibilizada (Hyde et al. 2012). Esto se traduce en que si la altura de la pirámide aumenta, el radio basal disminuye (y viceversa) de manera de mantener la magnitud de las distancias efectivas entre los dadores y el aceptor. Esta correlación es mayor conforme el aceptor se acerca al eje de simetría, puesto que en ese límite las cuatro distancias son iguales y la altura de la pirámide (coordenada z) queda indeterminada, al igual que el ángulo θ . De esta manera la coordenada z del modelo afecta ligeramente la razón entre las 4 distancias si el aceptor se encuentra lo suficientemente cerca del eje de simetría. Esto se traduce como una pérdida de robustez en la estimación de la coordenada z .

Para disminuir la incerteza en la coordenada z se restringió el valor máximo posible para esta coordenada de acuerdo a los resultados experimentales de LRET usando

Cu^{+2} como aceptor. Primero se calculó la posición del sitio de Cu^{+2} a partir del modelo molecular que se utilizó para simular la nube de puntos del aceptor IBTX-BODIPY (Figura 2.6). Esto se realizó tomando la posición promedio de los carbonos alfa de los aminoácidos D133, Q151, D153 y R207, que forman el sitio de unión a Cu^{+2} (Ma et al. 2008). El valor de la coordenada z que resultó de este cálculo fue de $z = 9 \text{ \AA}$ ($z = 0 \text{ \AA}$ corresponde al centro de la bicapa). Suponiendo que el inserto LBT está por encima de cada segmento de trans-membrana, la distancia medida entre el sitio de Cu^{+2} y el dador Tb^{+3} -LBT en cada caso corresponde a la altura máxima a la que puede estar el ion Tb^{+3} unido al LBT respecto de la posición del Cu^{+2} . De esta forma se obtiene como máximo permitido para la coordenada z la distancia experimental más 9 \AA .

Simulación Molecular de modelo molecular del BK

Se construyó un modelo molecular por homología del canal BK utilizando como plantilla otros canales de K^+ de estructura cristalográfica conocida. Para la estructura del poro se utilizó como plantilla el canal de K^+ MthK (código PDB: 4HYO) comprendiendo toda la estructura desde el inicio del segmento S5 hasta el término del segmento S6 (Jiang et al. 2002a). Como plantilla para el dominio sensor de voltaje se utilizó la estructura de la quimera K_v 1.2/2.1 (código PDB: 2R9R) desde el segmento S1 hasta el segmento S4 (Long et al. 2007). Dado que no existe una estructura cristalográfica para el segmento S0 del canal BK, este fue modelado utilizando los *software* para predicción de estructura secundaria y de segmentos de transmembrana PSIPRED V3.3, MEMSAT3 y MEMSAT-SVM (Bloomsbury Centre for Bioinformatics, University College London, Reino Unido) para determinar los aminoácidos que forman parte de la hélice de transmembrana. El modelo completo del canal BK fue construido utilizando el

software MODELER v10 (Institute for Quantitative Biomedical Research, University of California San Francisco, USA).

Se insertó el modelo del canal en una bicapa lipídica hecha de POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) de 200 Å de ancho por 200 Å de largo. Posteriormente el sistema fue solvatado en una caja periódica de agua de 200 Å de ancho por 200 Å de largo, con 115 Å de altura, que contiene KCl a una concentración de 110 mM. El sistema total se compone de 368513 átomos. En estas condiciones se realizó una simulación de dinámica molecular con el objetivo de relajar tanto lípidos como cadenas laterales utilizando el programa NAMD v2.9 (Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois, USA). El tiempo de simulación fue de 20 ns de manera que se observara que el sistema convergiera a un estado estable.

Una vez terminada la relajación del modelo inicial, se insertó la secuencia LBT utilizando como plantilla la estructura cristalográfica de este péptido (Nitz et al. 2004, Hyde et al. 2012) entre los aminoácidos S134 y S135, correspondiente a la construcción BKS1LBT. Al mismo tiempo se agregó la estructura del complejo Iberiotoxina-BODIPY (que se utilizó para generar la nube del aceptor) unida a la boca exterior del poro del canal. Se realizó una nueva simulación del sistema BKS0LBT/IBTX-BODIPY utilizando NAMD, esta vez utilizando dos restricciones establecidas como potenciales armónicos. La primera es que las cuatro distancias calculadas a partir de los experimentos de LRET utilizando IBTX-BODIPY deben mantenerse entre los cuatro dadores y la posición del centro de masa del BODIPY. La segunda es que la posición del carbono alfa de la cisteína 20 de la IbTx se mantiene fija. Las posiciones permitidas para el aceptor BODIPY son solo aquellas que corresponden a la nube calculada del aceptor. Utilizando estas restricciones, el modelo

molecular se refina de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos. La simulación tiene un tiempo total de 20 ns asegurando la convergencia hacia una conformación estable.

Una vez terminada la simulación de la construcción BKS1LBT, se procede a quitar el inserto LBT de la posición S1, para luego introducirlo en la posición S2 (D147-F148). Se realizó entonces una segunda simulación de dinámica molecular imponiendo una restricción extra que restringe la posición de los aminoácidos S134 y S125 a la posición final que se obtuvo en la dinámica anterior. De esta manera se conserva el resultado de la restricción de distancias obtenidas para la construcción BKS1LBT en las siguientes simulaciones de dinámica molecular. Finalmente se repite este protocolo pero quitando el LBT de la posición S2 e insertándolo en la posición S0 (W22-W23), pero manteniendo las posiciones S134-S125 y D147-F148 fijas en las coordenadas obtenidas en las dinámicas correspondientes. Finalmente se retiró el LBT de la posición S0 y se realizó una última dinámica molecular de 10 ns de manera de relajar la estructura obtenida con las restricciones experimentales. Este protocolo evita tener presentes los tres insertos LBT al mismo tiempo, con el objetivo de respetar las condiciones experimentales del LRET y además para evitar posibles problemas estéricos.

La inserción correspondiente a la construcción BKNTLBT no fue simulada ya que esta se encuentra en el lazo extracelular que precede al segmento S0. La libertad intrínseca que ha mostrado este lazo en simulaciones anteriores hace que la eventual posición alcanzada restringiendo la posición NT-LBT se pierda rápidamente al retirar la inserción del modelo molecular (comunicación personal con los Drs. Daniel Aguayo y Danilo Gonzalez, Universidad Andrés Bello).

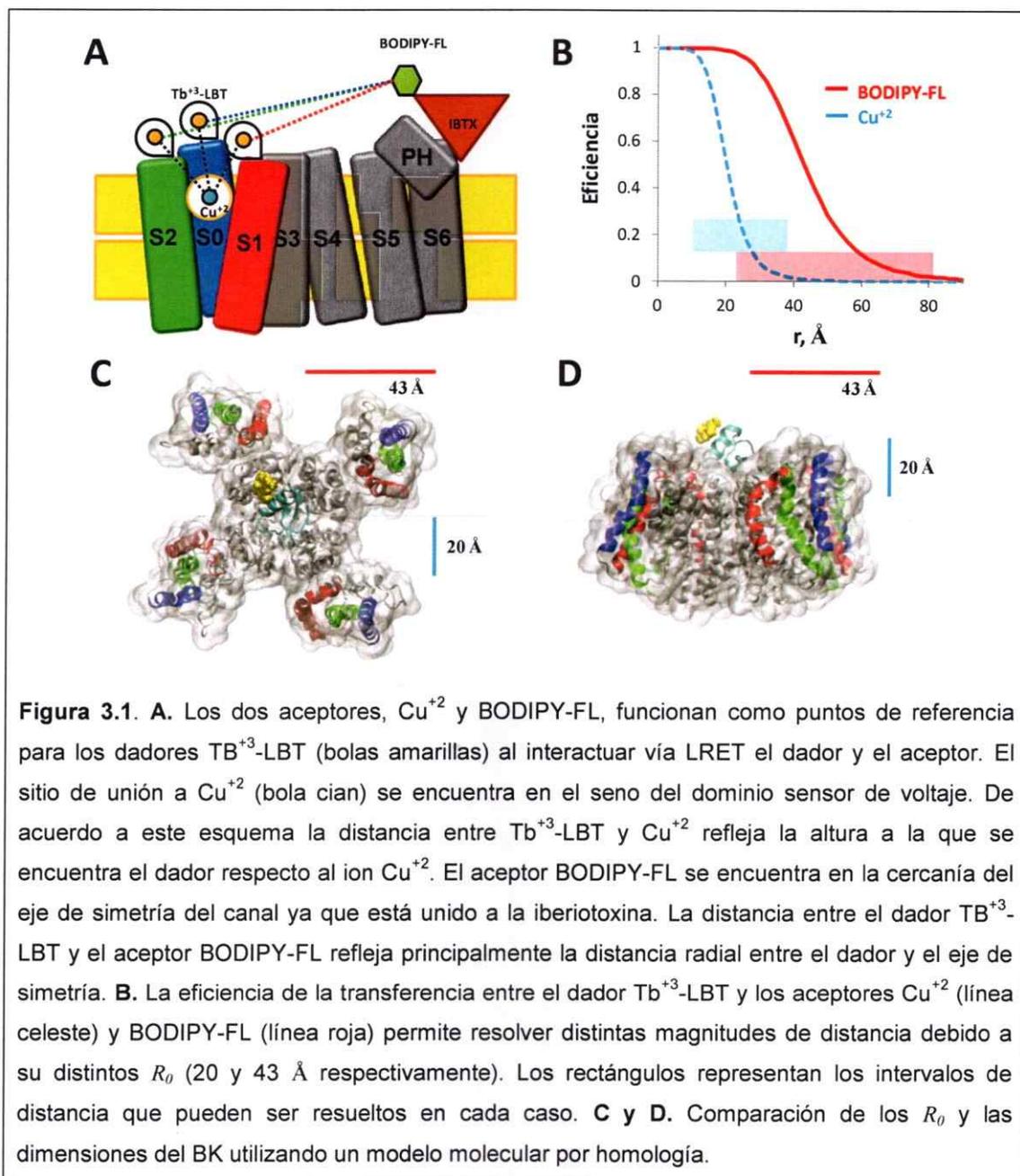
Debido a la gran cantidad de tiempo que se utiliza en el cálculo de la dinámica molecular (del orden de varias decenas de días), solo se utilizaron las distancias medidas en ausencia de la subunidad beta1.

3. Resultados

El objetivo de esta tesis es crear un mapa espacial de distintos puntos del canal BK utilizando la técnica de LRET. Para esto se introdujo exitosamente un motivo de unión a lantánidos (LBT) en cuatro puntos de la estructura del BK y los canales mutantes se expresaron en la membrana de ovocitos de *X. laevis*. Como dador de LRET se utilizó el ion Tb^{+3} (Franz et al. 2003; Sculimbrenne & Imperiali, 2006). Cuando este ion fluorescente está secuestrado al interior del LBT, el decaimiento de su emisión ocurre con una constante de tiempo de ~ 2.47 ms (Franz et al. 2003; Sculimbrenne & Imperiali, 2006; Sandtner et al. 2007; Hyde et al. 2012), en contraste con el decaimiento cuando está en solución, que ocurre con una constante de tiempo de ~ 0.8 ms. De esta manera, un decaimiento de fluorescencia con una constante de tiempo cercana a 2.47 ms en condiciones de dador solo, asegura que la estructura del dador LBT- Tb^{+3} es la correcta tal como se ha reportado anteriormente (Nitz et al. 2006).

Para construir el mapa espacial es necesario conocer la posición del dador en cada construcción respecto del aceptor, que actúa como punto de referencia común (Hyde et al. 2012). Se han elegido dos puntos de referencia donde se encontrará el aceptor de LRET. El primer punto de referencia corresponde a un sitio de unión a Cu^{+2} , que se encuentra en el sensor de voltaje del canal BK (Ma et al. 2008). Este sitio está formado por cadenas laterales de los segmentos S1, S2 y S4 por lo que el ion Cu^{+2} se encontraría rodeado por las hélices de transmembrana del dominio sensor de voltaje, cercano a la interfaz entre la membrana y el medio extracelular (Figura 1.9). Tomando como referencia esta estructura propuesta para el sensor de voltaje de BK, podemos suponer que el LBT de las construcciones está justo por encima de cada segmento. El par Cu^{+2}/Tb^{+3} -LBT tiene un R_0 de 20 Å por lo que, sobre la base de modelos

moleculares de BK obtenidos por homología, podemos suponer de manera confiable que la interacción LRET entre el dador de una subunidad y el aceptor Cu^{+2} unido en una subunidad vecina es poco eficiente comparada con la interacción que ocurre con el aceptor de la misma subunidad (Figura 3.1).



Por lo tanto, la distancia medida entre el sitio de Cu^{+2} y el dador Tb^{+3} -LBT en cada construcción, refleja principalmente el valor de la coordenada z a la que se encuentra el ion Tb^{+3} con respecto a la posición del Cu^{+2} en su sitio (Figura 3.1). El segundo punto de referencia corresponde al aceptor fluorescente BODIPY-FL que se encuentra anclado en una toxina que se une al dominio de poro. Como el R_0 del par Tb^{+3} -LBT/BODIPY-FL es de 43 Å, el aceptor que se encuentra cerca en el eje de simetría del tetrámero es capaz de interactuar con los cuatro dadores, pero con eficiencias distintas (Figura 2.7). Esto permite obtener cuatro distancias dador/aceptor a partir de los registros de emisión sensibilizada. Por esta razón es posible resolver tanto distancias relativas al eje de simetría como el ángulo respecto a la posición del aceptor (Figura 2.7). Sin embargo, dada la correlación que existe con la coordenada r , la coordenada z afecta ligeramente la razón entre las cuatro distancias. Esto se traduce en una incerteza para la coordenada z obtenida del ajuste a este modelo geométrico, incerteza que aumenta mientras más cerca esté el aceptor BODIPY-FL del eje de simetría. Para disminuir la incerteza producida por la cercanía del aceptor al eje de simetría se pueden utilizar las distancias calculadas entre Cu^{+2} y Tb^{+3} como una restricción de la altura a la que puede estar el ion Tb^{+3} unido al LBT (Figura 3.1) cuando se analizan los trazos de emisión sensibilizada del BODIPY-FL. De esta manera se integra la información obtenida de las dos aproximaciones experimentales, para tener un mapa más preciso de las distintas posiciones en que se ha marcado el BK con el dador Tb^{+3} -LBT.

Los clones BK-LBT producen canales funcionales similares al BK

Las tres construcciones BK-LBT generadas (BKS0LBT, BKS1LBT y BKS2LBT) fueron expresadas en la membrana de ovocitos de *X. laevis* inyectando el cRNA correspondiente a cada clon. Luego de tres días post inyección se observaron corrientes iónicas robustas al medirlas con la técnica de *voltage clamp* de dos microelectrodos. Para la caracterización de los clones BK-LBT se utilizó la técnica de *patch clamp* en configuración *inside out* (Hamill et al. 1981) en condiciones de 0 mM Ca^{+2} intracelular y utilizando condiciones simétricas de K^+ . Los registros de *patch clamp* muestran que todas las construcciones producen corrientes macroscópicas al aplicar pulsos de voltaje de amplitud variable entre 0 mV y 300 mV de 40 ms de duración (Figura 3.2A). Para caracterizar la activación por potencial eléctrico de las construcciones BK-LBT se utilizó la corriente instantánea llevada por los canales al regresar a 20 mV inmediatamente después del pulso variable, también conocida como corriente de cola (Figura 3.2A, flecha roja). La magnitud de esta corriente es proporcional a la cantidad de canales abiertos justo al final del pulso variable. La cantidad de canales abiertos en función del pulso variable sigue una distribución de Boltzmann. Si suponemos un modelo de dos estados (abierto y cerrado), la corriente instantánea de la cola, $i_{cola}(V)$, en función del voltaje del pulso variable puede ajustarse a la Ecuación 9:

$$\frac{i_{cola}(V)}{I_{max}} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{zF}{RT}(V - V_{1/2})}} \quad \text{Ecuación 9}$$

donde I_{max} es la corriente del parche a 20 mV si todos los canales presentes en él estuviesen abiertos, V es el voltaje del pulso variable, z es el número aparente de cargas que atraviesa el campo eléctrico al activarse el canal y $V_{1/2}$ es el voltaje al cual

la mitad de los canales están abiertos. $R T$ y F son la constante de los gases ideales, la temperatura absoluta y la constante de Faraday, respectivamente.

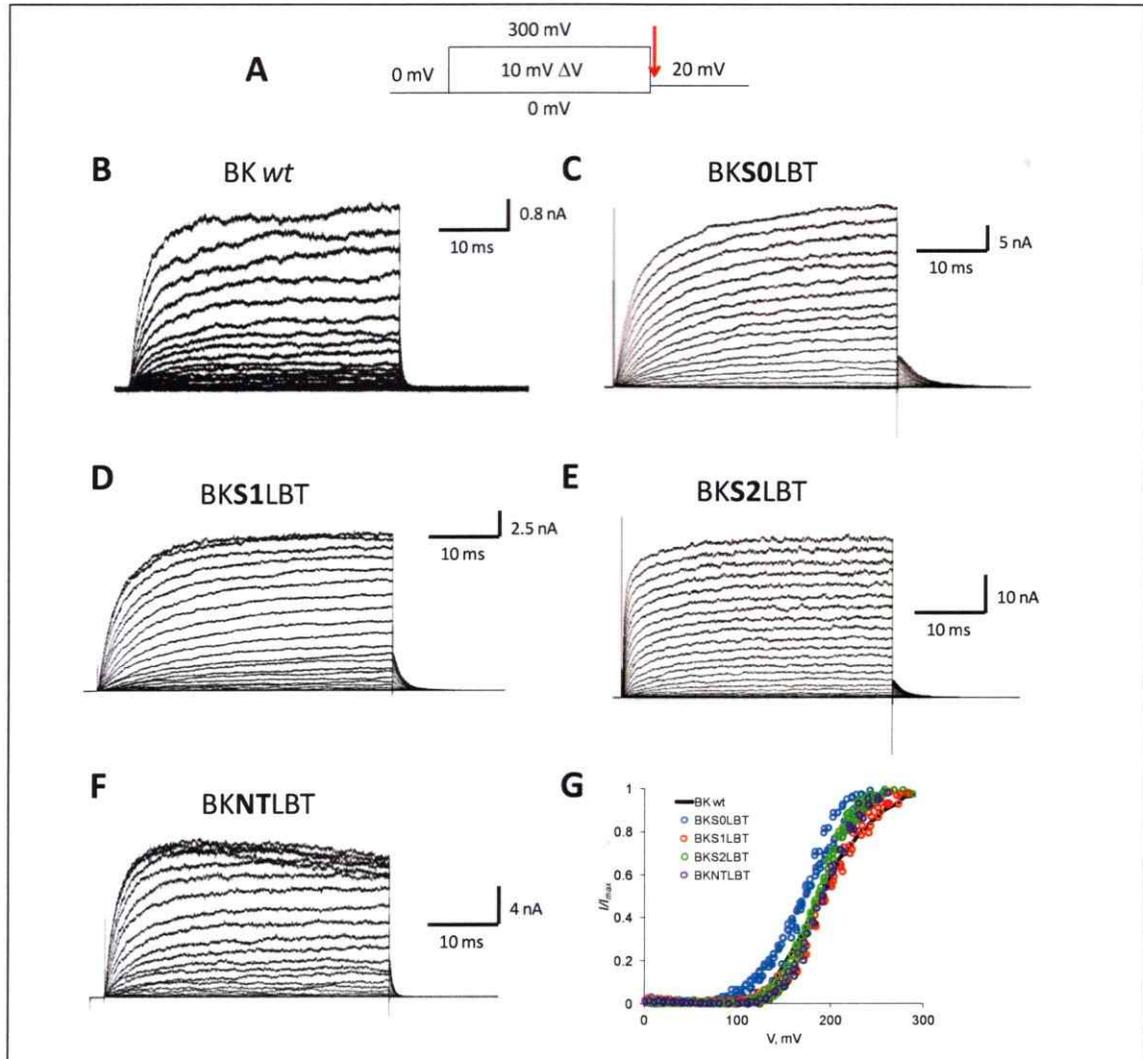
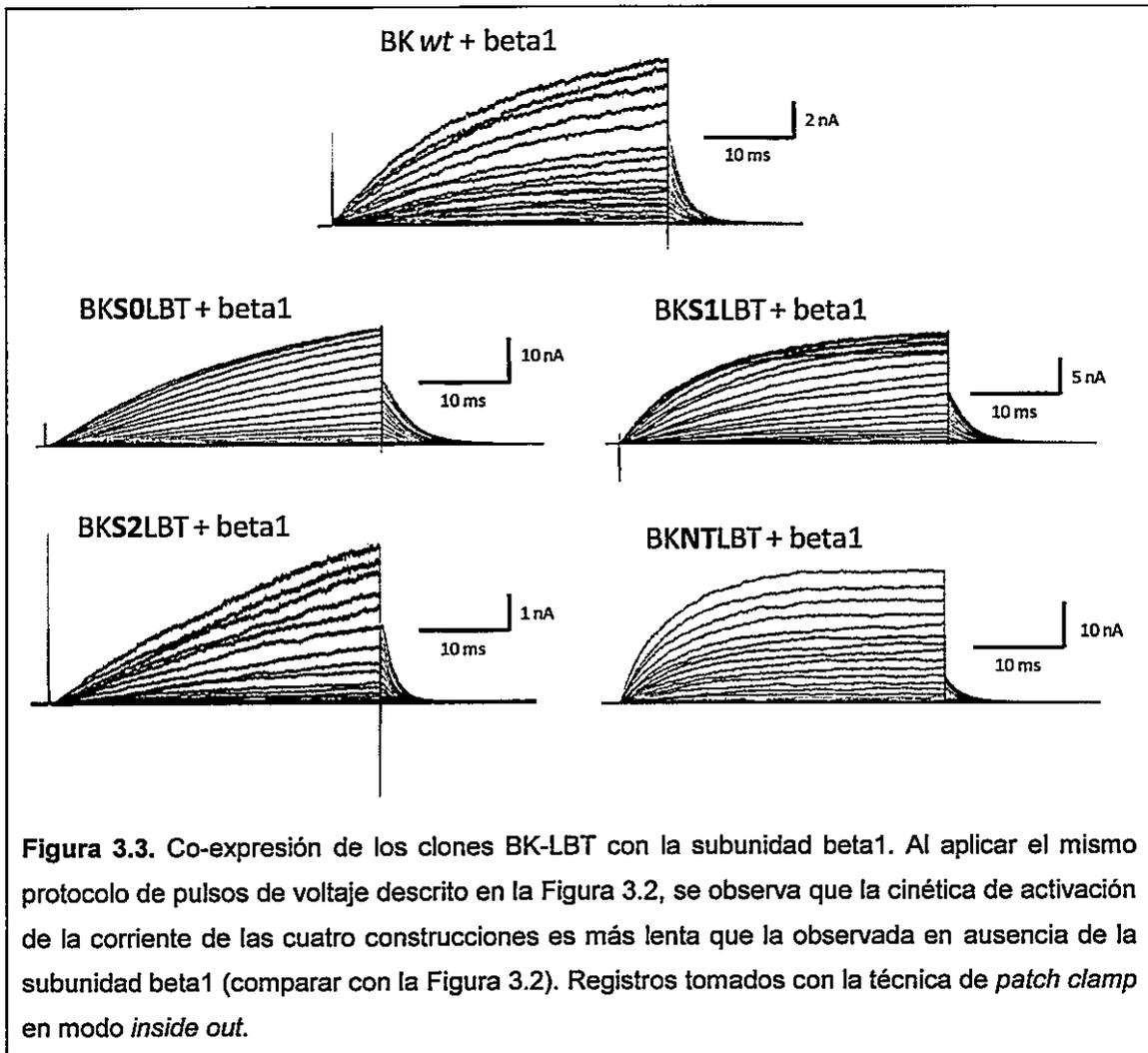


Figura 3.2. Corrientes llevadas por los canales BK-LBT registradas con la técnica de *patch clamp* en modo *inside out* **A.** Protocolo de pulsos de voltaje variables. El voltaje inicial es de 0 mV. El pulso variable de 40 ms de duración va entre 0 mV y 300 mV, en saltos de 10 mV. La corriente de cola se mide al instante en que se regresa a 20 mV desde el pulso variable indicado con una flecha roja. **B, C, D, E y F.** Corrientes macroscópicas llevadas por parches de membrana que contienen canales BK silvestre (*wt*), BKS0LBT, BKS1LBT, BKS2LBT y BKNTLBT, respectivamente **G.** Corrientes de cola normalizadas, los puntos de color azul, rojo, verde y púrpura representan la curvas G/V de las construcciones BKS0LBT, BKS1LBT, BKS2LBT y BKNTLBT respectivamente. La línea negra representa la curva G/V del BK *wt*.

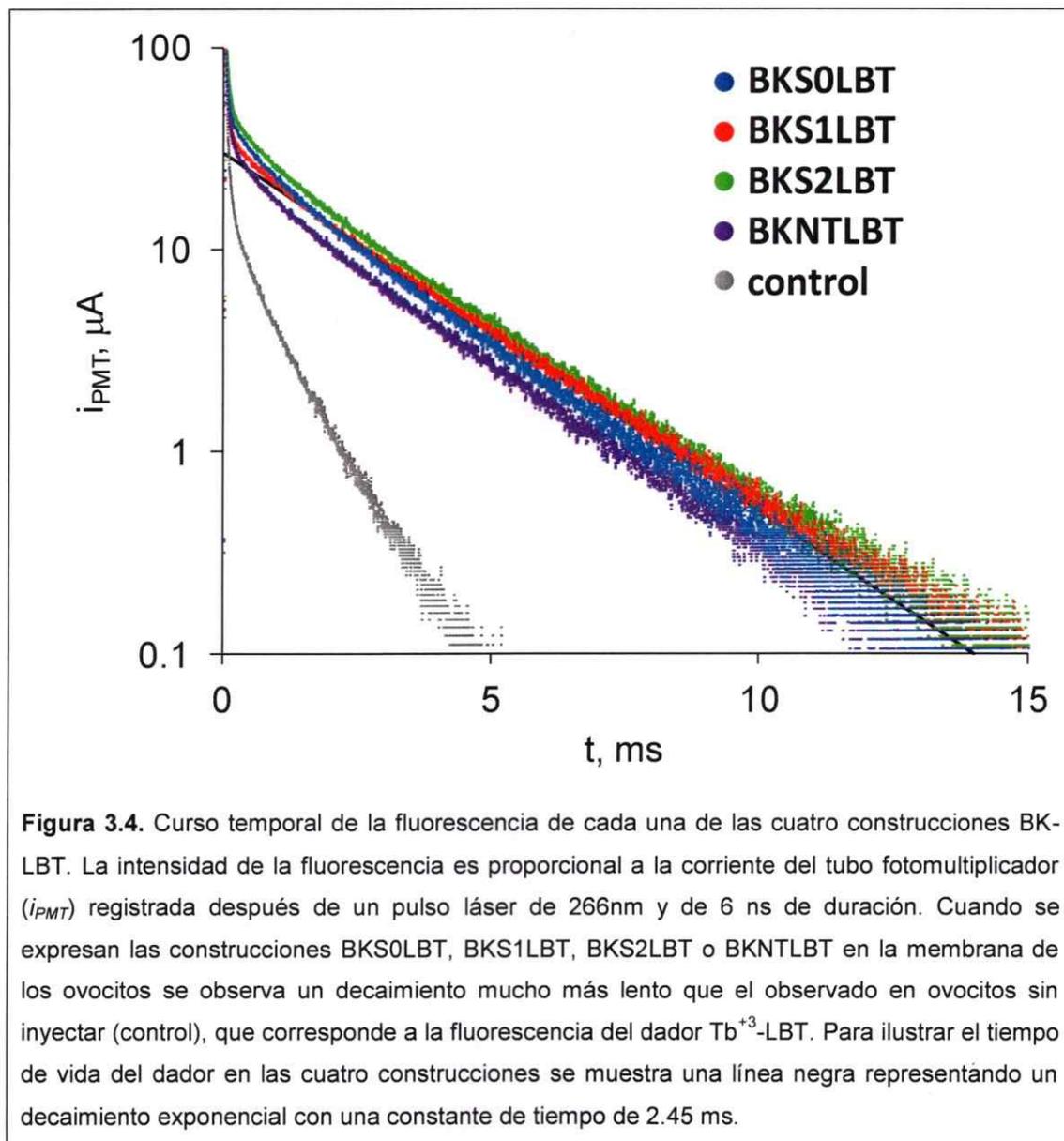
Al ajustar las corrientes de cola en función del voltaje del pulso variable a la Ecuación 9 se obtuvieron los parámetros $V_{1/2}$ y z . El valor promedio \pm desviación estándar de $V_{1/2}$ resultó ser 172 ± 15 mV, 197 ± 22 mV, 187 ± 17 mV y 192 ± 11 para las construcciones BKS0LBT, BKS1LBT, BKS2LBT y BKNTLBT respectivamente en tanto que z resultó ser 1.4 ± 0.4 , 1.1 ± 0.2 , 1.4 ± 0.2 y 1.3 ± 0.1 respectivamente ($n = 9, 5, 10$ y 4). Los valores de $V_{1/2}$ y z obtenidos para el BK silvestre (*wt*) en estas condiciones fueron de 201 ± 9 mV y 1.0 ± 0.2 ($n = 6$), respectivamente, similares a los valores reportados de 180~210 mV y ~ 1 (Horrigan et al. 1999; Cox & Aldrich, 2000; Orio et al. 2005). En la Figura 3.2G se comparan datos representativos de las corrientes de cola normalizadas para las cuatro construcciones con la curva de activación del canal BK *wt*. Estos resultados indican que la inserción LBT no altera sustancialmente el fenotipo de la corriente iónica llevada por la subunidad alfa del canal BK. Posteriormente, los clones BK-LBT fueron co-expresados con la subunidad beta1. Al aplicar el mismo protocolo de pulsos de voltaje, es posible observar un enlentecimiento de la cinética de activación de las corrientes macroscópicas llevadas por las construcciones (Figura 3.3). Este efecto es el mismo que provoca la co-expresión de la subunidad beta1 con el canal silvestre (Meera et al. 1996; Dworetzky et al. 1996; Orio & Latorre, 2005). Por lo tanto podemos inferir que el acople funcional entre las subunidades alfa y beta1 está conservado en las tres construcciones BK-LBT.



Los clones BK-LBT producen señales de fluorescencia del dador Tb⁺³-LBT

Luego de comprobar la expresión funcional de los clones BK-LBT en la membrana de los ovocitos se procedió a evaluar la señal del dador midiendo la fluorescencia en función del tiempo agregando TbCl₃ a la solución externa. El propósito de estos experimentos, en los que la concentración de TbCl₃ es de 10 μM, no es solo comprobar la incorporación del dador Tb⁺³ a los canales con LBT, sino que también conocer el tiempo de vida del dador en ausencia del aceptor ($\tau_D = k_D^{-1}$) que se utiliza en el cálculo

de las distancias entre dador y aceptor (Ecuación 1, Ecuación 7). Para esto se utilizó la estación de LRET intercalando el filtro de emisión para el dador, LP515 (Figuras 2.3 y 2.4A). La señal de fluorescencia proveniente de los ovocitos expresando los clones BK-LBT es transitoria, decayendo en el transcurso de varios milisegundos después de dar el pulso de luz con el láser (Figura 3.4).



Esta señal se analizó haciendo un ajuste de mínimos cuadrados a una función de tres componentes exponenciales (Ecuación 5). El más rápido de estos tres componentes tiene un tiempo de vida de entre 50 y 100 μs y corresponde principalmente al artefacto producido por el láser que también se registra en ausencia de ovocitos y sin TbCl_3 en la cámara. El segundo componente es de alrededor de $\sim 800 \mu\text{s}$ y corresponde a la fluorescencia del ion Tb^{+3} presente en la solución que se encuentra en el paso de la luz. Estos dos componentes ya mencionados son visibles al realizar el experimento utilizando ovocitos no inyectados.

El tercer componente de la fluorescencia, que es el más lento, corresponde al decaimiento del dador Tb^{+3} -LBT que tiene una constante de tiempo de alrededor de 2.45 ms (Nitz et al. 2004; Sandtner et al, 2007; Hyde et al. 2012). Este componente lento no está presente al realizar el experimento en ovocitos sin inyectar. Al medir la señal de fluorescencia en estas condiciones fue posible detectar el decaimiento lento del dador Tb^{+3} -LBT en los cuatro clones BK-LBT (Figura 3.4). La amplitud de este componente alcanza alrededor del 50% de la señal (sin tomar en cuenta el componente de 50-100 μs) en ovocitos registrados tres a cuatro días después de la inyección del cRNA. Al co-expresar las cuatro construcciones BK-LBT con la subunidad beta1 también es posible observar el componente lento correspondiente a la emisión del dador. La amplitud de la señal del dador no cambió significativamente al expresar la subunidad beta1. Los tiempos de vida del dador para las construcciones BK-LBT están en la Tabla I.

La estructura del LBT coordina al ion Tb^{+3} en su interior evitando el contacto con las moléculas de agua que están en los alrededores. El agua es capaz de acelerar el decaimiento del Tb^{+3} en estado excitado ya que actúa como un *quencher* colisional (o apagador por colisión) (Nitz et al. 2004; Sandtner et al 2007). Por lo tanto cuando el

inserto LBT en una proteína no está correctamente plegado, el tiempo de vida del decaimiento disminuye pues permite el contacto del ion Tb^{+3} con el agua (p. ej. Ver Hyde et al. 2012).

Tabla I. Tiempo de vida del dador Tb^{+3} -LBT

Construcción	τ_D ms	n
BKS0LBT	2.49 ± 0.08	35
BKS1LBT	2.44 ± 0.05	29
BKS2LBT	2.39 ± 0.07	50
BKNTLBT	2.28 ± 0.05	13
BKS0LBT+beta1	2.55 ± 0.04	29
BKS1LBT+beta1	2.38 ± 0.06	16
BKS2LBT+beta1	2.44 ± 0.03	23
BKNTLBT+beta1	2.31 ± 0.08	10

Se muestra el valor promedio y la desviación estándar del tiempo de vida del dador (τ_D), para las cuatro construcciones BK-LBT, indicando el número de experimentos (n). Se ajustó un decaimiento de tres componentes exponenciales (Ecuación 5) al registro de fluorescencia de los ovocitos expresando las diferentes construcciones en condiciones de dador solo. El tiempo de vida del dador fue obtenido tomando la constante de tiempo más lenta del ajuste.

El hecho de que el componente lento de la señal de fluorescencia tenga una constante de tiempo alrededor de 2.45 ms indica que el inserto LBT está plegado correctamente en las cuatro construcciones BK-LBT. La existencia de señales robustas del dador Tb^{+3} -LBT para las construcciones con y sin la presencia de la subunidad beta1 permitió la utilización de éstas para hacer los posteriores experimentos de LRET.

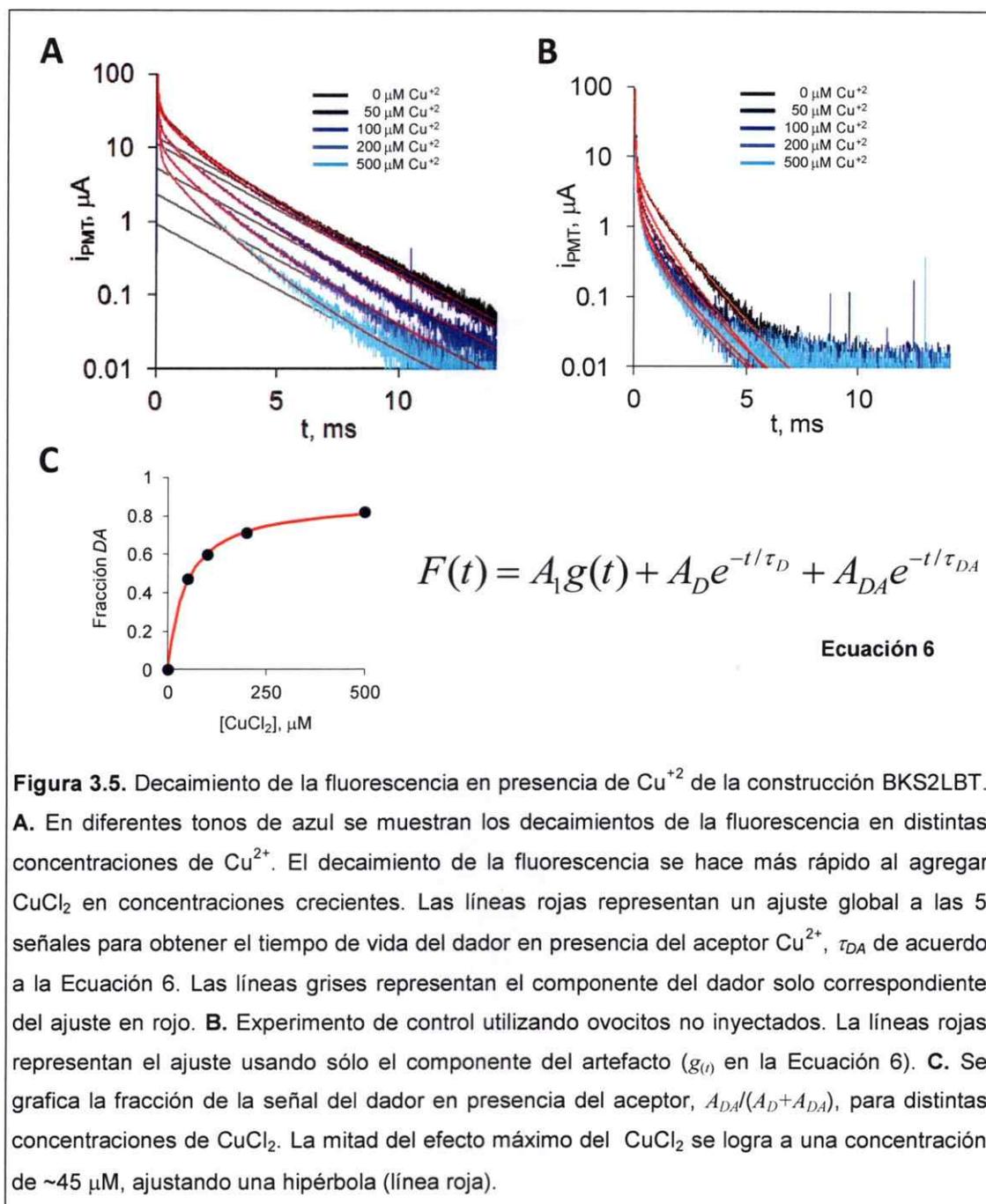
LRET entre el dador LBT-Tb⁺³ y el aceptor Cu⁺²

Luego de comprobar la señal del dador LBT-Tb⁺³ se procedió a realizar los experimentos de LRET utilizando como aceptor el ion Cu⁺². Se ha descrito que el canal BK tiene un sitio de unión a Cu⁺² en el sensor de voltaje, con una afinidad aparente de ~2 μ M (Ma et al, 2008; Figura 1.9). El ion Cu⁺² puede actuar como aceptor de LRET para el dador Tb⁺³, ya que su espectro de absorción se superpone con el espectro de emisión del Tb⁺³ (Sandtner et al. 2007). El valor de la constante R_0 para el par Tb⁺³/Cu⁺² es de 20 Å (Sandtner et al. 2007). Como el dador Tb⁺³-LBT se encuentra en la parte extracelular del dominio sensor de voltaje en las construcciones BK-LBT podemos suponer que la distancia que los separa es suficiente para que haya LRET entre Tb⁺³ y Cu⁺². Si el dador Tb⁺³-LBT es capaz de interactuar vía LRET con el ion Cu⁺² unido en su sitio, la distancia calculada entre dador y aceptor debiera reflejar la distancia que existe entre la cara externa de la membrana y la posición del Tb⁺³ (ver Figura 3.1). Esto es así ya que el sitio de Cu⁺² se encontraría justo entre los segmentos de trans-membrana S1 a S4 (Ma et al. 2008) y suponemos que el motivo LBT se sitúa justo por encima del dominio sensor de voltaje (Figura 1.9).

Los experimentos fueron realizados agregando CuCl₂ al baño para luego registrar el curso temporal de la fluorescencia. Cuando se agrega CuCl₂ al baño, se observa la aceleración del decaimiento de la señal de fluorescencia del dador (Figura 3.5A). Para el análisis de estos registros se ajustó el curso temporal de la fluorescencia a la Ecuación 6. El primer término de esta ecuación corresponde al artefacto producido por el láser, caracterizado utilizando ovocitos sin inyectar (Figura 3.5B). El segundo término corresponde a la fluorescencia del dador en ausencia del aceptor, cuya constante de tiempo es τ_D obtenida de la tabla I. El tercer componente corresponde al dador en

*

presencia del aceptor, cuya constante de tiempo τ_{DA} es un parámetro ajustable junto con las amplitudes relativas A_I , A_D y A_{DA} .



La Figura 3.5C muestra la fracción de señal llevada por el componente del dador en presencia del aceptor, calculada como $A_{DA}/(A_D+A_{DA})$. Se observa que esta fracción crece de forma hiperbólica conforme aumenta la concentración del CuCl_2 y la concentración a la cual se observa la mitad del efecto es de alrededor de $45 \mu\text{M}$, más de veinte veces el valor de la constante de disociación del sitio de Cu^{+2} publicada (Ma et al. 2008). Ya que la operación del sensor de voltaje de las construcciones BK-LBT no parece alterada (Figura 3.2), este efecto podría explicarse por una posible competencia del ion Ca^{+2} (presente en la solución extracelular) por el sitio de Cu^{+2} (comunicación personal con el Dr. Francisco Bezanilla).

Se utilizó una concentración de $200 \mu\text{M}$ de CuCl_2 ya que la amplitud de la señal del dador en presencia del aceptor es mayor que el 50% de la amplitud de la señal menos el artefacto. En estas condiciones el cálculo del tiempo de vida del dador en presencia del aceptor es confiable ya que hay menos distorsión debido a la fracción de señal llevada por el dador solo (Figura 3.5). De esta manera se analizaron varios trazos de fluorescencia de ovocitos expresando las construcciones BKS0LBT, BKS1LBT y BKS2LBT con y sin la subunidad beta1. No se realizaron estos experimentos con la construcción BKNTLBT pues la expresión de estos canales fue esquivada y los ovocitos con señal del dador solo fueron utilizados para los experimentos utilizando IBTX-BODIPY como aceptor.

Los resultados del análisis de los trazos de fluorescencia en presencia de Cu^{+2} se resumen en la Tabla II. La magnitud de τ_{DA} en ausencia de la subunidad beta1 no es muy distinta entre las tres construcciones BK-LBT utilizadas. Esto sugiere que el dador Tb^{+3} -LBT está a una distancia similar del sitio del Cu^{+2} para las tres posiciones donde se encuentra el LBT. Al realizar un test de Student con una probabilidad de error de

0.01, sólo la construcción BKS1LBT tiene un valor de τ_{DA} significativamente distinto del valor obtenido para BKS0LBT y BKS2LBT. Por otro lado al co-expresar las construcciones BK-LBT con la subunidad beta1, solo la construcción BKS2LBT sufre un cambio estadísticamente significativo en la magnitud de τ_{DA} (Tabla II).

Tabla II. Tiempo de vida del dador en presencia del aceptor Cu^{+2}

Construcción	τ_{DA} ms	n
BKS0LBT	1.37 ± 0.37	15
BKS0LBT+beta1	1.56 ± 0.28	25
BKS1LBT	0.98 ± 0.19	14
BKS1LBT+beta1	1.17 ± 0.18	7
BKS2LBT	1.23 ± 0.20	21
BKS2LBT+beta1	1.42 ± 0.08	22

Se muestra el valor promedio ± desviación estándar del tiempo de vida del dador LBT-Tb⁺³ en presencia del aceptor Cu^{+2} (τ_{DA}) para cada construcción BK-LBT. El recuadro y los corchetes rojos simbolizan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

Al registrar las señales de fluorescencia dando un pulso de voltaje de 200 mV durante la adquisición, no fue posible detectar cambios significativos en el decaimiento de la fluorescencia del dador en presencia del aceptor Cu^{+2} . Sin embargo la corriente total registrada durante los pulsos de voltaje superó los 200 μA . Una corriente de 100 μA puede introducir una diferencia del 90% en el potencial eléctrico de la membrana en el punto de colección de luz respecto del voltaje que se está controlando y este error aumenta conforme aumenta la corriente total del ovocito (Baumgartner et al. 1999).

Esto sugiere que los resultados negativos se deben a que el método de control de voltaje no es el adecuado para causar una perturbación de los sensores de voltaje en el punto de colección de luz.

Con los valores de τ_{DA} usando Cu^{+2} como aceptor (Tabla II) de se calculó la distancia del par LBT- $\text{Tb}^{+3}/\text{Cu}^{+2}$ utilizando la Ecuación 7. El valor de R_0 usado en el cálculo fue igual a 20 Å (Sandtner et al, 2007) y los valores de τ_D se obtuvieron de la Tabla I. La Figura 3.6 resume los resultados del cálculo.

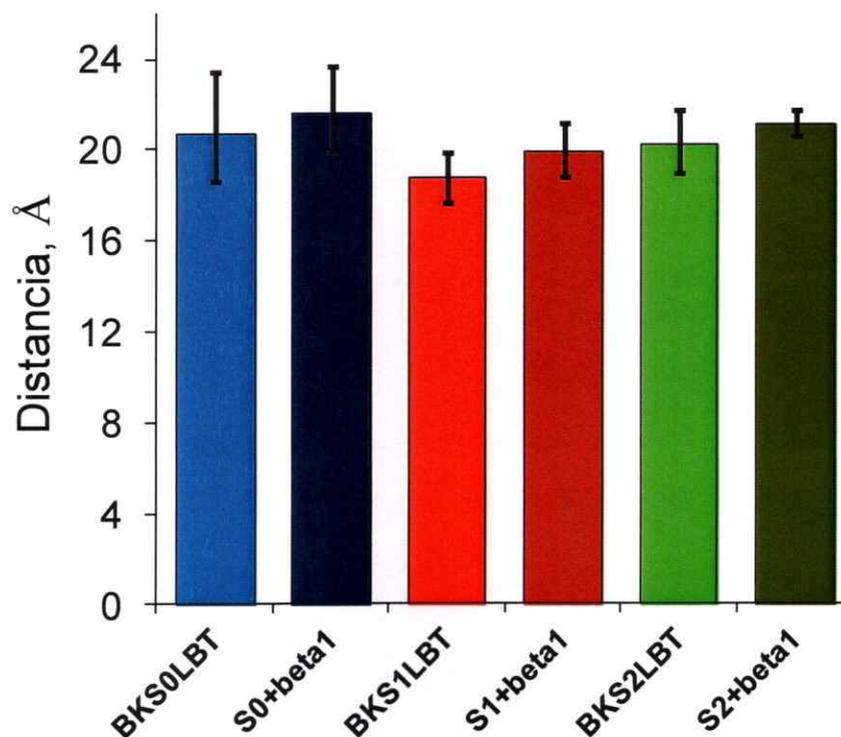


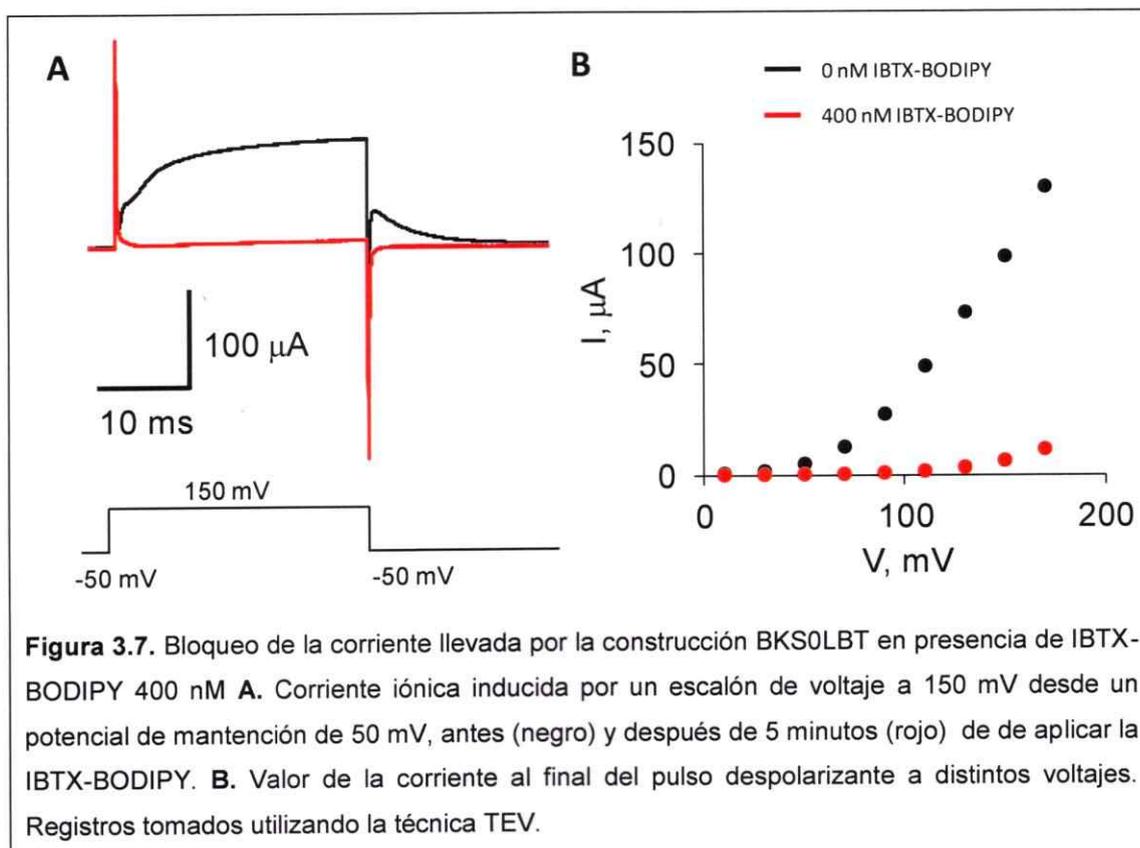
Figura 3.6. Distancia entre el dador Tb^{+3} -LBT y el sitio de Cu^{+2} obtenidas del análisis de los experimentos de LRET usando Cu^{+2} como aceptor. Para hacer el cálculo se utilizó la Ecuación 7 usando los valores de τ_{DA} de la tabla II, el valor de τ_D correspondiente de la tabla I y $R_0 = 20$ Å. Las barras del histograma representan la distancia promedio calculada para cada construcción. Las líneas de error representan la transformación en distancia de cada valor promedio de $\tau_{DA} \pm$ su desviación estándar, obtenidos de la Tabla II. Como que la Ecuación 7 es no lineal, existe una asimetría entre la desviación positiva y la negativa.

Examinando la tabla II es posible notar que aunque existen diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de vida del dador en presencia del aceptor, las distancias correspondientes sólo tienen diferencias de entre 1 y 2 Å (Figura 3.6). Esto concuerda con la expectativa de que el motivo LBT se encuentra por encima del dominio sensor de voltaje en las tres construcciones, lo que ha sido ilustrado esquemáticamente en la Figura 3.1.

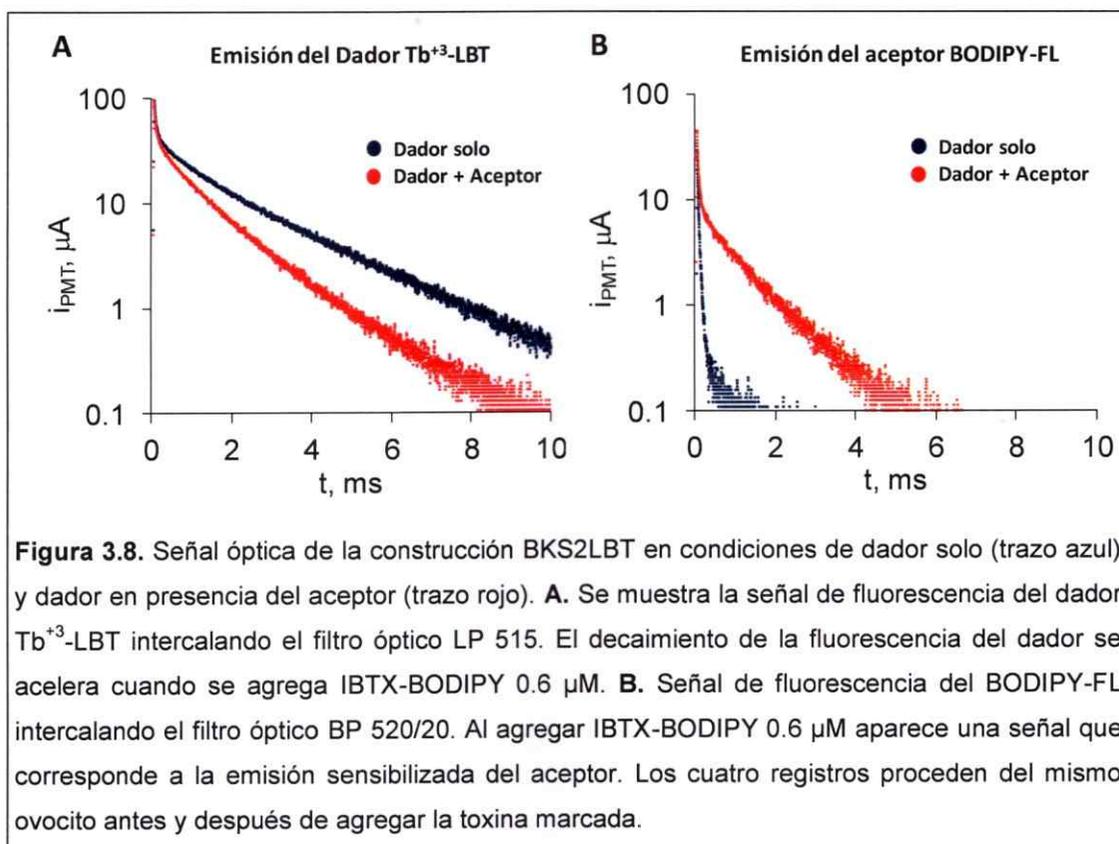
La distancia medida entre el sitio de Cu^{+2} y el dador Tb^{+3} -LBT en cada caso, da una aproximación del valor de la coordenada z a la que se encuentra el ion Tb^{+3} con respecto a la posición del Cu^{+2} en su sitio (Figura 3.1). Esto permite utilizar las distancias calculadas (entre Cu^{+2} y Tb^{+3}) como una restricción de la altura máxima a la que puede estar el ion Tb^{+3} unido al LBT. De acuerdo a las distancia obtenidas de la Figura 3.6 y a la posición supuesta del sitio de Cu^{+2} ($z = 9$ Å, ver sección **Materiales y Métodos**) el valor máximo de la coordenada z para el dador Tb^{+3} -LBT resulta ser 29.7 Å, 27.7 Å y 29.2 Å para las construcciones BKS0LBT, BKS1LBT y BKS2LBT respectivamente. En presencia de la subunidad beta1 los valores calculados para las mismas construcciones son 30.6 Å, 28.9 Å y 30.1 Å respectivamente. Esta restricciones se utilizaron en el análisis los trazos de emisión sensibilizada del BODIPY-FL utilizando la metodología descrita en Hyde et al. (2012) que se muestra más adelante en esta tesis.

LRET entre el dador LBT-Tb⁺³ y el aceptor IBTX-BODIPY

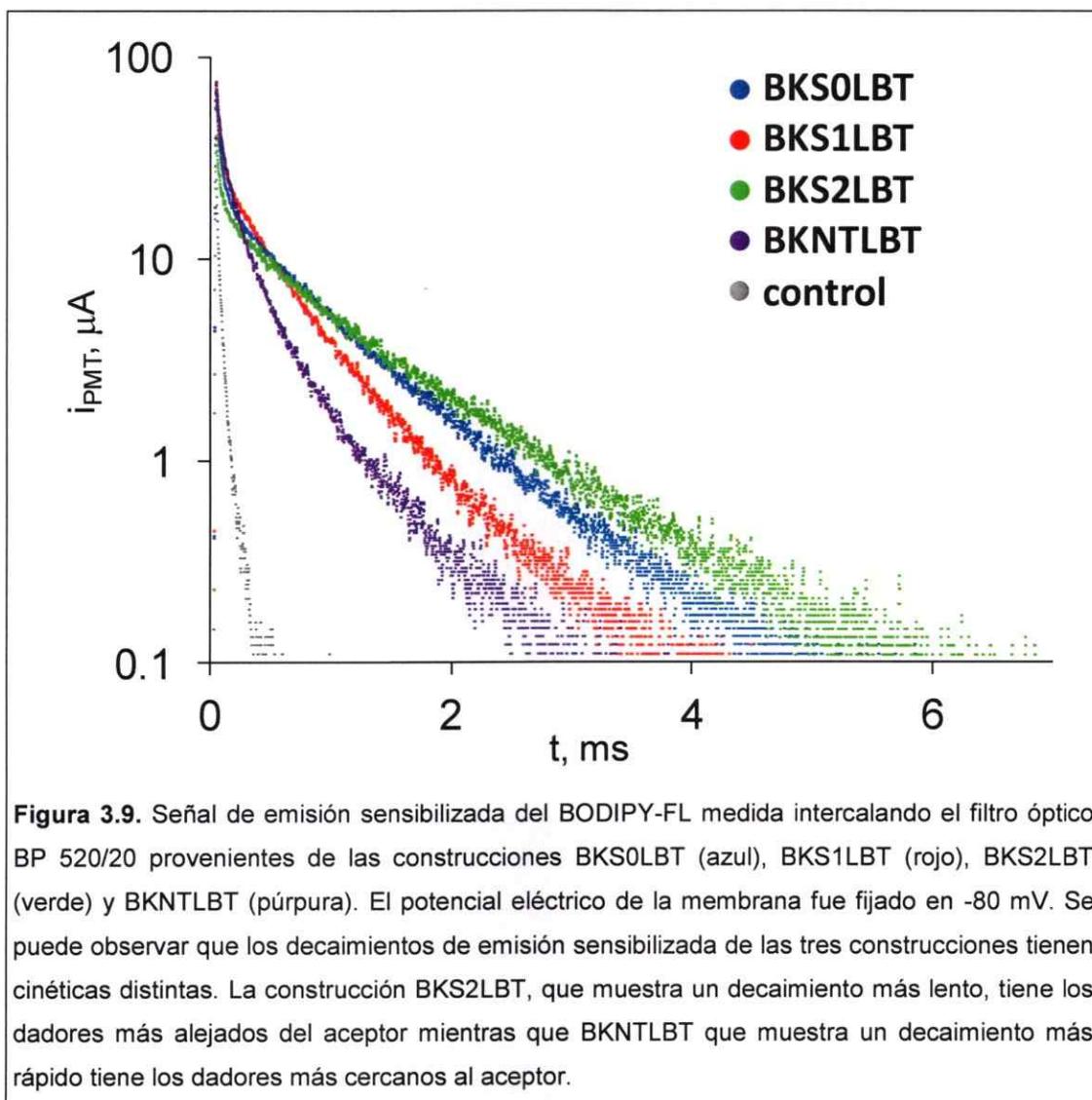
Posteriormente, se procedió a realizar los experimentos de LRET utilizando el aceptor fluorescente BODIPY-FL, el cual está unido covalentemente con iberiotoxina, un péptido que se une al poro del canal BK (Galvez et al. 1990; Candia et al. 1992; Giancomo et al. 1992). Esta toxina fue descubierta en el veneno del escorpión *Buthus tamulus*, (Gálvez et al. 1990) y la que se usó en esta tesis corresponde a una sintetizada en fase sólida por el Dr. Stephen Kent en colaboración con el Dr. Francisco Bezanilla, ambos de la Universidad de Chicago. La constante de disociación aparente de la iberiotoxina aislada de *Buthus tamulus* es de 1.2 nM medida en bicapas lipídicas artificiales (Candia et al. 1992). Para lograr un bloqueo del 90% de la corriente y observar la señal de emisión sensibilizada fue necesario utilizar una concentración de entre 200 y 600 nM de la IBTX-BODIPY. La aparente disminución en la afinidad respecto de la Iberiotoxina sin marcar parece ser producto de la interacción hidrófoba del fluoróforo con el plástico (tubo de colección, punta de micro-pipeta, pared de la cámara, etc.) lo que disminuye la concentración efectiva de la toxina (comunicación personal con los Drs. Jerome Lacroix, Jorge Sanchez-Rodriguez y Francisco Bezanilla, Universidad de Chicago). Al momento de realizar el experimento, el efecto de la IBTX-BODIPY se evalúa observando la disminución de corriente llevada por los canales de las construcciones BK-LBT usando la técnica TEV (Figura 3.7).



Cuando se registra la fluorescencia de los ovocitos que han expresado las construcciones BK-LBT utilizando el filtro óptico LP515 para ver la señal del dador (ver materiales y métodos), el resultado de agregar IBTX-BODIPY al baño es la aceleración del decaimiento de la fluorescencia del dador (Figura 3.8A). Cuando se registra la fluorescencia de los mismos ovocitos utilizando el filtro BP 520/20 para ver solo la emisión del BODIPY-FL, el resultado de agregar IBTX-BODIPY es la aparición de un nuevo componente de gran amplitud (Figura 3.8B). Este nuevo componente en la señal de fluorescencia corresponde a la emisión sensibilizada del aceptor.



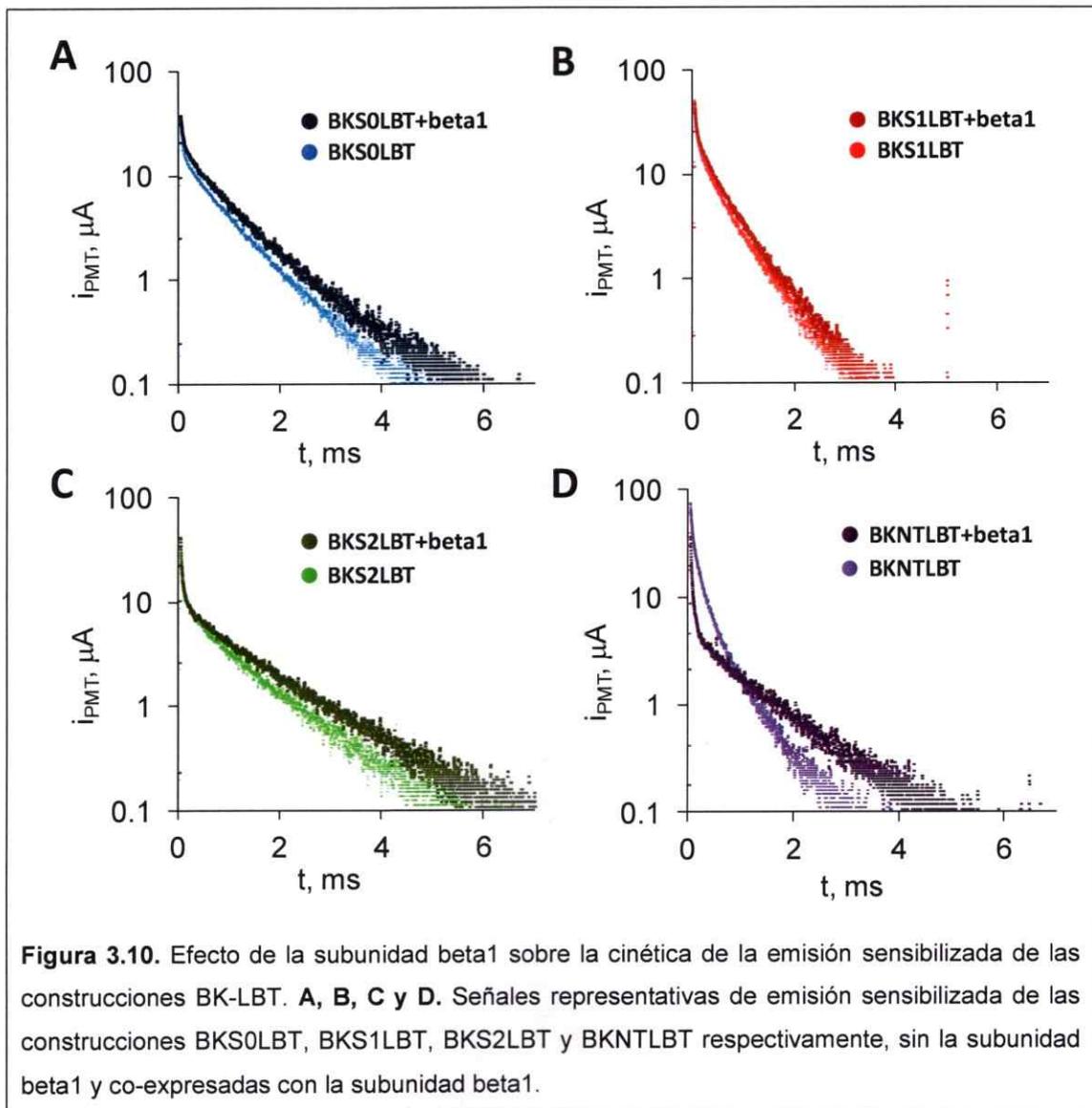
Las cuatro construcciones BK-LBT utilizadas produjeron señales reproducibles de emisión sensibilizada con cinéticas característicamente distintas (Figura 3.9). De acuerdo a la ecuaciones 1 y 4, las diferencias en la cinética de decaimiento de la emisión sensibilizada corresponden distintas distancias entre los dadores y el aceptor (Figura 1.7, Figura 2.7). Observando la Figura 3.9 es posible notar que el decaimiento más rápido corresponde a la construcción BKNTLBT, mientras que el más lento corresponde a la construcción BKS2LBT. Como el dador se encuentra cerca del eje de simetría del canal es posible afirmar que las cuatro construcciones, en orden decreciente de cercanía al poro del canal se ordenan BKNTLBT, BKS1LBT, BKS0LBT y BKS2LBT.



Las señales de emisión sensibilizada de la Figura 3.9 fueron obtenidas fijando el voltaje de membrana en -80 mV. Al registrar las señales de fluorescencia dando un pulso de voltaje de 200 mV durante la adquisición no fue posible medir cambios significativos en la cinética de emisión sensibilizada. Sin embargo, a pesar de estar en presencia de la IBTX-BODIPY la corriente total registrada durante los pulsos de voltaje superó los 100 μA . Como se mencionó en la sección anterior, el tamaño de esta corriente puede

introducir una diferencia de voltaje de hasta un 90% en el punto de colección de luz respecto del voltaje que se está controlando (Baumgartner et al. 1999). Estos resultados negativos están en concordancia con los resultados obtenidos utilizando como aceptor el Cu^{+2} .

Al co-exresar las subunidades alfa y beta1 del BK también se obtienen señales de emisión sensibilizada con cinéticas característicamente distintas (Figura 3.10).



El efecto de la subunidad beta1 sobre la cinética de la emisión sensibilizada es diferente para cada construcción BK-LBT. En la Figura 3.10 se observa que el efecto más evidente de la subunidad beta 1 ocurre con BKNTLBT, que muestra un enlentecimiento de la cinética. Al mismo tiempo la construcción BKS1LBT no muestra un cambio claro en la cinética del decaimiento de la emisión sensibilizada en presencia de la subunidad beta1.

Todos los registros de emisión sensibilizada fueron analizados de manera preliminar ajustando un decaimiento de tres componentes exponenciales (Ecuación 5). Este ajuste se realizó con fines ilustrativos y para seleccionar los registros que tuviesen la mejor razón de amplitudes señal/artefacto. Los valores de las tres constantes de tiempo obtenidas del ajuste están en la tabla III.

Tabla III. Análisis preliminar de los registros de emisión sensibilizada

Construcción	τ_1	τ_2	τ_3	n
	μs	μs	μs	
BKS0LBT	40 ± 4	455 ± 59	1031 ± 45	29
BKS0LBT+beta1	45 ± 4	554 ± 33	1292 ± 91	27
BKS1LBT	39 ± 4	334 ± 33	796 ± 52	34
BKS1LBT+beta1	42 ± 7	363 ± 32	833 ± 51	17
BKS2LBT	43 ± 5	444 ± 57	1296 ± 60	24
BKS2LBT+beta1	40 ± 4	420 ± 63	1417 ± 72	22
BKNTLBT	45 ± 1	217 ± 26	784 ± 83	16
BKNTLBT+beta1	37 ± 2	309 ± 82	1319 ± 69	7

Valor promedio y desviación estándar de las tres constantes de tiempo obtenidas al ajustar los registros de emisión sensibilizada a un decaimiento de tres componentes (Ecuación 5), indicando también el número de experimentos (n).

Todas las señales de emisión sensibilizada presentan un componente rápido con una constante de tiempo de alrededor de 40 μ s y que representa entre el 50 y el 70% de la amplitud total del decaimiento justo en el instante inicial de la señal. Este componente rápido se observa también registrando ovocitos no inyectados (Figura 3.9) y corresponde a un artefacto producido por el pulso láser. Las dos constantes de tiempo más lentas obtenidas del ajuste a son de magnitudes de cientos a miles de microsegundos y corresponden al decaimiento de la emisión sensibilizada del aceptor, ya que el valor de las constantes es distinto entre las cuatro distintas construcciones (Tabla III).

Se puede observar que el artefacto rápido producido por el láser en ovocitos no inyectados puede ser despreciado luego de 0.5 ms del tiempo inicial (Figura 3.9) (que corresponde a la llegada del pulso láser). Dado que si se decide utilizar los registros de emisión sensibilizada a tiempos ≥ 0.5 ms se perdería información importante de los componentes más rápidos de la emisión sensibilizada (representados por τ_2 en la tabla III), es necesario incluir un decaimiento exponencial con una constante de tiempo de entre 40 y 80 μ s en la rutina de ajuste que se detalla más adelante en esta tesis.

A pesar de este artefacto rápido las diferencias que se observan en las constantes de tiempo τ_2 y τ_3 de la tabla III para las distintas construcciones, sugieren que cuando el canal BK se co-expresa junto a la subunidad beta1, se produce un cambio de conformación que da como resultado un cambio en la posición relativa de los dadores respecto al aceptor BODIPY-FL que se encuentra cercano al eje de simetría.

Para un análisis detallado se utilizó una estrategia que ajusta los registros de emisión sensibilizada a un decaimiento teórico que se construye a partir de un modelo geométrico de tipo piramidal (Posson & Selvin, 2008; Hyde et al. 2012; Figura 2.7; ver

Materiales y Métodos). El decaimiento teórico es una función tetra-exponencial del tiempo en la cual la amplitud relativa de los cuatro componentes se relaciona con la constante de tiempo respectiva de acuerdo a la Ecuación 4 (Heyduk & Heyduk, 2001). El resultado es que el número de parámetros libres para realizar el ajuste es seis (Ecuación 8), que es el mismo número de parámetros libres que hay en la Ecuación 5. La ventaja de este método es que genera un mapa espacial de los cuatro dadores respecto de la posición del aceptor, entregando el mejor modelo geométrico que da cuenta de la cinética de emisión sensibilizada registrada experimentalmente, lo que se detalla a continuación en esta tesis.

Obtención de un mapa espacial de los dadores respecto al acceptor para las construcciones BK-LBT

Utilizando la metodología de análisis desarrollada en el laboratorio del Dr. Francisco Bezanilla de la Universidad de Chicago (Hyde et al. 2012; sección Materiales y Métodos) es posible ubicar en el espacio la posición relativa de los cuatro dadores respecto al acceptor suponiendo que éstos se encuentran en los vértices de un cuadrado paralelo al plano de la membrana celular. La resolución de esta metodología llega a 0.5\AA si la razón varianza/promedio del registro de emisión sensibilizada es menor a 2.5. El programa de análisis calcula esta razón ajustando una función multi-exponencial de seis componentes al registro del decaimiento de la fluorescencia en el tiempo, dividiendo el cuadrado del valor residual entre el valor experimental y el calculado para cada punto del registro y promediando los valores obtenidos de todo el registro (Hyde et al. 2012).

El programa entrega el mejor modelo geométrico que da cuenta de los registros de emisión sensibilizada. Para esto realiza un ajuste global a todos los trazos que se están analizando de una construcción en particular, por lo que la cantidad de trazos influye directamente en el tiempo que tarda el programa en encontrar un mínimo.

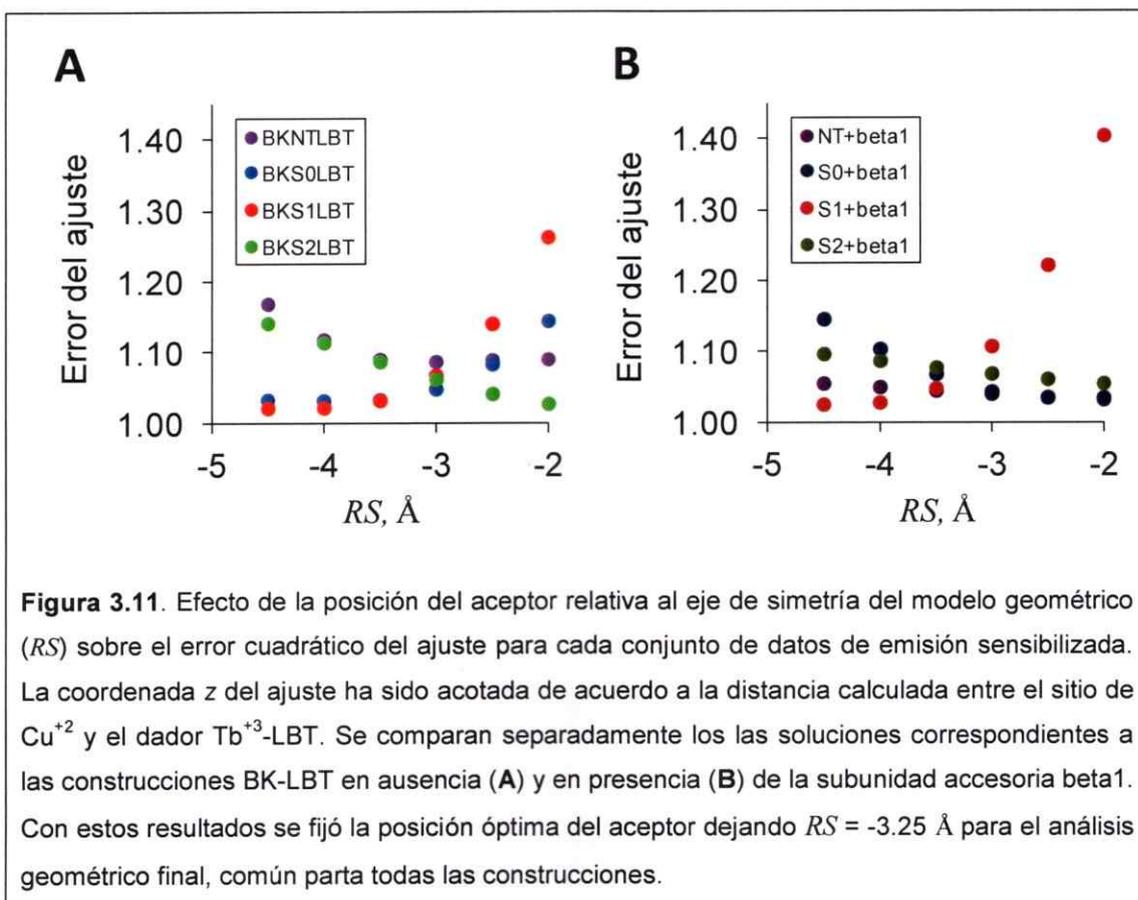
Para cada construcción BK-LBT se seleccionaron seis del total de registros de emisión sensibilizada de manera de que el tiempo de análisis fuera de alrededor de 30 minutos para cada conjunto de datos. La selección de los trazos fue de tal manera que se tuviera la mayor razón entre la amplitud de la señal de emisión sensibilizada y la del artefacto producido por el láser. El objetivo de esta selección es reducir la distorsión producida por el artefacto del láser en el modelo geométrico. La mayor razón varianza/promedio encontrada de todos los registros de emisión sensibilizada que se utilizaron fue de 0.97 lo que indica que la incerteza del resultado del análisis es menor

a 0.5 Å (Hyde et al. 2012). La rutina de ajuste entrega como resultado las coordenadas cilíndricas z , r y θ para la posición del dador 1, y el desplazamiento radial de la nube del aceptor RS (Figura 2.7) (Materiales y Métodos, Hyde et al. 2012).

Para que los mapas de posición de los dadores sean comparables entre distintas construcciones BK-LBT, es necesario que la posición del aceptor sea la misma para todos. Esto porque se supone que el inserto LBT no modifica la orientación en la que se une la toxina a la boca del poro ni la posición del fluoróforo BODIPY-FL. Para esto es necesario buscar la mejor posición del aceptor (RS) que da un ajuste satisfactorio para todos los set de datos.

Además se acotó la coordenada z a un intervalo que fue definido utilizando los resultados experimentales de LRET utilizando Cu^{+2} como aceptor. Se definió como límite superior el valor máximo de z que fue calculado al final de la sección "LRET entre el dador LBT- Tb^{+3} y el aceptor Cu^{+2} ". Como límite inferior de la coordenada z , se fijó 10 Å por debajo del límite superior para cada construcción, ya que este es el diámetro aproximado de la estructura del péptido LBT (Nitz et al. 2004; Hyde et al. 2012). Como no fue posible obtener una restricción del intervalo permitido en el eje z para la construcción BKNTLBT, se utilizó como límite inferior 15 Å por sobre el centro de la bicapa y como límite superior 40 Å.

Utilizando esta aproximación se llevó a cabo una búsqueda de la mejor posición del aceptor. Para esto se realizó el análisis fijando el valor de RS entre -2 Å y -4.5 Å en pasos de 0.5Å y se registró el valor del error cuadrático para cada valor de RS . Los resultados están en la Figura 3.11.



El criterio para elegir la posición óptima del aceptor es que el error de cada ajuste sea igual para todos los conjuntos de datos de manera de que la incerteza del ajuste sea igual entre ellos (comunicación personal con el Dr. H. Clark Hyde, Universidad de Chicago). Para las construcciones BK-LBT en ausencia de subunidad beta1 la posición óptima del aceptor corresponde a $RS = -3.5 \text{ \AA}$, mientras que para las construcciones co-expresadas con la subunidad beta1 la posición óptima se logra con $RS = -3 \text{ \AA}$ (Figura 3.11).

Se realizó el análisis final de todos los registros de emisión sensibilizada fijando la posición del aceptor en $RS = -3.25 \text{ \AA}$, ya que es el valor medio entre las posiciones óptimas del aceptor para los dos conjuntos de soluciones (en ausencia y en presencia

de la subunidad beta1). La tabla IV resume el resultado de este análisis geométrico realizado a todos los conjuntos de datos. El ajuste a los decaimientos de emisión sensibilizada fue realizado individualmente y no como un solo ajuste global para cada construcción de manera de tener valores promedio y desviación estándar de los promedios de los resultados del análisis geométrico.

El máximo error cuadrático promedio de los ajustes fue de 1.07. Esto indica que las soluciones son satisfactorias, ya que el criterio utilizado para calificar un ajuste como estadísticamente confiable es un error cuadrático menor que 1.1 (comunicación personal con el Dr. H. Clark Hyde, Universidad de Chicago; Hyde et al. 2012).

Tabla IV. Análisis geométrico de los registros de emisión sensibilizada

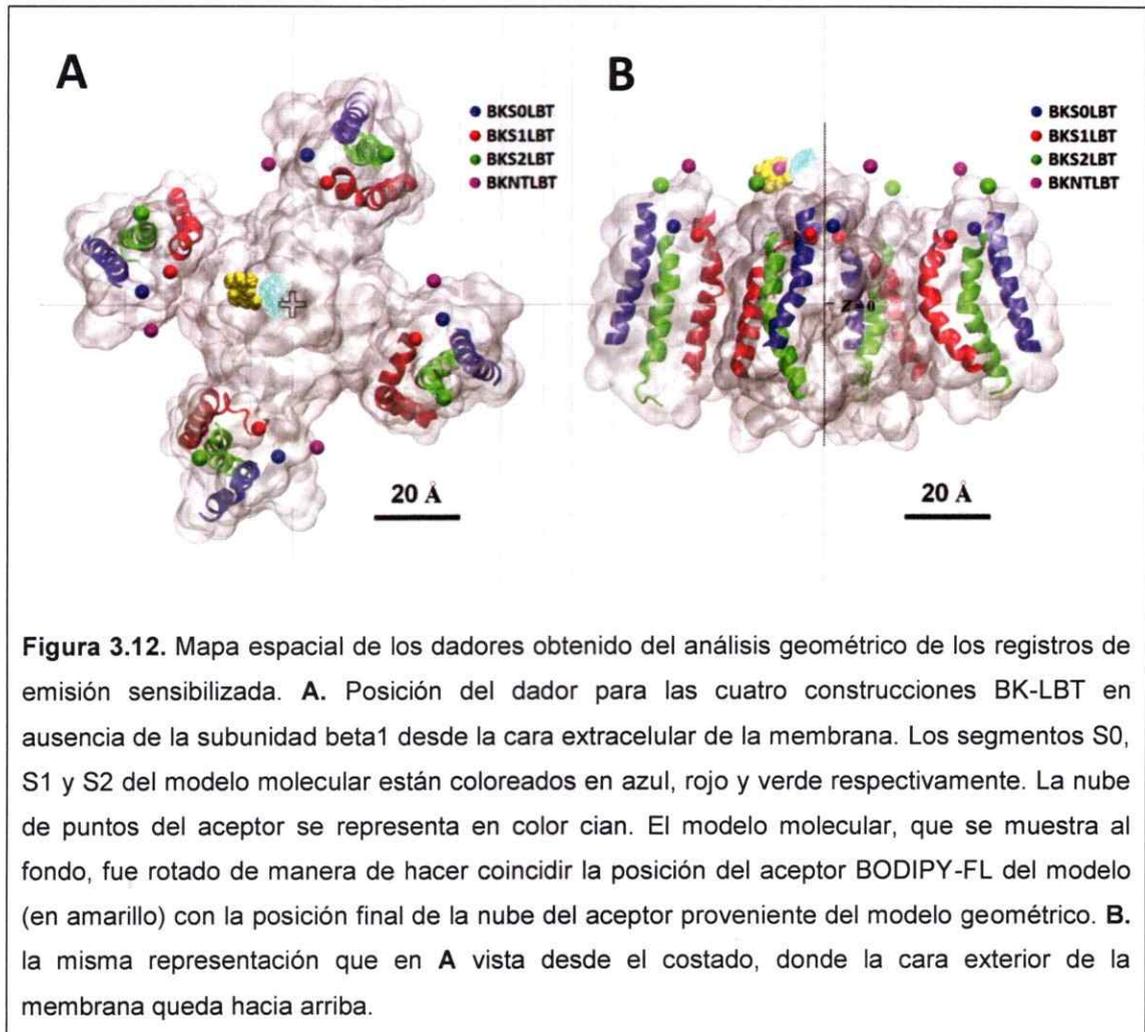
Construcción	θ °	r Å	z Å	<i>error del ajuste</i>
BKS0LBT	60.9 ± 10.6	36.2 ± 0.5	20.1 ± 1.1	1.03 ± 0.02
BKS1LBT	54.4 ± 5.1	30.4 ± 0.2	17.7 ± 0.0	1.04 ± 0.03
BKS2LBT	37.5 ± 1.6	42.4 ± 0.7	28.9 ± 0.5	1.07 ± 0.04
BKNTLBT	77.6 ± 5.7	33.2 ± 1.4	29.7 ± 6.0	1.05 ± 0.04
BKS0LBT+beta1	30.6 ± 4.7	40.6 ± 0.6	29.2 ± 1.9	1.06 ± 0.08
BKS1LBT+beta1	51.3 ± 2.8	31.7 ± 0.5	19.1 ± 0.7	1.05 ± 0.05
BKS2LBT+beta1	38.8 ± 1.2	44.6 ± 1.1	29.2 ± 1.2	1.06 ± 0.01
BKNTLBT+beta1	38.0 ± 3.2	44.8 ± 0.5	30.8 ± 1.6	1.05 ± 0.04

Se muestra el resultado del análisis geométrico de los registros de emisión sensibilizada según Hyde et al. (2012). El análisis se realizó sobre cada trazo de emisión sensibilizada utilizando las restricciones en la coordenada z de acuerdo a los experimentos utilizando Cu^{+2} como aceptor, y fijando $RS = -3.25$ Å. Están anotados los valores promedio ± error estándar de las coordenadas (z, r, θ) del modelo geométrico (Figura 2.6) que minimizan el error cuadrático entre el trazo de emisión sensibilizada y la Ecuación 8.

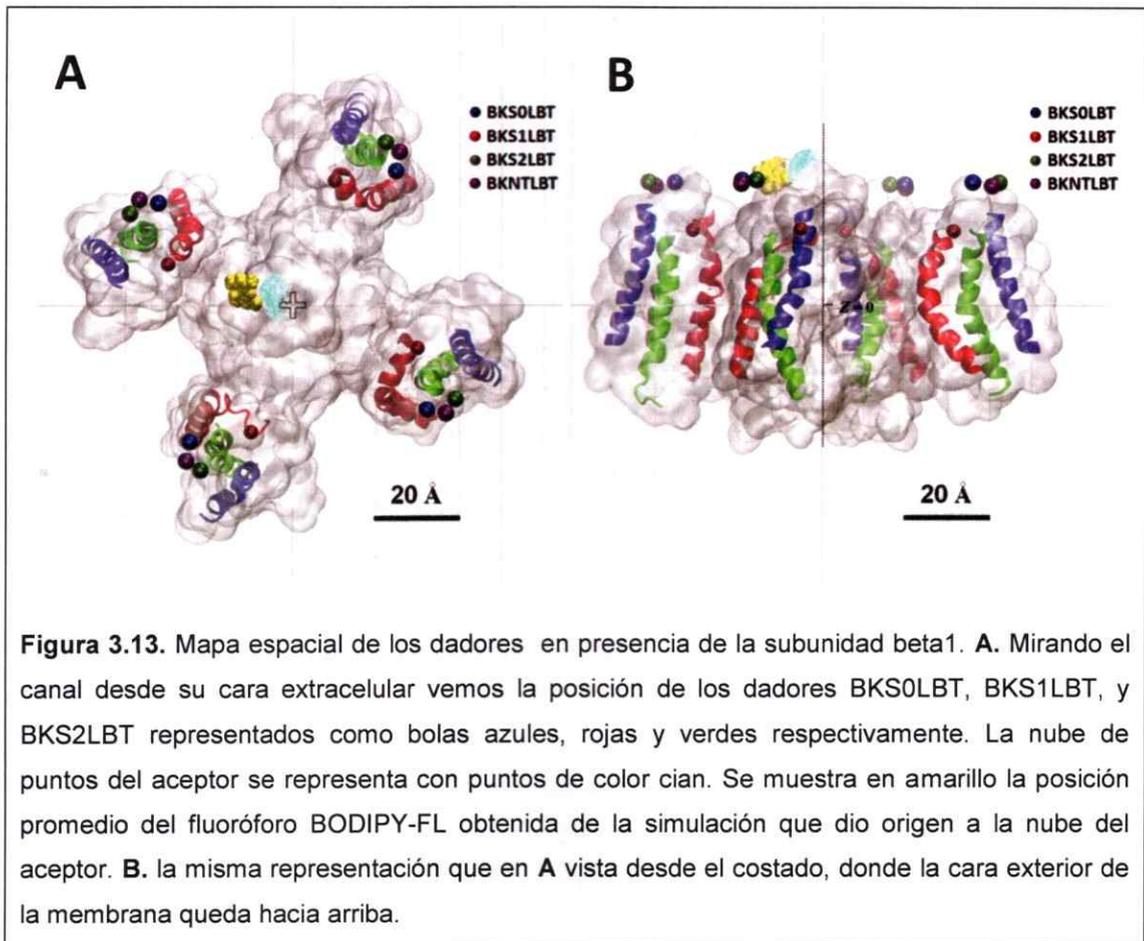
A partir de las tres coordenadas anotadas en la tabla IV se puede localizar la posición de cada dador respecto del aceptor para cada construcción BK-LBT. De esta manera se construyó un mapa espacial de los dadores en ausencia de la subunidad beta1 que muestro sobre una imagen del modelo molecular del BK del cual se obtuvo la nube de puntos del aceptor (Figura 3.12).

El modelo del BK fue rotado en torno al eje z de manera tal que la posición del fluoróforo BODIPY-FL (Figura 3.12, indicado en amarillo) quede alineada con la posición de la nube de puntos del aceptor (Figura 3.12, indicado en cian). Se puede observar que las posiciones de los dadores se ubican dentro de la estructura del dominio del sensor de voltaje y en las cercanías del borde superior del modelo molecular del BK (Figura 3.12). Los datos obtenidos del análisis geométrico muestran que la construcción BKS2LBT posee la mayor distancia entre el dador y el eje de simetría, mientras que la construcción BKS1LBT posee la más corta. Aunque la construcción BKNTLBT posee los decaimientos más rápidos de emisión sensibilizada, la distancia al eje de simetría se encuentra 3 Å más alejado que BKS1LBT, pero la coordenada z resulta mayor para BKNTLBT por lo que los dadores de esta estructura quedan más cercanos al plano donde se encuentra el aceptor. El ángulo relativo a la posición del aceptor es diferente en cada construcción por lo que las posiciones de los cuatro dadores están dispersas sobre el dominio sensor de voltaje.

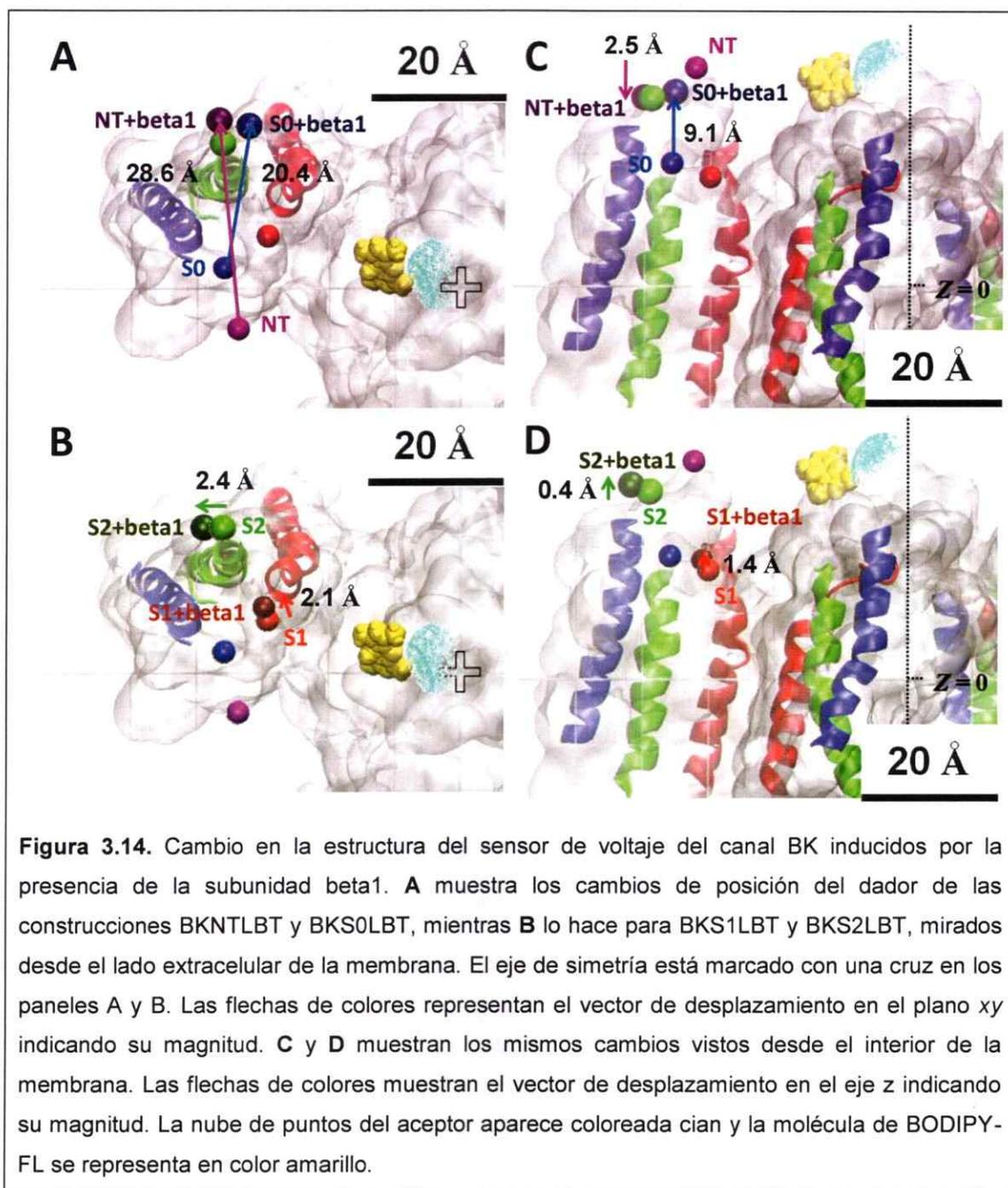
Se puede observar que los dadores para BKS1LBT y BKS2LBT coinciden con la posición de los segmentos de transmembrana correspondientes (Figura 3.12). Esto sugiere que la disposición de los segmentos S1 y S2 en el modelo molecular de BK es similar a la que se encuentra en el sensor de voltaje de la familia K_v .



Una vez obtenido el mapa geométrico para los cuatro dadores, es posible hacer este mismo cálculo con los datos obtenidos en presencia de la subunidad beta1. Este mapa espacial se muestra en la Figura 3.13. Al comparar las Figuras 3.12 y 3.13 es posible observar que la presencia de la subunidad beta1 altera la posición de los dadores respecto de la posición calculada en la ausencia de esta subunidad.



En la Figura 3.14 se detallan los cambios desde dos perspectivas distintas. Los paneles **A** y **B** detallan los cambios vistos desde el lado extracelular de la membrana. Las flechas de colores indican el vector de desplazamiento proyectado sobre el plano xy , que se calcula a partir de las coordenadas cilíndricas r y θ (Tabla IV). Las distancias indicadas representan la magnitud del vector de desplazamiento en ese plano. Al mismo tiempo los paneles **C** y **D** muestran los cambios desde la perspectiva del interior de la membrana indicando el desplazamiento vertical de las posiciones mostradas respecto al eje z . Las flechas de colores en estos paneles indican el vector de desplazamiento en ese eje.



El cambio de mayor magnitud en la posición del dador lo muestra la construcción BKNTLBT con un desplazamiento total de 28.7 Å, que consta de una rotación de 39.6 ° en sentido horario, un desplazamiento radial de 11.6 Å alejándose del eje de simetría

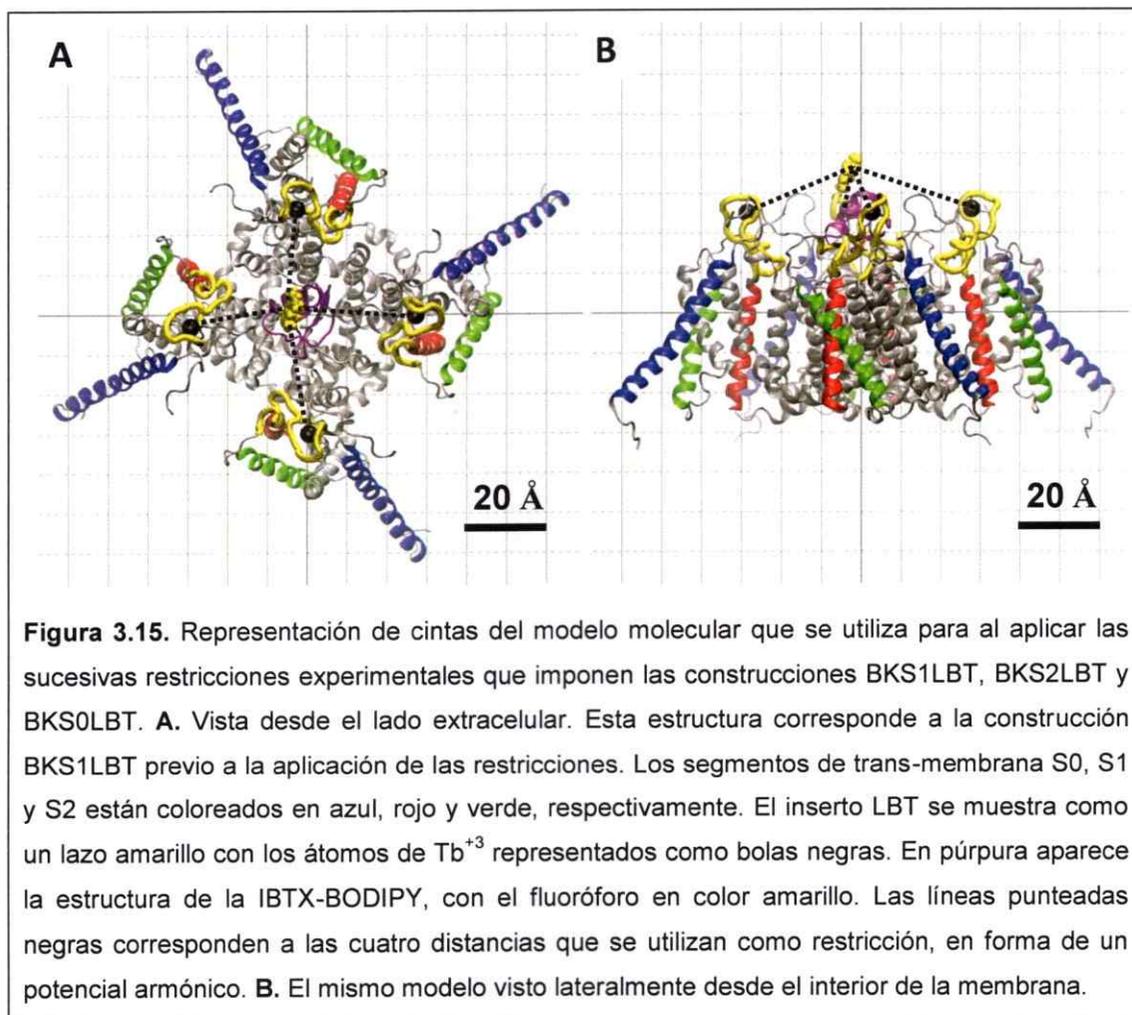
y en z un cambio de 2.5 Å hacia el lado intracelular. Este desplazamiento es seguido en magnitud por la construcción BKS0LBT con un desplazamiento total de 22.4 Å, que consta de una rotación de 30.2 ° en sentido horario, un desplazamiento radial de 4.4 Å alejándose del eje de simetría y un cambio en z de 9.1 Å hacia el lado extracelular. Esto deja estas dos posiciones cerca de donde se encuentra el dador en BKS2LBT.

Las construcciones BKS1LBT Y BKS2LBT mostraron un desplazamiento total de 2.5 Å y 2.4 Å respectivamente. El primero consta de una rotación de 3.1° en sentido anti-horario, un desplazamiento radial de 1.3 Å alejándose del eje z y vertical de 1.4 hacia el lado extracelular. El segundo muestra una rotación en sentido anti-horario de 1.3°, un desplazamiento radial de 2.2 Å alejándose del eje z .

Los resultados expuestos (Figura 3.14; Tabla VI) apuntan a que la subunidad beta1 efectivamente interactúa con el domino sensor de voltaje del canal BK, alterando su estructura. La magnitud del desplazamiento de la posición del dador en las construcciones BKS0LBT y BKNTLBT comparadas con las restantes construcciones sugiere que la subunidad beta1 interactúa directamente con el segmento S0.

Un modelo molecular refinado usando los resultados experimentales de LRET

Luego de tener una solución satisfactoria para las posiciones del dador en el caso de las tres construcciones BK-LBT, se utilizaron las cuatro distancias efectivas entre dadores y aceptor como restricción al realizar una dinámica molecular del modelo del canal BK. Para hacer efectivas las restricciones de distancia se insertó el motivo Tb^{+3} -LBT en la estructura modelada del canal BK (Figura 3.15). Durante la simulación, la restricción tiene forma de potencial armónico en tres dimensiones en torno a las cuatro distancias entre los dadores y el aceptor, calculadas de acuerdo a las coordenadas de la tabla IV.



El potencial armónico es aplicado entre los átomos de Tb^{+3} y el centro de masa del BODIPY. Se insertó solo un LBT por subunidad del canal para evitar problemas estéricos y además para ser consistentes con la estructura de las construcciones que se utilizaron en los experimentos. El protocolo que se utilizó para construir este modelo molecular refinado se encuentra detallado en la sección de **Materiales y Métodos**. El resultado final de estas simulaciones aparece en las Figuras 3.16 y 3.17

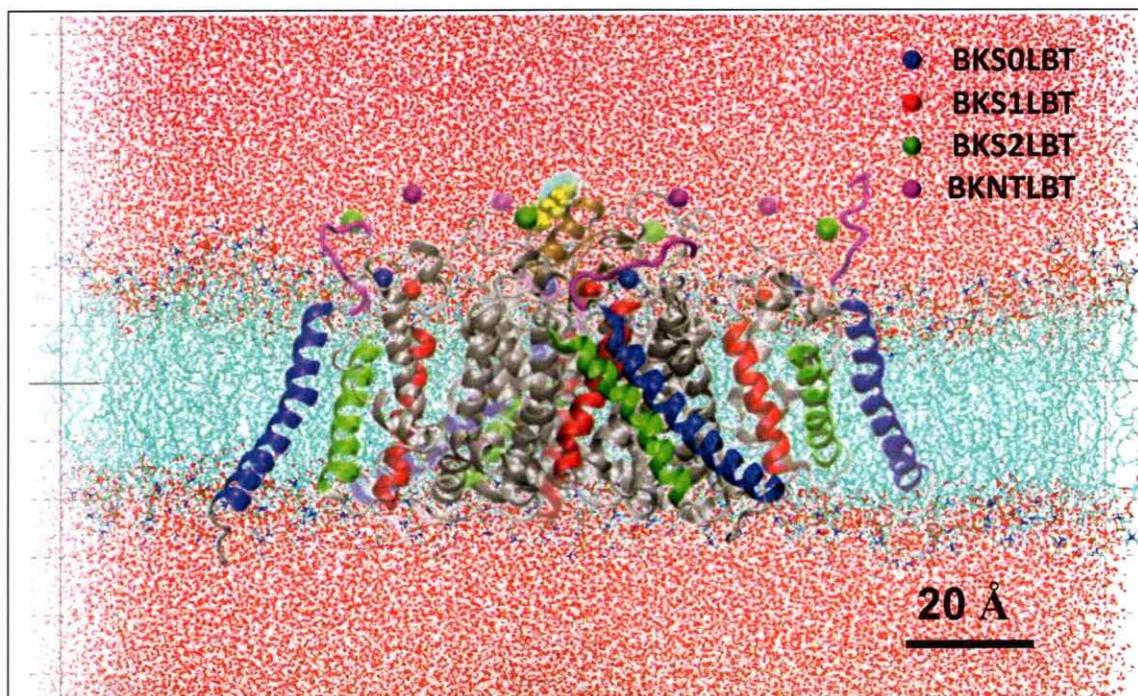
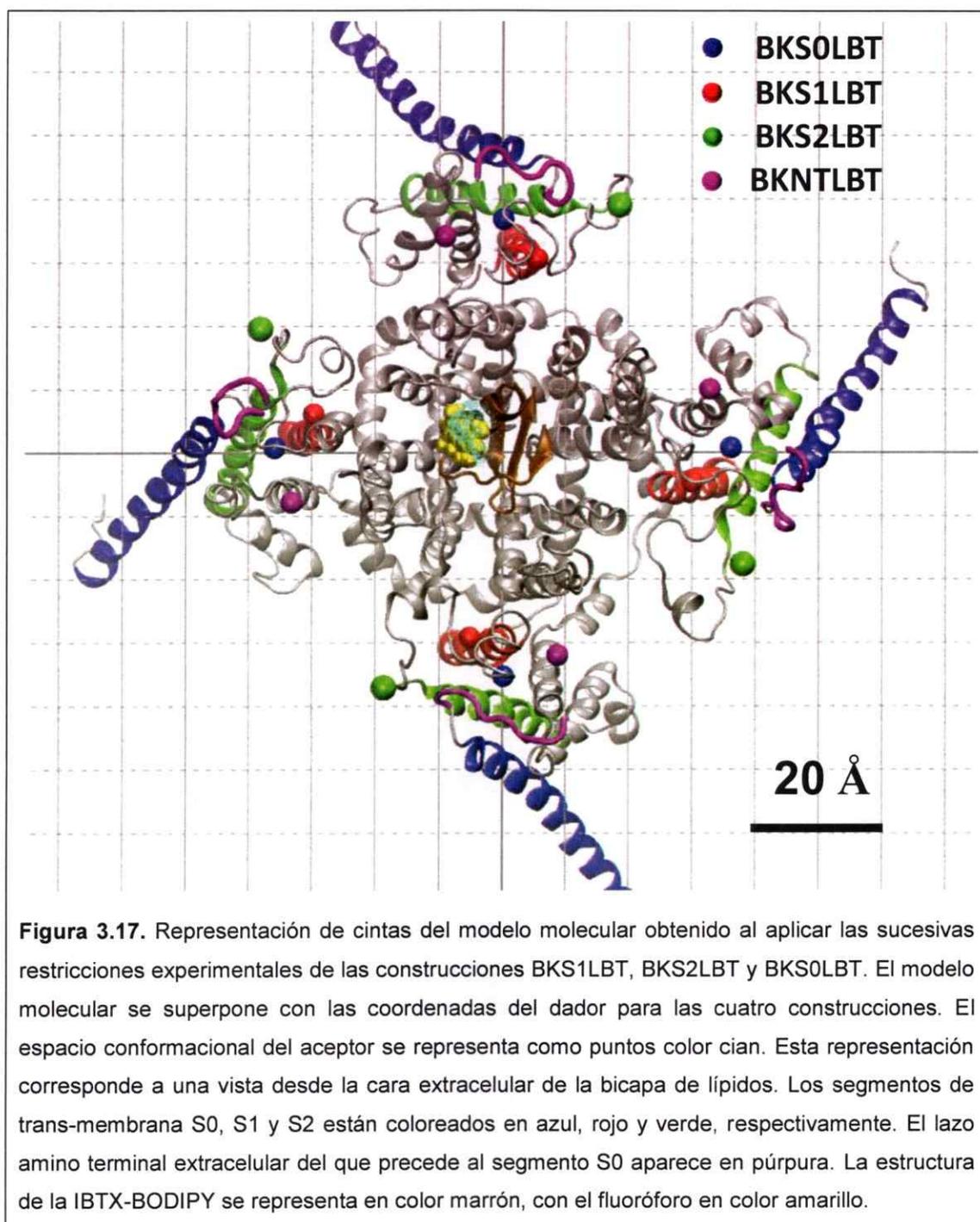


Figura 3.16. Representación de cintas del modelo molecular obtenido al aplicar las sucesivas restricciones experimentales de las construcciones BKS1LBT, BKS2LBT y BKS0LBT. El modelo molecular se superpone con las coordenadas del dador para las cuatro construcciones. El espacio conformacional del aceptor se representa como puntos color cian. Esta representación corresponde a una vista lateral desde el interior de la bicapa de lípidos. En puntos rojos se representan las moléculas de agua, mientras que en cian se muestran las cadenas alifáticas del POPC que forma la bicapa. Los segmentos de trans-membrana S0, S1 y S2 están coloreados en azul, rojo y verde, respectivamente. El lazo extracelular entre el extremo N-terminal y el segmento S0 aparece en púrpura. La estructura de la IBTX-BODIPY se representa en color marrón, con el fluoróforo en color amarillo



El modelo molecular resultante de las tres sucesivas simulaciones se sitúa correctamente en la bicapa de lípidos con las hélices alfa de los segmentos de trans-membrana embebidas completamente en la bicapa (Figura 3.16). El segmento S0, que fue modelado utilizando predicciones de estructura secundaria, tiene una longitud tal que para mantenerse dentro de la bicapa adopta una conformación inclinada. Al mismo tiempo esta inclinación lo pone en la periferia del dominio sensor de voltaje, mostrando pocos contactos en su parte cercana a la cara intracelular y otorgándole cierta libertad (Figura 3.15; Figura 3.16; Figura 3.17).

La disposición relativa de la parte superior de los segmentos de trans-membrana S0, S1 y S2 coinciden satisfactoriamente con la solución geométrica obtenida del análisis de los registros de emisión sensibilizada, donde se observa que la coordenada del modelo geométrico está dentro de un radio de 10 Å respecto de la parte superior de cada segmento (Figura 3.16; Figura 3.17). Esto es un resultado esperado ya que es ese precisamente el objetivo de aplicar las restricciones obtenidas del modelo geométrico experimental.

En el modelo estructural obtenido, las distancias aproximadas entre la parte superior de cada segmento de trans-membrana y el eje de simetría resultan ser de 45 Å para el segmento S0, 33 Å para el segmento S1 y 40 Å para el segmento S2. Este orden pone al segmento S2 más cercano del eje de simetría que el segmento S0, lo que no estaría de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos en esta tesis (Figura 3.12; Tabla IV). La explicación más probable para esta discrepancia es la relativa libertad que tiene el inserto LBT, el cual aparece más extendido que los 10 Å que se esperaban de la estructura cristalina (Nitz et al. 2004; Hyde et al. 2012), llegando a tener una distancia máxima de 15 Å entre el sitio de inserto y el átomo de Tb^{+3} (Figura 3.15). Dada la fuerza ejercida por las restricciones impuestas del modelo geométrico,

se observa que el segmento S2 se encuentra inclinado unos 30° pero esta inclinación es paralela al eje de simetría dejando este segmento apuntando hacia afuera del dominio sensor de voltaje, y por lo tanto la proyección del inserto LBT queda efectivamente más alejada del poro que el segmento mismo. Similarmente, la inclinación del segmento S0 es de manera tal que apunta hacia el eje de simetría y por lo tanto la proyección del inserto LBT queda más cercana del eje que la porción extracelular de este segmento. Finalmente el segmento S1 queda prácticamente paralelo al eje z y lógicamente la distancia entre este segmento y el eje de simetría es prácticamente idéntica a la distancia entre la posición proyectada del LBT y el eje z.

Es posible notar también que la simetría radial cuádruple se conserva lo que indica que tanto el dominio del poro como los cuatro dominios sensores de voltaje se encuentran en una conformación estable, pues la simulación final se llevó a cabo sin restricciones (Figura 3.17).

4. Discusión

Implementación de la técnica de LRET para describir la arquitectura del canal BK

Se propuso utilizar la interacción LRET como herramienta para describir de manera cuantitativa la arquitectura del canal BK, por sus diversas ventajas y poder de resolución (Selvin, 2002; Sandtner et al. 2007; Hyde et al. 2012). Como dador de LRET se utilizó el ion fluorescente Tb^{+3} unido a la secuencia peptídica LBT (MacNaus et al. 1990; Franz et al. 2003; Nitz et al. 2003; Nitz et al, 2004; Sculimbrene & Imperiali, 2006), que fue introducida en cuatro posiciones del dominio sensor de voltaje del canal BK, dando origen a construcciones funcionales que mostraron curvas de activación (G/V) similares a al canal silvestre. El decaimiento de la fluorescencia del dador para las cuatro construcciones fue de alrededor de 2.45 ms, lo que es indicativo de que el LBT está correctamente plegado (Nitz et al. 2004; Sandtner et al 2007). Con esta perspectiva, el uso de las construcciones BK-LBT para inferir la estructura del canal BK se puede considerar válida. Como aceptores de la interacción LRET se utilizaron el metal Cu^{+2} y el fluoróforo BODIPY-FL. La justificación para el uso de estos dos aceptores distintos es que el valor de R_0 es distinto, de 20 y 43 Å respectivamente lo que permite hacer mediciones intra-moleculares a distintas escalas.

Al utilizar el Cu^{+2} como aceptor se observó interacción LRET en tres de las construcciones BK-LBT mostrando tiempos de vida del dador en presencia del aceptor que fueron de los 0.98 ms a los 1.37 ms en ausencia de la subunidad beta1. Las distancias calculadas usando la Ecuación 7 con $\tau_D = 2.45$ ms y $R_0 = 20$ Å, entre el sitio de Cu^{+2} y el dador Tb^{+3} -LBT fueron de entre 18.7 y 20.7 Å. Ya que la magnitud de las distancias calculadas son muy cercanas al valor de R_0 estas se puede considerar confiables, y cumplen a su vez con la expectativa de que el LBT se encuentre justo por

encima del dominio sensor de voltaje, que tendría al Cu^{+2} en su seno, de acuerdo a los especulado en Ma et al. (2008).

Al utilizar como aceptor de LRET la IBTX-BODIPY fue posible observar la aparición de señales robustas de emisión sensibilizada, tal como ha sido reportado en publicaciones anteriores que siguieron esta estrategia (Posson et al. 2005; Posson & Selvin; 2008; Hyde et al. 2012). A diferencia de los experimentos utilizando Cu^{+2} como aceptor, los registros de emisión sensibilizada mostraron marcadas diferencias en la cinética de su decaimiento, para las distintas posiciones de los dadores indicando que se encuentran a distintas distancias del aceptor, el cual se encuentra cerca de poro del canal. Además los decaimientos de emisión sensibilizada poseen más de un tiempo de vida, indicando que el aceptor BODIPY-FL se encuentra fuera del eje de simetría. Esto permite la construcción de un mapa tridimensional de los cuatro dadores con respecto a la posición del aceptor (Posson et al. 2005; Posson & Selvin, 2008; Hyde et al. 2012).

Al co-exresar el canal BK con la subunidad beta1 ocurrieron ligeros cambios de distancia entre el sitio de Cu^{+2} del sensor de voltaje y los dadores para tres de las cuatro construcciones BK-LBT, mientras que el aceptor BODIPY-FL mostró que ocurren desplazamientos de alrededor de 25 Å para las construcciones BKNTLBT Y BKNS0LBT. Esto sugiere que la subunidad beta1 promueve una re-ubicación del segmento S0. Para conciliar los datos de ambas aproximaciones experimentales, esta re-ubicación ocurriría principalmente en el plano de la membrana sin involucrar movimientos verticales del segmento S0. Aunque los mapas espaciales obtenidos del análisis de los registros de emisión sensibilizada muestran que sí ocurriría un desplazamiento vertical del segmento S0, por lo que se necesita experimentos complementarios para poder resolver esta aparente contradicción.

La arquitectura del canal BK

El canal BK posee siete segmentos de trans-membrana, teniendo seis segmentos homólogos a los que se encuentran en la familia de canales K_v , de los cuales se conoce la estructura molecular obtenida por cristalografía de rayos X (Jiang et al. 2003; Long et al. 2005; Long et al. 2007). Esto significa que la posición exacta del segmento S0 no puede ser deducida por homología.

La estructura del BK fue obtenida a una resolución de 17 Å por crio-microscopía (Wang & Sigworth, 2009) y no tiene el suficiente detalle como para determinar con precisión la ubicación de los segmentos de trans-membrana (Figura 4.1).

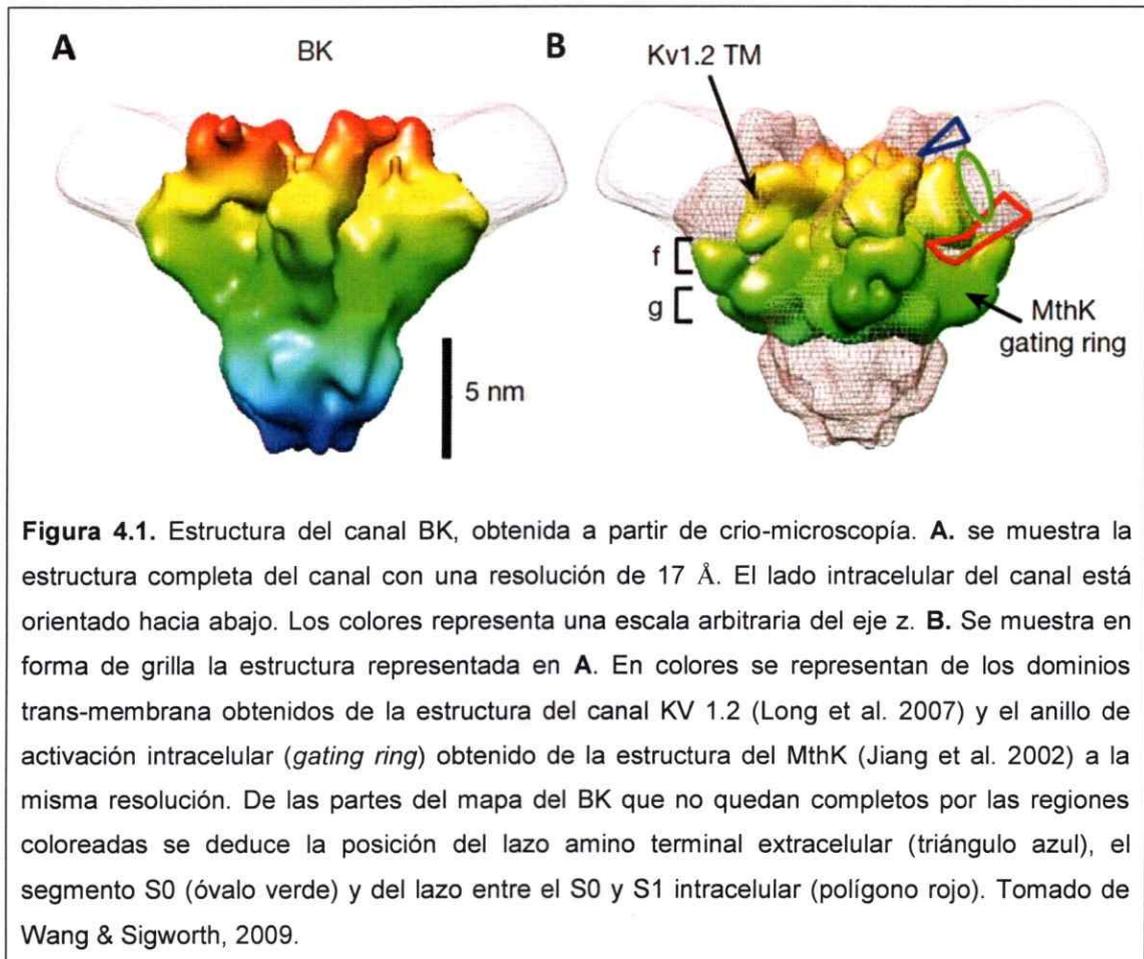


Figura 4.1. Estructura del canal BK, obtenida a partir de crio-microscopía. **A.** se muestra la estructura completa del canal con una resolución de 17 Å. El lado intracelular del canal está orientado hacia abajo. Los colores representa una escala arbitraria del eje z. **B.** Se muestra en forma de grilla la estructura representada en **A.** En colores se representan de los dominios trans-membrana obtenidos de la estructura del canal KV 1.2 (Long et al. 2007) y el anillo de activación intracelular (*gating ring*) obtenido de la estructura del MthK (Jiang et al. 2002) a la misma resolución. De las partes del mapa del BK que no quedan completos por las regiones coloreadas se deduce la posición del lazo amino terminal extracelular (triángulo azul), el segmento S0 (óvalo verde) y del lazo entre el S0 y S1 intracelular (polígono rojo). Tomado de Wang & Sigworth, 2009.

Se ha sugerido que la gran protrusión observada en la periferia del dominio sensor de voltaje podría corresponder al lazo amino terminal extracelular que está unido al segmento S0. Esto ubicaría al segmento S0 a unos 40 Å del eje de simetría.

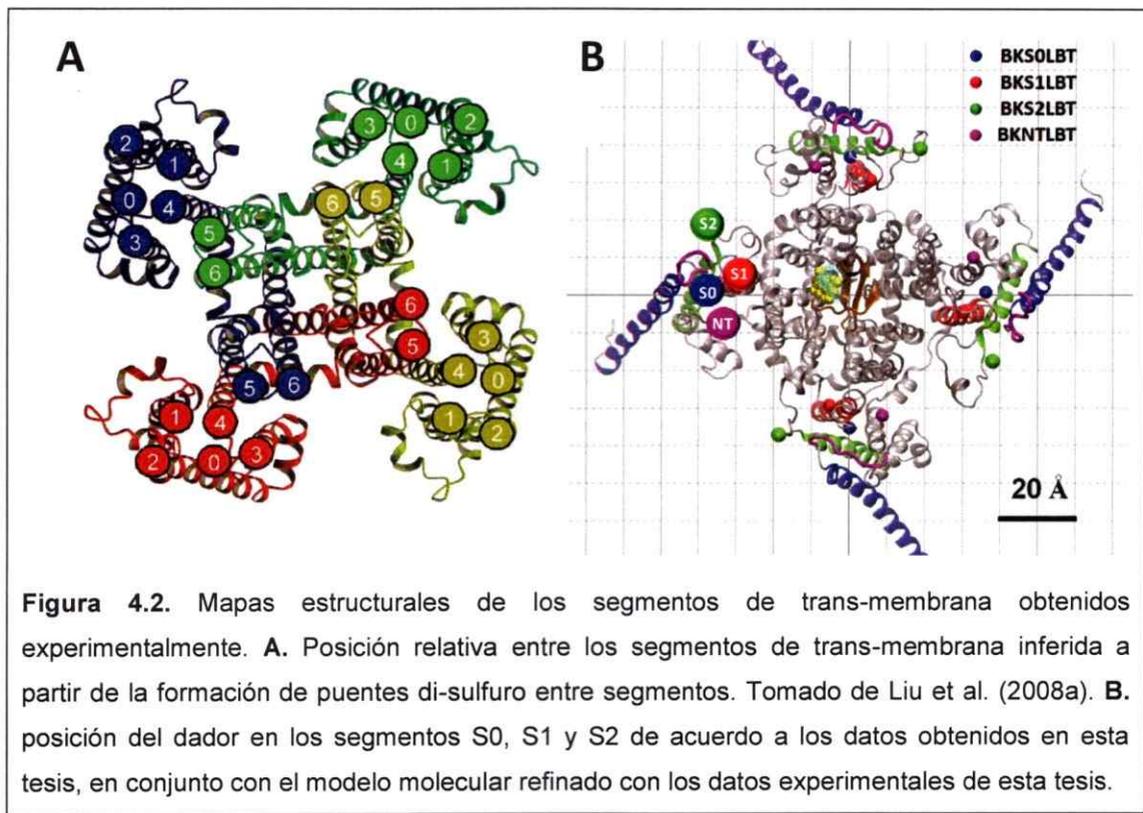
Otra pista acerca de la posición del segmento S0 respecto de los otros 6 segmentos ha sido obtenida utilizando entrecruzamiento entre residuos de cisteínas (Liu et al. 2008a).

En este reporte se posiciona el segmento S0 principalmente en las cercanías del lazo que une los segmentos S3 y S4, teniendo menos contacto con los segmentos S1 y S2, y ningún contacto con los segmentos S5 y S6.

Sobre la base de la estructura del canal $K_v1.2/2.1$ (Long et al. 2005; Long et al. 2007) se infirió que el segmento S0 quedaría en la periferia del sensor de voltaje con los segmentos S3 y S4 rodeando el flanco del segmento S0 que enfrenta al eje de simetría. Los segmentos S1 y S2 estarían un relativamente más alejados del segmento S0 (Figura 4.2A).

Los resultados presentados en esta tesis apoyan también la hipótesis de que el segmento S0 se encuentra en la periferia del dominio sensor de voltaje (Figura 3.12; Figura 3.16; Figura 4.2B) tal como han sugerido los experimentos de *crosslinking* (Liu et al. 2008a) y la estructura obtenida con crio-microscopía (Wang & Sigworth, 2009). Utilizando la interacción LRET como una regla espectroscópica podemos afirmar que el segmento S0 se encuentra a 36.2 Å del eje de simetría, lo que concuerda con la estimación obtenida de la estructura de crio-microscopía.

También se observa que la disposición relativa de los segmentos S1 y S2 coincide con la inferida de los experimentos de *crosslinking*, disposición que se deduce suponiendo que el dominio sensor de voltaje es similar al de la estructura obtenida por cristalografía del $K_v1.2/2.1$.

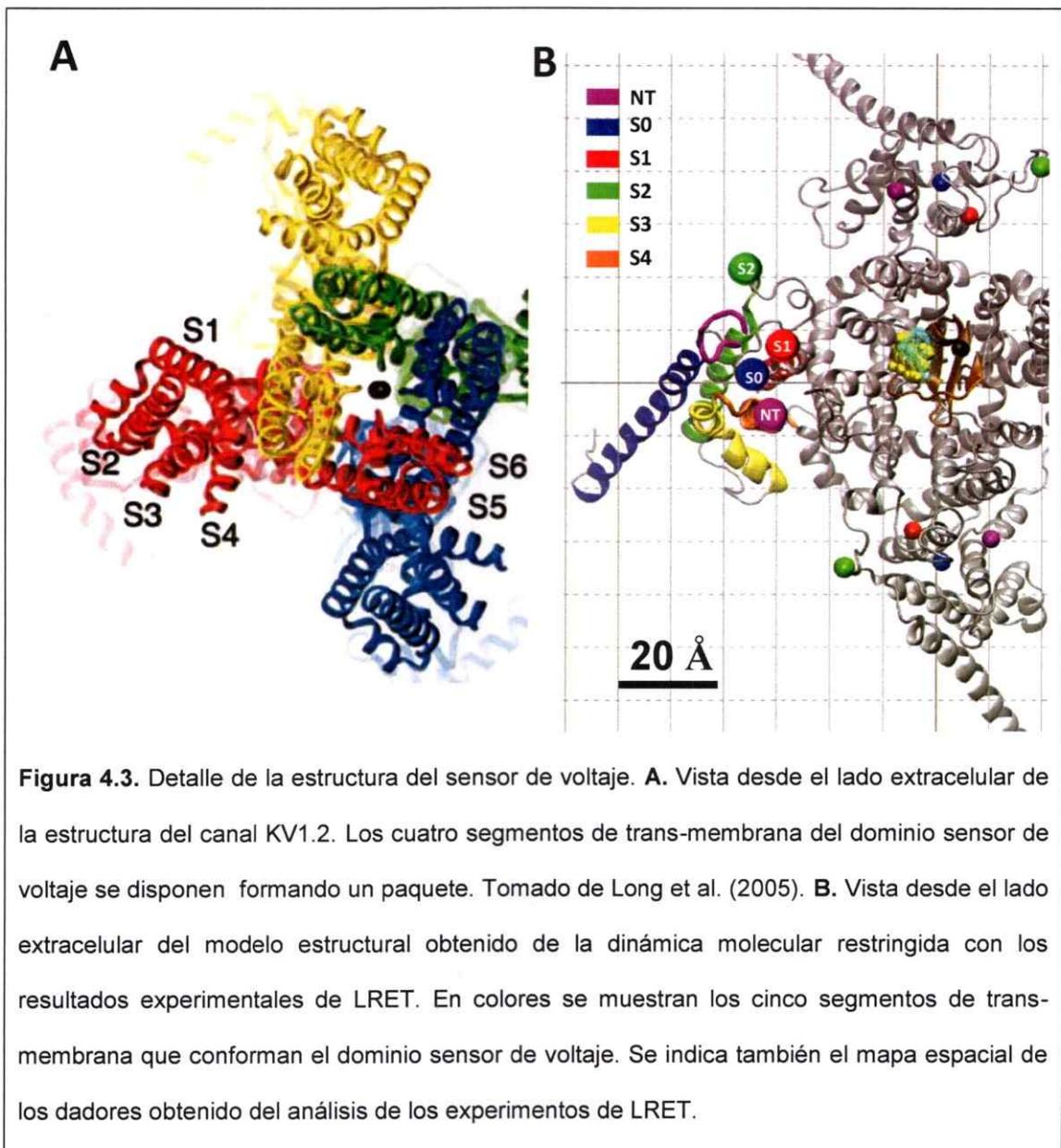


Al mismo tiempo el dador del segmento S0 se encuentra a 8.7 Å del dador del segmento S1 y a 21.3 Å del dador del segmento S2. La formación de puentes di-sulfuro es posible entre residuos que se encuentran hasta 15 Å de distancia en la estructura cristalina (Careaga & Falke, 1992; Butler & Falke, 1996), por lo que de acuerdo a los resultados presentados en esta tesis la formación de puentes di-sulfuro entre S0 y los segmentos S1 y S2 sería plausible, tomando en cuenta que la estructura del LBT tiene un diámetro aproximado de 10 Å (Nitz et al. 2004).

No obstante la alta resolución de la técnica de LRET, el trabajo desarrollado en esta tesis solo permitió encontrar la posición de cuatro puntos de la estructura del sensor de voltaje del canal BK, dejando sin conocer la posición de los segmentos S3 y S4. En el sensor de voltaje de los canales K_v , los segmentos S3 y S4 están en contacto con los

segmentos S1 y S2, formando una especie de paquete (Jiang et al. 2003; Long et al. 2005; Long et al. 2007; Figura 4.3A). Esta disposición es funcionalmente muy importante pues se ha demostrado la exquisita especificidad en la posición de los residuos cargados que atraviesan el campo (Ahern & Horn, 2004; Gonzalez-Perez et al. 2010). Esto indica que las cargas móviles (las cuales están en el segmento S4 en los canales K_v) necesitan de la interacción específica con cadenas laterales de los otros segmentos para atravesar el campo. Por lo tanto en el módulo sensor de voltaje del BK la cercanía de los segmentos S2, S3 y S4 se haría necesaria, ya que estos son los que llevan las cargas que atraviesan en campo eléctrico (Diaz et al. 1998; Ma et al. 2006). El modelo molecular refinado que fue obtenido en esta tesis muestra que estos segmentos están separados por una distancia máxima aproximada de 20 Å (Figura 4.3B).

Existe evidencia experimental de que el segmento S0 regula el equilibrio entre las conformaciones de reposo y activa del sensor, ya que mutaciones en este segmento desplazan el $V_{1/2}$ de la curva G/V decenas de milivoltios (Koval et al. 2007). La cercanía del segmento S0 con el resto del dominio sensor de voltaje, propuesta tanto en la literatura como por los resultados de esta tesis, permitiría la interacción entre el segmento S0 con al menos uno de los segmentos de trans-membrana que portan los residuos cargados, S2, S3 y S4 (Diaz et al. 1998; Ma et al. 2006).



Se ha sugerido que en la conformación de reposo del dominio sensor de voltaje, el extremo amino terminal del segmento S0 estaría relativamente próximo al pequeño lazo extracelular que une los segmentos S3 y S4, ya que el residuo W203 del segmento S4 es capaz de apagar la fluorescencia al marcar las posiciones G18 y R20 del segmento S0 con el fluoróforo TAMRA (Pantazis et al. 2010b). El apagamiento de

la fluorescencia en este reporte correspondería a una transferencia electrónica entre el triptófano y el estado excitado del fluoróforo, interacción que ocurre a una distancia de $\sim 10 \text{ \AA}$ (Mansoor et al. 2002; Islas & Zagotta, 2006). Utilizando la misma estrategia, se demostró que el residuo W203 apaga la fluorescencia del TAMRA en las posiciones S135 y Y145 que se sitúan en la parte extracelular de los segmentos S1 y S2 respectivamente (Pantazis & Olcese, 2012), muy cerca de donde se insertó el motivo LBT para los experimentos de LRET. Esto por lo tanto apunta a que los segmentos S3 y S4 (unidos por un pequeño lazo) se encontrarían a unos 10 \AA de los otros tres segmentos del dominio sensor de voltaje. Esto pone al lazo S3-S4 en una posición central respecto los tres dadores (S0, S1, S2) en el mapa experimental y por lo tanto ni el modelo refinado en esta tesis ni el inferido de los experimentos de *crosslinking* dan cuenta de los resultados experimentales obtenidos con apagamiento de fluorescencia (Pantazis et al. 2010b; Pantazis & Olcese, 2012). En este último reporte se comprobó también que al introducir un residuo de triptófano en la posición S141 (cercano al segmento S1) apaga la fluorescencia del TAMRA en la posición S135, pero en el estado activado del sensor de voltaje. Por lo tanto en estado de reposo el segmento S2 se encontraría a una distancia mayor de 10 \AA del segmento S1, resultado que está de acuerdo con el mapa experimental obtenido de los experimentos de LRET (Figura 4.3).

Los cambios de conformación del dominio sensor de voltaje

Uno de los objetivos principales de esta tesis es describir cuantitativamente los cambios de conformación que sufre el sensor de voltaje del canal BK. Existe información de que los segmentos S0 a S4 actúan como un módulo sensor de voltaje (Diaz et al. 1998; Ma et al 2006, Koval et al. 2007), similar al que se encuentra en la familia de canales dependientes de voltaje K_v . Este módulo sufriría cambios de

conformación al ser activado por la diferencia de potencial eléctrico de la membrana. La existencia de re-arreglos estructurales en esta parte del canal ha sido sugerida y demostrada con anterioridad, utilizando variadas herramientas, tales como electrofisiología y fluorescencia (Stefani et al. 1997; Horrigan & Aldrich, 2002; Savalli et al. 2006; Pantazis et al. 2010a; Pantazis et al. 2010b; Pantazis & Olcese, 2012; Contreras et al. 2012). Las ventajas que tiene la técnica de LRET para calcular distancias intermoleculares la convierten a priori en una atractiva herramienta para describir más detalladamente los cambios en la estructura del dominio sensor de voltaje (Selvin, 2002; Posson et al. 2005; Sandtner et al. 2007; Posson & Selvin; 2008; Hyde et al. 2012).

Utilizando la técnica de *voltage clamp* de dos micro-electrodos (*TEV*), se aplicó un pulso de 200 mV al ovocito mientras se registraba el decaimiento de la fluorescencia. El resultado experimental es que no se detecta un cambio en la cinética del decaimiento del dador en presencia del aceptor Cu^{+2} ni de la emisión sensibilizada del aceptor BODIPY-FL al despolarizar la membrana. La corriente total de los ovocitos durante el pulso de voltaje fue del orden de cientos de microamperios (aun cuando existe un bloqueo del 95% de la corriente cuando se utiliza la IBTX-BODIPY). Esto provoca una pérdida de control sobre el voltaje en el punto de detección de la fluorescencia respecto del voltaje al que se está fijando el ovocito (Baumgartner et al. 1999). Por esta razón es lógico pensar que en estas condiciones no se logró perturbar la conformación del sensor de voltaje en el punto donde se mide la señal de fluorescencia. La explicación de por qué en el caso del canal Shaker estos cambios de conformación si se han podido detectar es básicamente porque la conductancia de Shaker es 20 veces menor que la del canal BK (comparar Iverson et al. 1988 con Latorre et al. 1982) y además el $V_{1/2}$ de la curva Q/V es de -40 mV (Schoppa et al.

1992; Seoh et al. 1996; Aggarwal & MacKinnon, 1996), por lo que la corriente total del ovocito es considerablemente más pequeña asegurando el control de voltaje en el punto de colección de luz.

En esta tesis no se estudió una posible estrategia para atacar el problema descrito anteriormente, por lo que esta interrogante queda abierta hasta que se encuentre una alternativa para asegurar el control de voltaje en el punto de colección de luz ya sea modificando la técnica de *voltage clamp* o bien encontrar una manera de disminuir la corriente iónica.

Por otro lado está documentado que la subunidad beta1 produce cambios funcionales en el BK (Dworetzky et al. 1996; Orio et al. 2002; Orio et al. 2006; Contreras et al. 2012). Esta subunidad consiste en dos segmentos trans-membrana unidos por un lazo extracelular (Knauss et al. 1994) y su presencia aumenta la sensibilidad aparente a Ca^{+2} , enlentece la cinética de activación y de-activación y también produce una aparente disminución en la carga asociada a la apertura (Wallner et al. 1996; Dworetzky et al. 1996; Meera et al. 1996; Cox and Aldrich, 2000; Nimigeon and Magleby, 2000; Bao and Cox, 2005; Orio and Latorre, 2005). La evidencia experimental ha propuesto que esta subunidad estaría afectando directamente la operación del sensor de voltaje del canal BK (Bao and Cox, 2005; Orio and Latorre, 2005; Contreras et al. 2012). Además se tiene evidencia de que el segmento S0 y el extremo amino terminal extracelular son necesarios para observar el efecto de la subunidad beta1 (Wallner et al. 1996; Morrow et al. 2006), por lo que es posible suponer que existe cercanía entre el segmento S0 y alguna parte de la estructura de la subunidad beta1.

Evidencia estructural de la interacción entre el segmento S0 con la subunidad beta1 fue obtenida haciendo experimentos de *crosslinking* entre residuos de cisteína introducidos en distintas posiciones de las subunidades alfa y beta1 (Liu et al. 2008b;

Liu et al. 2010). Usando esta última aproximación se determinó que el segmento TM1 de la subunidad beta1 está relativamente cercano a los segmentos S1 y S2, teniendo poco contacto con el segmento S0 y ninguno con el lazo S3-S4. Al mismo tiempo el segmento TM2 muestra que solo está en contacto con el segmento S0. Un resultado interesante es que los segmentos TM1 y TM2 de la subunidad beta1 aparecen anclados a dominios sensores de voltaje de dos subunidades adyacentes (Figura 4.4). Los resultados experimentales presentados en esta tesis muestran que efectivamente ocurre un cambio estructural del dominio sensor de voltaje cuando hay interacción con la subunidad beta1. De acuerdo al mapa experimental obtenido, la posición del segmento S0 y del extremo amino terminal extracelular son las partes del sensor de voltaje que más se desplazan frente a la presencia de la subunidad beta 1 (Figura 4.4). Esto sugiere fuertemente que la subunidad beta1 se ancla al dominio sensor de voltaje interactuando directamente con el segmento S0, lo que es consistente con los reportes que fueron mencionados (Wallner et al. 1996; Liu et al. 2008b; Liu et al. 2010).

En colaboración con el grupo del Dr. Francisco Bezanilla se ha logrado obtener señales emisión sensibilizada insertando la secuencia LBT en las cercanías de los segmentos de trans-membrana TM1 y TM2 de la subunidad beta1. Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Jorge Sanchez-Rodriguez en el laboratorio del Dr. Bezanilla, y el resultado del análisis de los decaimientos de emisión sensibilizada se muestra en el contexto de los resultados obtenidos en esta tesis (Figura 4.4).

Los mapas espaciales generados por ambas aproximaciones (*crosslinking* y LRET) son conciliables en ausencia de la subunidad beta1, ya que las posiciones relativas de los segmentos S0, S1 y S2 muestran una disposición similar (Figura 4.4, A y C).

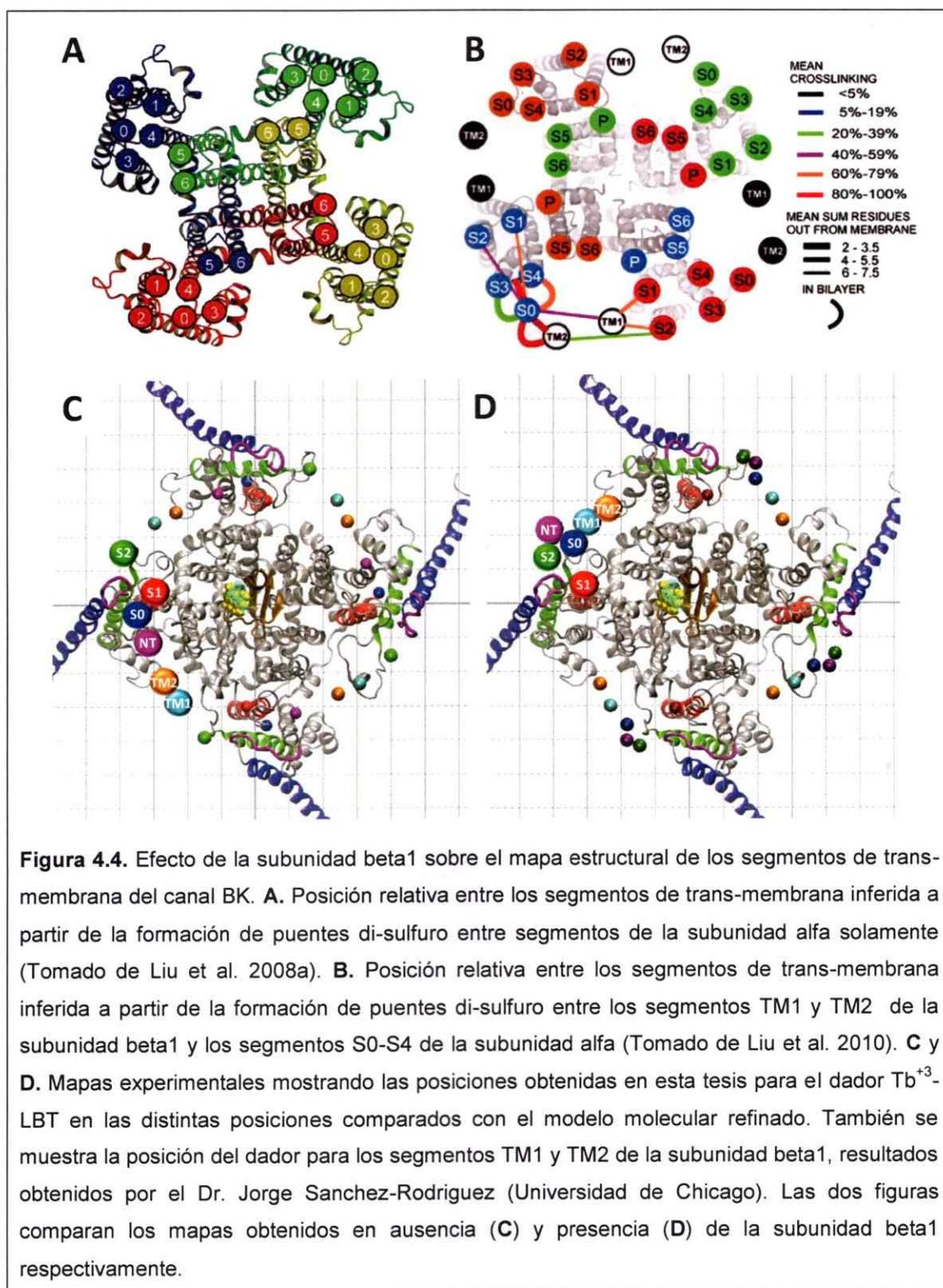


Figura 4.4. Efecto de la subunidad beta1 sobre el mapa estructural de los segmentos de transmembrana del canal BK. **A.** Posición relativa entre los segmentos de transmembrana inferida a partir de la formación de puentes di-sulfuro entre segmentos de la subunidad alfa solamente (Tomado de Liu et al. 2008a). **B.** Posición relativa entre los segmentos de transmembrana inferida a partir de la formación de puentes di-sulfuro entre los segmentos TM1 y TM2 de la subunidad beta1 y los segmentos S0-S4 de la subunidad alfa (Tomado de Liu et al. 2010). **C** y **D.** Mapas experimentales mostrando las posiciones obtenidas en esta tesis para el dador Tb^{+3} -LBT en las distintas posiciones comparados con el modelo molecular refinado. También se muestra la posición del dador para los segmentos TM1 y TM2 de la subunidad beta1, resultados obtenidos por el Dr. Jorge Sanchez-Rodriguez (Universidad de Chicago). Las dos figuras comparan los mapas obtenidos en ausencia (**C**) y presencia (**D**) de la subunidad beta1 respectivamente.

Por otro lado los mapas espaciales generados en presencia de la subunidad beta1 presentan una diferencia notable que hace que estos no sean conciliables fácilmente: los datos de emisión sensibilizada muestran que el segmento S0 se acerca a la posición del segmento S2, mientras que la disposición de los segmentos de transmembrana inferida a partir de los experimentos de *crosslinking* no muestran esta cercanía. La justificación para esta disposición descansa sobre la base del alto porcentaje de entrecruzamiento entre el segmento S0 y el TM2, y el hecho de que tanto TM1 como TM2 son pueden entrecruzarse con dos subunidades alfa adyacentes (Figura 4.4B).

Los experimentos de LRET también sugieren que ambos segmentos de transmembrana de la subunidad beta1 se encuentran flaqueados por subunidades alfa adyacentes (Figura 4.4D), pero con la diferencia de que el segmento TM1 resulta más cercano al segmento S0. El mapa espacial obtenido de los experimentos de LRET sugiere que es el segmento TM1 el que se ancla al segmento S0, produciendo el gran desplazamiento observado en este último. El sutil cambio de posición (solo un par de angstroms) de los segmentos S1 y S2 ante la presencia de la subunidad beta1 no descarta la posibilidad de que estos pudiesen estar interactuando directamente con alguna parte de la subunidad beta1, ya que los experimentos de *crosslinking* muestran que ambos segmentos pueden formar puentes di-sulfuro con el segmento TM1 de la subunidad beta1.

Es importante recordar que los mapas espaciales obtenidos de los experimentos de LRET son generados a partir de registros de fluorescencia que provienen de una preparación *in vivo*, de canales funcionales y que se construyen a partir de medidas de distancia que son calculadas con gran precisión (Selvin, 2002; Hyde et al. 2012).

Por otro lado, a pesar de que la distancia entre los átomos de azufre en un puente di-sulfuro es de solo 3 Å se ha reportado la formación de este enlace entre residuos que se encuentran a 15 Å de distancia (Careaga & Falke, 1992; Butler & Falke, 1996). Tomando en cuenta este antecedente, podemos pensar que el porcentaje de puentes di-sulfuro formados no es una medida directa de la distancia entre residuos, además de las distorsiones que puede ocasionar el tratamiento necesario para lograr la formación de los enlaces di-sulfuro y su posterior detección y cuantificación (Lui et al. 2008a; Lui et al. 2008b; Liu et al. 2010).

No obstante la cercanía entre el segmento S0 y la subunidad beta1 es apoyada por diversas evidencias experimentales (Wallner et al. 1996; Morrow et al. 2006; Lui et al. 2008b; Liu et al. 2010) incluidos los datos de LRET aquí presentados, es necesario tener en consideración que no necesariamente es en el segmento S0 donde ocurre el acople funcional entre ambas subunidades. Al respecto existe evidencia de que los extremos amino y carboxilo intracelulares de la subunidad beta1 serían los responsables de modificar funcionalmente la operación del sensor de voltaje del canal BK (Orio et al. 2006; Contreras et al. Manuscrito en redacción).

Los resultados experimentales que se han mostrado en esta tesis contribuyen al conocimiento actual de la arquitectura molecular del canal BK. El trabajo desarrollado da un vistazo, por primera vez, a la arquitectura de la cara extracelular del canal BK en condiciones funcionales, utilizando una preparación *in vivo* y al mismo tiempo permite examinar detalladamente los cambios de conformación que pueden inducir estímulos que alteran la función de esta molécula, en este caso particular la co-expresión con la subunidad accesoria beta1.

5. Conclusión

En esta tesis se trabajó sobre la hipótesis de que cada estado funcional del canal BK tiene una arquitectura espacial determinada. Se centró la atención en el dominio sensor de voltaje, ya que la información disponible apunta a que ocurren cambios estructurales que pueden ser detectados mediante diversas metodologías.

Como herramienta fundamental se utilizó la interacción LRET para medir las distancias intermoleculares que quedan determinadas por la arquitectura de este canal de iones.

Respecto de los resultados experimentales se puede concluir que:

1. Los segmentos S1 y S2 del sensor de voltaje del canal BK se orientan de manera similar a la esperada de acuerdo a los datos de cristalografía de los canales K_v y de *crosslinking*.

2. El segmento S0 se encuentra en la periferia del dominio sensor de voltaje.

3. La subunidad beta1 provoca un re-arreglo en la disposición de los tres segmentos trans-membrana estudiados, siendo el segmento S0 y su extremo amino terminal extracelular los que sufren el mayor desplazamiento.

6. Referencias

- Aggarwal S & MacKinnon R. 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the shaker K⁺ channel. *Neuron*. 16: 1169-1177
- Ahern C & Horn R. 2004. Specificity of charge-carrying residues in the voltage sensor of potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 123: 205-216.
- Akyuz N, Altman RB, Blanchard SC, Boudker O. 2013. Transport dynamics in a glutamate transporter homologue. *Nature*. 502:114-118
- Armstrong C & Bezanilla F. 1974. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 63: 533-552.
- Baker OS, Larsson HP, Mannuzzu LM & Isacoff EY. 1998. Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K⁺ channel gating. *Neuron* 20: 1283-1294
- Bao L & Cox DH. 2005. Gating and Ionic Currents Reveal How the BKCa Channel's Ca²⁺ Sensitivity Is Enhanced by its beta1 1 Subunit. *J. Gen. Physiol.* 126:393-412
- Barrett JN, Magelby KL & Pallotta BS. 1982. Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol.* 331:211-230
- Baumann G & Mueller P. 1974. A molecular model of membrane excitability. *J Supramol Struct.* 2:538-557
- Baumgartner W, Islas L & Sigworth F. 1999. Two-microelectrode voltage clamp of *Xenopus* Oocytes: voltage errors and compensation for local current flow. *Biophys. J.* 77: 1980-1991.
- Bian S, Favre I & Moczydlowski E. 2001. Ca²⁺-binding activity of a COOH-terminal fragment of the *Drosophila* BK channel involved in Ca²⁺-dependent activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 4776-4781.
- Butler SL & Falke JJ. 1996. Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: a disulfide trapping study. *Biochemistry.* 35:10595-10600.
- Candia S, Garcia ML & Latorre R. 1992. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Biophys. J.* 63:583-590.
- Careaga C & Falke J. 1992. Thermal motions of surface alpha-helices in the D-galactose chemosensory receptor. Detection by disulfide trapping. *J. Biol. Mol.* 266:1219-1235.
- Cha A, Snyder GE, Selvin PR & Bezanilla F. 1999. Atomic scale movement of the voltage-sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy. *Nature.* 402:809-813.
- Chanda B, Asamoah OK, Blunck R, Roux B & Bezanilla F. 2005 Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature.* 436:852-856.
- Chanda B & Bezanilla F. 2008. A common pathway for charge transport through voltage-sensing domains. *Neuron.* 57: 345-351.
- Contreras GF, Neely A, Alvarez O, Gonzalez C & Latorre R. 2012. Modulation of BK channel voltage gating by different auxiliary β subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:18991-18996.
- Contreras GF, Castillo K, Enrique N, Carrasquel-Ursulaez W, Castillo JP, Milesi V, Neely A, Alvarez O, Ferreira G, Gonzalez C & Latorre R. 2013. A BK (Sl α 1) channel journey from molecule to physiology. *Channels.* 7: 442-458.
- Cox DH, Cui J & Aldrich RW. 1997. Allosteric gating of a large conductance Ca-activated K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* 110:257-281.

- Cox DH, Cui J & Aldrich RW. 1997. Separation of gating properties from permeation and block in mslo large conductance Ca-activated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 109:633-646
- Cox DH & Aldrich RW. 2000. Role of the beta1 subunit in large-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca²⁺ sensitivity. *J. Gen. Physiol.* 116:411-432.
- Cui J, Cox DH & Aldrich RW. 1997. Intrinsic voltage dependence and Ca²⁺ regulation of mslo large conductance Ca-activated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 109:647-673.
- Cui J, Yang H & Lee US. 2009. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:852-875.
- Diaz L, Meera P, Amigo J, Stefani E, Alvarez O, Toro L & Latorre R. 1998. Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *J. Biol. Chem.* 273:32430-32436.
- Doyle D., Cabral J., Pfuetzner R., Kuo A., Gulbis J., Cohen S., Chait B. & MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science.* 280: 69-77.
- Dworetzky SI, Boissard CG, Lum-Ragan JT, McKay MC, Post-Munson DJ, Trojnecki JT, Chang CP, Gribkoff VK. 1996. Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSloβ subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J. Neurosci.* 16:4543-4550.
- Fernández-Fernández JM, Tomás M, Vázquez E, Orio P, Latorre R, Sentí M, Marrugat J, & Valverde MA. 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.
- Förster T. 1948. "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz" [Intermolecular energy migration and fluorescence]. *Annalen der Physik.* 437: 55-75.
- Franz KJ, Nitz M & Imperiali B. 2003. Lanthanide-binding tags as versatile protein coexpression probes. *ChemBiochem.* 4:265-271.
- Gandhi CS, Clark E, Loots E, Pralle A & Isacoff EY. 2003. The orientation and molecular movement of a K⁺ channel voltage-sensing domain. *Neuron.* 40:515-525.
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, & Garcia ML. 1990. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J. Biol. Chem.* 265:11083-11090.
- Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A & MacKinnon R. 1994. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry.* 33:6834-6839.
- Garcia-Calvo M, Vázquez J, Smith M, Kaczorowski GJ, Garcia ML. 1991. Characterization of the solubilized charybdotoxin receptor from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry.* 30:11157-11164.
- Burmeister Getz E, Cooke R, Selvin PR. 1998. Luminescence resonance energy transfer measurements in myosin. *Biophys. J.* 74:2451-2458.
- Giangiacomo KM, Garcia ML & McManus OB. 1992. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry.* 31:6719-6727.
- Gonzalez C, Morera FJ, Rosenmann E, Alvarez O & Latorre R. 2005. S3b amino acid residues do not shuttle across the bilayer in voltage-dependent Shaker K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:5020-5025.

- Gonzalez-Perez V, Stack K, Boric K & Naranjo D. 2010. Reduced voltage sensitivity in a K⁺ channel voltage sensor by electric field remodelling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 5178-5183.
- Gruslova A, Semenov I & Wang B. 2012. An extracellular domain of the accessory $\beta 1$ subunit is required for modulating BK channel voltage sensor and gate. *J. Gen. Physiol.* 139:57-67.
- Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B & Sigworth F. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391: 85-100.
- Hanner M, Schmalhofer WA, Munujos P, Knaus HG, Kaczorowski GJ & Garcia ML. 1997. The β subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor for charybdotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:2853-2858.
- Hanner M, Vianna-Jorge R, Kamassah A, Schmalhofer WA, Knaus HG, Kaczorowski GJ & Garcia ML. 1998. The beta subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel. Identification of residues involved in charybdotoxin binding. *J. Biol. Chem.* 273:16289-16296.
- Heginbotham L, Abramson T & MacKinnon R. 1992. A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* 258:1152-1155.
- Heyduk T & Heyduk E. 2001. Luminescence energy transfer with lanthanide chelates: interpretation of sensitized acceptor decay amplitudes. *Anal. Biochem.* 289:60-67.
- Hille B. 1992. Classical biophysics of the squid giant axon. In: *Ionic channels of excitable membranes* 2nd ed. Sinauer. pp 23-58.
- Hyde CH, Sandtner W, Vargas E, Dagcan A, Robertson J, Roux B, Correa A & Bezaniilla F. 2012. Nanopositioning system for structural analysis of functional homomeric proteins in multiple conformations. *Structure.* 20:1629-1640.
- Hodkin AL, Huxley AF & Katz B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116:424-448.
- Hodgkin AL & Huxley AF. 1952a. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116:449-472.
- Hodgkin AL & Huxley AF. 1952b. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116:473-96.
- Hodgkin AL & Huxley AF. 1952c. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116:497-506.
- Hodgkin AL & Huxley AF. 1952d. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117:500-44.
- Horn D. 2009. Uncooperative voltage sensors. *J. Gen. Physiol.* 133:463-466.
- Horrigan FT & Aldrich RW. 1999. Allosteric voltage gating of potassium channels II. Mslo channel gating charge movement in the absence of Ca²⁺. *J. Gen. Physiol.* 114:305-336.
- Horrigan F, Cui J, & Aldrich R. 1999. Allosteric voltage gating of potassium channels I. Mslo ionic currents on the absence of Ca²⁺. *J. Gen. Physiol.* 114: 277-304.
- Horrigan FT & Aldrich RW. 2002. Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 120:267-305.
- Horrocks WD Jr, Holmquist B, Vallee BL. 1975. Energy transfer between terbium (III) and cobalt (II) in thermolysin: a new class of metal-metal distance probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72:4764-4768.

- Islas LD & Zagotta WN. 2006. Short-range molecular rearrangements in ion channels detected by tryptophan quenching of bimane fluorescence. *J. Gen. Physiol.* 128:337-346.
- Iverson LE, Tanouye MA, Lester HA, Davidson N & Rudy B. 1988. A-type potassium channels expressed from Shaker locus cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5723-5727.
- Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT & MacKinnon R. 2001. Structure of the RCK domain from the *E. coli* K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron.* 29:593-601.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT & MacKinnon R. 2002a. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature.* 417:515-522.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT & MacKinnon R. 2002b. The open pore conformation of potassium channels. *Nature.* 417: 523-526.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT & MacKinnon R. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature.* 423:33-41.
- Ka Luk C. 1971. Study of the nature of the metal-binding sites and estimate of the distance between the metal-binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions as fluorescent probes. *Biochemistry.* 10:2838-2843.
- Khan SM, Birnbaum ER & Damall DW. 1978. Fluorescence energy transfer between metal ions in thermolysin. Thermal denaturation studies. *Biochemistry.* 17:4669-4674.
- Knaus HG, Eberhart A, Kaczorowski GJ & Garcia ML. 1994a. Covalent attachment of charybdotoxin to the beta-subunit of the high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. Identification of the site of incorporation and implications for channel topology. *J. Biol. Chem.* 269:23336-23341.
- Knaus HG, Folander K, Garcia-Caivo M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Smith M & Swanson R. 1994b. Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 269:17274-17278.
- Koval O, Fan MY & Rothberg BS. 2007. A role for the S0 transmembrane segment in voltage-dependent gating of BK channels. *J. Gen. Physiol.* 129:209-220.
- Lakowicz JR. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition. SpringerLink, Boston, MA.
- Latorre R, Vergara C, Hidalgo C. 1982. Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:805-809.
- Latorre R & Brauchi S. 2006. Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel: activation by Ca²⁺ and voltage. *Biol. Res.* 39:385-401.
- Latorre R, Morera FJ & Zaelzer C. 2010. Allosteric interactions and the modular nature of the voltage- and Ca²⁺-activated (BK) channel. *J. Physiol.* 588:3141-3148.
- Lilley DM & Wilson TJ. 2000. Fluorescence resonance energy transfer as a structural tool for nucleic acids. *Curr Opin Chem Biol.* 4:507-517.
- Liu G, Zakharov SI, Yang L, Deng SX, Landry DW, Karlin A & Marx SO. 2008a. Position and role of the BK channel alpha subunit S0 helix inferred from disulfide crosslinking. *J. Gen. Physiol.* 131:537-548.
- Liu G, Zakharov SI, Yang L, Wu RS, Deng SX, Landry DW, Karlin A, Marx SO. 2008b. Locations of the beta1 transmembrane helices in the BK potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:10727-10732.
- Liu G, Niu X, Wu RS, Chudasama N, Yao Y, Jin X, Weinberg R, Zakharov SI, Motoike H, Marx SO, Karlin A. 2010. Location of modulatory beta subunits in BK potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 135:449-459.

- Long S, Campbell E & MacKinnon R. 2005. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*. 309: 903-908.
- Long S, Tao X, Campbell E & MacKinnon R. 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*. 450: 376-382.
- Ma Z, Lou X & Horrigan F. 2006. Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels. *J. Gen. Physiol.* 127: 309-328.
- Ma Z, Wong K & Horrigan F. 2008. An extracellular Cu²⁺ binding site in the voltage sensor of BK and shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.* 131: 483-502.
- MacManus JP, Hogue CW, Marsden BJ, Sikorska M & Szabo AG. 1990. Terbium luminescence in synthetic peptide loops from calcium-binding proteins with different energy donors. *J. Biol. Chem.* 265:10358-10366.
- Magleby KL. 2003. Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *J. Gen. Physiol.* 121:81-96.
- Mansoor SE, McHaourab HS & Farrens DL. 2002. Mapping proximity within proteins using fluorescence spectroscopy. A study of T4 lysozyme showing that tryptophan residues quench bimane fluorescence. *Biochemistry*. 41:2475-2484.
- Marty A. 1981. Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*. 291:497-500.
- McManus OB, Helms LM, Pallanck L, Ganetzky B, Swanson R & Leonard RJ. 1995. Functional role of the beta subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron*. 14:645-650.
- Meera P, Wallner M, Jiang Z & Toro L. 1996. A calcium switch for the functional coupling between alpha (hslo) and beta subunits (KV,Ca beta) of maxi K channels. *FEBS letters*. 385:127-128.
- Meera P, Wallner M, Song M & Toro L. 1997. Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 14066-14071
- Miller C, Moczydlowski E, Latorre R & Phillips M. 1985. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*. 313:316-318.
- Moczydlowski E & Latorre R. 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, Wyman J & Changeux JP. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model. *J. Mol. Biol.* 12:88-118.
- Morrow JP, Zakharov SI, Liu G, Yang L, Sok AJ & Marx SO. 2006. Defining the BK channel domains required for beta1-subunit modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:5096-5101.
- Moss BL & Magleby KL. 2001. Gating and conductance properties of BK channels are modulated by the S9-S10 tail domain of the alpha subunit. A study of mSlo1 and mSlo3 wild-type and chimeric channels. *J. Gen. Physiol.* 118:711-734.
- Munujos P, Knaus HG, Kaczorowski GJ & Garcia ML. 1995. Cross-linking of charybdotoxin to high-conductance calcium-activated potassium channels: identification of the covalently modified toxin residue. *Biochemistry*. 34:10771-10776.

- Nimigean CM & Magleby KL. 2000. Functional coupling of the beta1 subunit to the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in the absence of Ca²⁺. Increased Ca²⁺ sensitivity from a Ca²⁺-independent mechanism. *J. Gen. Physiol.* 115:719-736.
- Niu X & Magleby KL. 2002. Stepwise contribution of each subunit to the cooperative activation of BK channels by Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:11441-11446.
- Nitz M, Franz KJ, Maglathlin RL & Imperiali B. 2003. A powerful combinatorial screen to identify high-affinity terbium(III)-binding peptides. *ChemBiochem.* 4:272-276.
- Nitz M, Sherawat M, Franz KJ, Peisach E, Allen KN & Imperiali B. 2004. Structural origin of the high affinity of a chemically evolved lanthanide-binding peptide. *Angewandte Chemie International ed.* 43:3682-3685.
- Orio P, Rojas P, Ferreira G & Latorre R. 2002. New disguises for an old channel: MaxiK channel β -subunits. *News Physiol. Sci.* 17: 156-161.
- Orio P & Latorre R. 2005. Differential effects of beta 1 and beta 2 subunits on BK channel. *J. Gen. Physiol.* 125:395-411.
- Orio P, Torres Y, Rojas P, Carvacho I, Garcia ML, Toro L, Valverde MA & Latorre R. 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 BS, Magleby KL & Barrett JN. 1981. Single channel recordings of Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat muscle cell culture. *Nature.* 293:471-474.
- Pantazis A, Gudzenko V, Savalli N, Sigg D & Olcese R. 2010a. Operation of the voltage sensor of a human voltage and Ca²⁺-activated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 4459-4464.
- Pantazis A, Kohanteb AP & Olcese R. 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 & Olcese R. 2010. Relative transmembrane segment rearrangements during BK channel activation resolved by structurally assigned fluorophore-quencher pairing. *J. Gen. Physiol.* 140:207-218.
- Phillips LR, Milescu M, Li-Smerin Y, Mindell JA, Kim JI & Swartz KJ. 2005. Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo. *Nature.* 436:857-860.
- Posson D, Ge P, Miller C, Bezanilla F & Selvin PR. 2005. Small vertical movement of a K⁺ channel voltage sensor measured with luminescence energy transfer. *Nature.* 436:848-851.
- Posson D & Selvin P. 2008. Extent of voltage sensor movement during gating of Shaker K⁺ channels. *Neuron.* 59: 98-109.
- Ruta V, Chen J & MacKinnon R. 2005. Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K⁺ channel. *Cell.* 123:463-475.
- Rothberg BS & Magleby KL. 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.
- Sandtner W, Bezanilla F, & Correa A. 2007. In vivo measurements of intramolecular distances using genetically encoded reporters. *Biophys. J.* 93: L45-L47.
- Savalli N, Kondratiev A, Toro L & Olcese R. 2006. Voltage-dependent conformational changes in human Ca²⁺- and voltage-activated K⁺ channel, revealed by voltage-clamp fluorometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 12619-12624.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA & Sigworth FJ. 1992. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels. *Science.* 255:1712-1715.

- Schreiber M, & Salkoff L. 1997. A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys. J.* 73:1355-1563.
- Sculimbrene BR & Imperiali B. 2006. Lanthanide-binding tags as luminescent probes for studying protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 128:7346-52.
- Seoh S, Sigg D, Papazian D & Bezanilla F. 1996. Voltage sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron.* 16: 1159-1167.
- Selvin P. 2002. Principles and applications of lanthanide-based probes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:275-302.
- Selvin P & Hearst JE. 1994. Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements on fluorescence energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:10024-10028.
- Shen KZ, Lagrutta A, Davies NW, Standen NB, Adelman JP & North RA. 1994. Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Arch.* 426:440-445.
- Shih TM & Goldin AL. 1997. Topology of the Shaker potassium channel probed with hydrophilic epitope insertions. *J. Cell. Biol.* 136:1037-1045.
- Song KC, Livanec PW, Klauda JB, Kuczera K, Dunn RC, Im W. 2011. Orientation of fluorescent lipid analogue BODIPY-PC to probe lipid membrane properties: insights from molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B.* 115:6157-6165.
- Stefani E, Ottolia M, Noceti F, Olcese R, Wallner M, Latorre R & Toro L. 1997. Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺ channel (hSlo). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:5427-5431.
- Tombola F, Pathak M & Isacoff E. 2005. How far will you go to sense voltage?. *Neuron.* 48: 719-725.
- Uebele VN, Lagrutta A, Wade T, Figueroa DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennett PB, & Swanson R. 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.
- Unnerst le S, Lind J, Papadopoulos E & M ler L. 2009. Solution Structure of the HsapBK K⁺ Channel Voltage-Sensor Paddle Sequence. *Biochemistry.* 48:5813-5821.
- Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Bahamonde MI, Mann GE, Vergara C & Latorre R. 1999. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science.* 285:1929-1931.
- Villaalba-Galea CA, Sandtner W, Starace DM & Bezanilla F. 2008. S4-based voltage sensors have three major conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:17600-17607.
- Wang L & Sigworth F. 2009. Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. *Nature.* 461:292-295.
- Wallner M, Meera P & Toro L. 1996. Determinant for β -subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca²⁺-sensitive K⁺ channels: An additional transmembrane region at the N terminus. *Proc. Nat. acad. Sci.* 93:14922-14927.
- Wallner M, Meera P & Toro L. 1999. Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:4137-4142.
- Wei A, Solaro C, Lingle C & Salkoff L. 1994. Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron.* 13:671-681.
- Wu Y, Yang Y, Ye S & Jiang Y. 2010. Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca²⁺-gated K⁺ channel. *Nature.* 466:393-397.

Xia XM, Ding JP, Zeng XH, Duan KL & Lingle CJ. 2000. Rectification and rapid activation at low Ca^{2+} of Ca^{2+} -activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *J. Neurosci.* 20:4890-4903.

Xia X, Zeng MX & Lingle CJ. 2002. Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature.* 418:880-884.

Yantorno R, Takashima S, Mueller P. 1982. Dipole moment of alamethicin as related to voltage-dependent conductance in lipid bilayers. *Biophys J.* 38:105-110.

Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R. 2010. Structure of the human BK channel Ca^{2+} -activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science.* 329:182-186.

Yusifov T, Savalli N, Gandhi CS, Ottolia M & Olcese R. 2008. The RCK2 domain of the human BKCa channel is a calcium sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:376-381.

Yusifov T, Javaherian AD, Pantazis A, Gandhi CS & Olcese R. 2010. The RCK1 domain of the human BKCa channel transduces Ca^{2+} binding into structural rearrangements. *J. Gen. Physiol.* 136:189-202.