

UCH-FC  
DOC-BMCN  
0698  
c.1

MODULACIÓN DEL CANAL DE POTASIO MAXIK POR LA  
COEXPRESIÓN DE SUS SUBUNIDADES  $\beta 1$  Y  $\beta 2$

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

Patricio Rodrigo Orio Álvarez



Director de Tesis: Dr. Ramón Latorre.

Co-Director de Tesis: Dr. Osvaldo Álvarez.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

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

PATRICIO RODRIGO ORIO ALVAREZ

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, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 24 del mes de Septiembre del año 2004.

Director de Tesis:

Dr. Ramón Latorre

Co-Director de Tesis

Dr. Osvaldo Álvarez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Cecilia Vergara

Dr. M. Tulio Núñez

Dr. Francisco Sepúlveda

Dr. Luis Valladares

*Ramón Latorre*

*[Signature]*

*C. Vergara*

*[Signature]*

*[Signature]*

*Luis Valladares*



*a la memoria de mi padre,  
quien me enseñó lo entretenido que es  
observar, preguntar, investigar, responder.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar en algunas líneas mis más sinceros agradecimientos a distintas personas que me acompañaron y apoyaron en este trabajo. Sin su apoyo y ayuda, este trabajo que emprendí no habría sido posible.

A mi tutor, Ramón Latorre, por su infinita paciencia, su dedicación y pasión por la ciencia, sus conocimientos y sabiduría. Este respaldo me acompañó por todos estos años. Además Ramón es una de las tantas personas que me ha enseñado que la vida es entretenida y que vale la pena disfrutarla antes que nada.

A todos los compañeros de laboratorio con quienes compartí tanto tiempo: Pato Rojas, Ingrid, Sebastián, Cristian, Fabián, Carlos, Pancho, Pepi, Eddie. Quiero mencionar especialmente a Luisa, que siempre tendrá un lugar especial en el laboratorio. Todos ellos me ayudaron y me enseñaron cosas nuevas, pero lo más importante es que aportaron a mis horas de trabajo un ambiente entretenido y de amistad.

A la Dra. Ligia Toro, quien me recibió amablemente en su laboratorio por dos meses. Durante esa estadía de investigación aprendí mucho sobre electrofisiología y además hice buenos amigos.

Al Centro de Estudios Científicos y quienes allí trabajan, su apoyo administrativo siempre estuvo acompañado de buena voluntad y calidez.

A Andrea, que me acompaña y me apoya siempre, y este tiempo de desarrollo de mi tesis no fue la excepción.

A mi madre, responsable en gran parte de que yo haya llegado adonde estoy.

Finalmente quisiera agradecer a las instituciones que me apoyaron económicamente en distintas etapas: Conicyt, Fundación Andes y la Iniciativa Científica Milenio a través del Centro de Estudios Científicos.

## ÍNDICE DE MATERIAS

Agradecimientos	iii
Índice de Materias	v
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Abreviaturas y Nomenclatura Utilizadas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xvii
Introducción	1
1. Consideraciones Generales .....	1
2. El canal de potasio MaxiK.....	2
2.1. Identidad molecular del canal MaxiK .....	2
2.2. El modelo de activación alostérica por calcio y potencial.....	6
2.3. Modulación del canal MaxiK .....	10
3. Las Subunidades $\beta$ del Canal MaxiK.....	12
3.1. La subunidad $\beta$ 1 .....	12
3.2. La subunidad $\beta$ 2 .....	14
3.3. Las subunidades $\beta$ 3.....	15
3.4. La subunidad $\beta$ 4 .....	16
4. El Canal MaxiK en la Vasodilatación y el Efecto de Estrógenos.....	17
4.1. Control fisiológico de la presión arterial .....	17

## Índice de Materias

4.2. Las 'chispas de calcio' y el canal MaxiK .....	18
4.3. Efectos de los estrógenos en la vasoregulación.....	19
4.4. Activación del canal MaxiK por 17- $\beta$ -estradiol .....	20
5. Objetivos.....	22
5.1. Objetivo General e Hipótesis de Trabajo .....	22
5.2. Objetivos Específicos .....	22
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>25</b>
1. Biología Molecular .....	25
1.1. Clones y vectores utilizados .....	25
1.2. Construcción de subunidades $\beta$ quiméricas.....	25
2. Expresión heteróloga y electrofisiología. ....	27
2.1. Expresión heteróloga .....	27
2.2. Registros electrofisiológicos.....	28
2.3. Soluciones de registro electrofisiológico.....	28
3. Análisis de los datos .....	29
3.1. Análisis de propiedades en estado estacionario.....	29
3.2. Ajuste y análisis estadístico de los valores de $V_{0.5}$ .....	30
3.3. Prueba estadística F de suma de cuadrados .....	31
3.4. Análisis de pendiente límite .....	32
3.5. Ajuste al modelo alostérico de 70 estados.....	33
3.6. Análisis de la cinética de las corrientes.....	34
<b>Resultados</b> .....	<b>35</b>
1. Efectos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ -IR sobre el canal MaxiK.....	35
1.1. Efectos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ sobre las propiedades del canal en estado estacionario.....	35
1.2. Las subunidades $\beta$ y el límite de la dependencia de potencial .....	40
1.3. Ajuste de las curvas de $P_{(O)}$ al modelo de activación alostérica.....	46
1.4. Efecto de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ IR sobre la cinética macroscópica del canal.....	50

## Índice de Materias

1.5. Modelo cinético de activación alostérica por potencial en ausencia de calcio.....	52
2. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol y Tamoxifeno en presencia de distintas subunidades $\beta$ del canal MaxiK.....	56
2.1. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol en presencia de distintas subunidades $\beta$ del canal MaxiK. ....	56
2.2. Efecto de Tamoxifeno (Tx) en presencia de distintas subunidades $\beta$ del canal MaxiK. ....	58
3. Efecto de Subunidades $\beta$ quiméricas sobre el canal MaxiK.....	61
3.1. Efecto de las subunidades $\beta$ quiméricas sobre la sensibilidad a calcio y potencial del canal .....	61
3.2. Efecto de las subunidades $\beta$ quiméricas sobre la cinética macroscópica del canal MaxiK en ausencia de calcio. ....	63
3.3. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol en presencia de las subunidades $\beta$ quiméricas .....	64
Discusión.....	66
1. El efecto de las subunidades $\beta$ sobre el canal MaxiK.....	66
1.1. Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ IR afectan la apertura del canal MaxiK por un mecanismo independiente a la unión de calcio.....	66
1.2. Diferencias entre las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ .....	68
1.3. Relevancia fisiológica de los efectos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ .....	68
2. El efecto de 17- $\beta$ -estradiol y Tamoxifeno .....	71
2.1. Farmacología de la activación por estrógenos.....	71
2.2. La inhibición del canal MaxiK por Tamoxifeno .....	74
2.3. La especificidad por las subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$ .....	75
2.4. Los segmentos de transmembrana y el efecto de estrógenos .....	76
3. Identificación de dominios funcionales. ....	77
3.1. Las subunidades $\beta$ y el acoplamiento funcional en la activación del canal.....	77
3.2. Diferencias en la secuencia de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ .....	80
3.3. Papel del dominio extracelular .....	81

*Índice de Materias*

Apéndices	83
1. Derivación de la probabilidad del estado abierto para el modelo de activación alostérica (Ecuación 1). .....	83
2. Significado de los parámetros del modelo de activación alostérica para el canal MaxiK.....	87
Referencias	88

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de $V_{0.5}$ y $z$ a distintas concentraciones de calcio, para canales MaxiK $\alpha$ , $\alpha+\beta_1$ y $\alpha+\beta_2$ IR.....	37
Tabla 2. Parámetros de ajuste de los valores de $\Delta G$ a la ecuación sigmoidea de concentración-efecto. ....	40
Tabla 3. Parámetros de mejor ajuste simultáneo de las curvas $P_{(O)}/V$ en ausencia de calcio. ....	45
Tabla 4. Parámetros del mejor ajuste de las curvas $G/V$ a la ecuación (1). ....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Topología y dominios funcionales propuestos para el canal MaxiK.....	4
Figura 2. Efecto del potencial de membrana ( $E_m$ ) y la concentración de calcio sobre la $P_{(0)}$ del canal MaxiK.....	6
Figura 3. Modelo de activación alostérica para el canal MaxiK (Horrigan y Aldrich, 2002). .....	8
Figura 4. Efecto de la subunidad $\beta_1$ sobre la sensibilidad a calcio y potencial del canal MaxiK. ....	13
Figura 5. Esquema del método utilizado para la construcción de subunidades $\beta$ quiméricas. ....	26
Figura 6. Esquema de las subunidades $\beta$ quiméricas construidas.....	26
Figura 7. Corrientes macroscópicas de canales MaxiK en ausencia y presencia de subunidades $\beta_1$ , $\beta_2$ y $\beta_2IR$ .....	36
Figura 8. Gráficos de $V_{0.5}$ y $z$ contra la concentración de calcio, para canales MaxiK $\alpha$ , $\alpha+\beta_1$ y $\alpha+\beta_2IR$ . ....	38
Figura 9. Efecto del calcio sobre el $\Delta G$ para la apertura del canal. ....	39
Figura 10. Cuantificación de eventos unitarios en ausencia de calcio.....	42
Figura 11. Dependencia de potencial para la activación de canales $\alpha$ , $\alpha+\beta_1$ y $\alpha+\beta_2IR$ . .	44
Figura 12. Ajuste de las curvas $G/V$ al modelo de activación alostérica .....	48

*Lista de Figuras*

Figura 13. Efecto de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  sobre la cinética de activación del canal en ausencia de calcio.....50

Figura 14. Efecto de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  sobre la cinética de desactivación del canal en ausencia de calcio. ....51

Figura 15. Esquema cinético para el canal MaxiK en ausencia de calcio.....53

Figura 16. Ajuste de las curvas de  $\tau/V$  a funciones exponenciales.....54

Figura 17. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol sobre el canal MaxiK en presencia de subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 2IR$  ó  $\beta 4$ . ....57

Figura 18. Inhibición del canal MaxiK por Tamoxifeno. ....58

Figura 19. Efecto de Tamoxifeno (Tx) sobre el canal MaxiK en ausencia y presencia de subunidades  $\beta$ . ....60

Figura 20. Corrientes macroscópicas del canal MaxiK en presencia de las subunidades  $\beta$  quiméricas. ....61

Figura 21. Efectos de las subunidades  $\beta$  quiméricas sobre las dependencias a calcio y potencial del canal MaxiK. ....62

Figura 22. Propiedades de cinética macroscópica para el canal MaxiK en presencia de subunidades  $\beta$  quiméricas. ....63

Figura 23. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol en presencia de la subunidades  $\beta 1L\beta 2$  y  $\beta 2L\beta 1$ . ....64

Figura 24. Efecto de la dependencia de potencial ( $z$ ) sobre la activación del canal por calcio. ....70

Figura 25. Distintos compuestos estrogénicos y su efecto sobre el canal MaxiK. ....72

*Lista de Figuras*

Figura 26. Posibilidades para explicar la diferencia de efectos de estradiol y Tx en la subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 4$ .....76

Figura 27. Modelo de resortes para la activación del canal MaxiK.....78

Figura 28. Modelo de interacciones propuestas entre las subunidades  $\beta$  y el canal MaxiK. ....79

Figura 29. Alineamiento de las secuencias de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$ . ....81

## ABREVIATURAS Y NOMECLATURA UTILIZADAS

Abreviatura o símbolo	Significado
V, $V_m$ , $E_m$	Potencial de membrana
G	Conductancia
$P_{(O)}$	Probabilidad del estado abierto o de encontrar el canal abierto.
$V_{0.5}$	Potencial de membrana en el que $P_{(O)}=0.5$
17 $\beta$ E	17- $\beta$ -estradiol (1,3,5-estratrieno-3,17 $\beta$ -diol)
Tamoxifeno, Tx	(Z)-1-( <i>p</i> -dimetilaminoetoxifenil)-1,2-difenil-1-buteno
Faslodex <sup>TM</sup> , ICI 182780	7 $\alpha$ -[9-[(4,4,5,5,5-pentafluoropentil)sulfinil]nonil]-estra-1,3,5(10)trieno-3,17 $\beta$ -diol
DES	Dietilestilbestrol ((E)-3,4-Bis(4-hidroxifenil)-3-hexeno)
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfónico
EGTA <sub>4</sub>	ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético
HEDTA	ácido N-(2-hidroxietil)etilendiamino-N,N',N'-triacético
NTA	ácido nitriloacético

## RESUMEN

El canal de potasio activado por calcio de alta conductancia MaxiK está presente en casi todos los tejidos de mamíferos. La actividad del canal aumenta con incrementos del calcio intracelular y la despolarización de la membrana celular. El canal se forma como un homotetrámero de su subunidad  $\alpha$  --una proteína codificada por el gen *Slo*-- y en algunos tejidos las propiedades biofísicas del canal son modificadas por la presencia de proteínas accesorias llamadas subunidades  $\beta$ . En mamíferos se conocen 4 subunidades  $\beta$ , denominadas  $\beta 1$  a  $\beta 4$ . La subunidad  $\beta 1$  aumenta la sensibilidad aparente a calcio del canal y hace más lenta la cinética de activación y de desactivación. Además, permite la activación del canal por 17- $\beta$ -estradiol. En presencia de la subunidad  $\beta 2$  el canal muestra un proceso de inactivación rápida, que se puede remover eliminando el extremo N-terminal de la proteína. La subunidad  $\beta 2$  sin dominio de inactivación (subunidad  $\beta 2IR$ ) tiene sobre el canal efectos similares a los de la subunidad  $\beta 1$ , aumentando su sensibilidad a calcio.

El objetivo de esta tesis es definir bases moleculares para la interacción de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  con el canal MaxiK, en relación a la modulación de la sensibilidad a calcio y potencial y a la activación del canal por estrógenos. Se utilizaron sistemas de expresión heteróloga para estudiar distintos parámetros de activación del canal MaxiK, solo o en combinación con las subunidades  $\beta 1$  ó  $\beta 2IR$ . Los datos fueron analizados en el

## Resumen

contexto de un modelo alostérico de activación por calcio y potencial que ha sido recientemente propuesto para el canal MaxiK.

Los resultados indican que el aumento de la sensibilidad aparente a calcio que se observa en presencia de ambas subunidades  $\beta$  no se explica por un aumento en la afinidad de los sitios de unión del catión. Más bien, las subunidades  $\beta$  incrementan el acoplamiento funcional entre la unión de calcio y la apertura del canal. También se observó un aumento del acoplamiento funcional entre la activación de los sensores de potencial y la apertura del canal, aunque con diferencias cuantitativas entre ambas subunidades  $\beta$ . Por lo tanto, ambas subunidades  $\beta$  interactuarían directa o indirectamente con los dominios de la subunidad  $\alpha$  que llevan a cabo este acoplamiento funcional. En el caso de la activación por potencial, éstos son los lazos entre los segmentos de transmembrana S4 y S5; mientras que en el caso de la activación por calcio, sería el lazo entre el segmento S6 y el dominio denominado RCK –un dominio adyacente a la boca interna de la vía de conducción y que se ha propuesto como un controlador de la apertura y cierre del canal.

Por otra parte, la subunidad  $\beta 1$  disminuye la dependencia de potencial del sensor de potencial del canal, ubicado en el segmento S4 de la subunidad  $\alpha$ . Este efecto no se observó en presencia de la subunidad  $\beta 2IR$ . La transición entre los estados cerrados y abiertos en el canal MaxiK tiene una dependencia intrínseca de potencial que no está asociada al movimiento de los sensores y cuya naturaleza molecular no es clara. Sin embargo, ninguna de las subunidades  $\beta$  afecta este proceso.

Se estudió la activación del canal por 17- $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ E) y Tamoxifeno (Tx) en presencia y ausencia de distintas subunidades  $\beta$ . 17 $\beta$ E 5  $\mu$ M activa al canal MaxiK en la presencia de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 4$  pero no en su ausencia ni en la presencia de las

## *Resumen*

subunidades  $\beta 2$  o  $\beta 2IR$ . El antiestrógeno Tx tiene efectos distintos dependiendo de la concentración. A concentraciones menores de  $1 \mu M$ , Tx activa al canal pero sólo en presencia de la subunidad  $\beta 1$ . Cuando la concentración de Tx es mayor que  $1 \mu M$  se observa una inhibición de las corrientes del canal MaxiK que es independiente de la presencia de cualquier subunidad  $\beta$ . Estos resultados indican que la farmacología de la activación del canal por estrógenos tiene importantes diferencias con la farmacología del receptor nuclear de estrógenos. Por otra parte, Tx tendría dos sitios de interacción con el canal: un sitio de inhibición presente en la subunidad  $\alpha$  y un sitio de activación que se expresa sólo en la presencia de la subunidad  $\beta 1$ .

Para definir dominios funcionales en las subunidades  $\beta$ , se estudiaron dos subunidades  $\beta$  quiméricas que resultan del intercambio de los dominios extracelulares de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$ . El estudio de los efectos de dichas quimeras sobre el canal mostró que las diferencias entre las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  se asocian por completo a los dominios de transmembrana y/o intracelulares. Esto permite concluir que los dominios de transmembrana y/o intracelulares de la subunidad  $\beta 1$  interactúan con el sensor de potencial del canal, y no se descarta que estos dominios sean también responsables de los otros efectos de las subunidades  $\beta$ . Además, se necesitan los segmentos de transmembrana y/o intracelulares de la subunidad  $\beta 1$  para el efecto activador de  $17\beta E$ .

Todos estos resultados son un importante paso hacia la definición molecular de las redes de interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal MaxiK.

## ABSTRACT

The high conductance, calcium-activated potassium (MaxiK) channel is widely expressed among mammalian tissues. The activity of the channel is increased by membrane depolarization and by increases in intracellular calcium concentration. The channel is assembled in the membrane as a homotetramer of its pore-forming  $\alpha$ -subunit—coded by the *Slo* gene—and in some tissues its properties are modified by the presence of accessory proteins called  $\beta$ -subunits. Four  $\beta$ -subunits have been cloned in mammals, named  $\beta 1$  to  $\beta 4$ .  $\beta 1$ -subunit increases the apparent calcium sensitivity of the channel and slows down its activation and deactivation kinetics. It also allows the channel to be activated by 17- $\beta$ -estradiol. In the presence of the  $\beta 2$ -subunit the channel shows a fast inactivation process, which is removed by deleting the N-terminus of the protein. The  $\beta 2$ -subunit without the fast inactivation domain ( $\beta 2IR$ ) has similar effects as the  $\beta 1$  subunit, increasing the apparent calcium sensitivity of the channel.

The objective of this thesis work is to define molecular basis for the interaction of  $\beta 1$ - and  $\beta 2$ -subunits with the MaxiK channel, related to the modulation of the calcium- and voltage sensitivity and to the activation of the channel by estrogens. Heterologous expression systems were used to study several activation parameters of the MaxiK channel, alone or in combination with the  $\beta 1$ - and  $\beta 2IR$ -subunits. The data were analyzed in the context of an allosteric activation model that has been proposed for the MaxiK channel.

## *Abstract*

The results indicate that the increase of the apparent calcium sensitivity in the presence of both  $\beta$ -subunits can not be explained by an increase in the affinity of the calcium binding sites. Instead, the  $\beta 1$ - and  $\beta 2$ -subunits increase the functional coupling between calcium binding and channel opening. An increase of the functional coupling between voltage sensor activation and channel opening was also observed, with some quantitative differences between both  $\beta$ -subunits. Therefore,  $\beta 1$ - and  $\beta 2$ -subunits must – directly or indirectly– interact with the domains of the  $\alpha$ -subunit responsible for this functional coupling. For the voltage-activation, these are the linkers between the S4 and S5 transmembrane domains; whereas for the calcium-activation, these are the linkers between the S6 domain and the RCK domain –a domain adjacent to the inner mouth of the conduction pathway and that has been proposed to control the open-close state of the pore.

The  $\beta 1$ -subunit also decreases the voltage-dependence of the voltage sensor of the channel, located in the S4 segment of the  $\alpha$ -subunit. This effect was not observed in the presence of the  $\beta 2$ IR subunit. The transition between closed and open states of the channel has intrinsic voltage dependence, unrelated to voltage sensor movement, whose molecular nature is unclear. However, none of the  $\beta$ -subunits affected this process.

Channel activation by 17- $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ E) and Tamoxifen (Tx) was studied in the absence and presence of different  $\beta$ -subunits. 5  $\mu$ M 17 $\beta$ E activates the channel only in the presence of the  $\beta 1$ - or  $\beta 4$ -subunits, but not in their absence or in presence of  $\beta 2$ - or  $\beta 2$ IR-subunits. The antiestrogen Tx has different effects depending on concentration. When the concentration is lower than 1  $\mu$ M, Tx activates the channel but only in the presence of the  $\beta 1$ -subunit. When the Tx concentration is higher than 1  $\mu$ M, there is an

## *Abstract*

inhibition of MaxiK currents independent of the presence of any  $\beta$ -subunit. These results show that there are main differences in the pharmacology of MaxiK channel activation by estrogens and the pharmacology of the nuclear estrogen receptor. On the other hand, Tx, would have two interaction sites with the channel: an inhibition site present in the  $\alpha$ -subunit and an activation site expressed only in the presence of the  $\beta$ 1-subunit.

In order to define functional domains in the  $\beta$ -subunits, the extracellular domains of the  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2IR-subunit were exchanged, and the resulting quimerical  $\beta$ -subunits were studied. The effects of the quimerical  $\beta$ -subunits showed that all the differences between  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2IR-subunits can be completely associated to the transmembrane and/or intracellular domains. This raises the conclusion that the transmembrane and/or intracellular domains of the  $\beta$ 1-subunit interact with the voltage sensor of the channel, though a role of this domains on the other effects of the  $\beta$ -subunits is not discarded. Moreover, the transmembrane and/or intracellular domains of the  $\beta$ 1-subunits are also needed for the activation of the channel by  $17\beta$ E.

All these results are an important step towards the molecular definition of the interaction networks between  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of the MaxiK channel.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Consideraciones Generales

Los canales de iones son proteínas integrales de membrana que permiten el paso de iones a través de la membrana de las células. Las propiedades más importantes que distinguen a estas proteínas son la selectividad por ciertos iones y la regulación de la apertura y cierre de la vía de conducción. A diferencia del transporte activo, cuando los canales se abren el paso de los iones es pasivo, es decir, es siempre a favor del gradiente electroquímico del ion (Hille, 2001).

Al existir condiciones iónicas muy diferentes entre el interior y el exterior de la célula, la actividad de los canales de iones determina el potencial eléctrico de la membrana celular, que a su vez gatilla diversos eventos fisiológicos. De esta manera, los canales de iones controlan procesos como la transmisión nerviosa, la contracción muscular y la secreción de neurotransmisores. También están involucrados en otros procesos que implican el transporte de iones, como la regulación del volumen celular y el transporte de electrolitos en epitelios.

El trabajo de tesis que aquí se presenta fue realizado con un canal de potasio activado por calcio de alta conductancia, conocido como MaxiK, BK o Slo1 (revisado en Toro y col., 1998). Este canal es ampliamente expresado en mamíferos, encontrándose en casi todos los tejidos. El canal MaxiK es sensible al potencial de membrana y al calcio intracelular, y aumenta su actividad o probabilidad del estado abierto cuando la con-

centración de calcio intracelular se incrementa o cuando el potencial de membrana se hace más positivo. Al ser un canal de potasio, un aumento de su actividad tiende a hiperpolarizar la membrana; por esto el canal MaxiK constituye un mecanismo de retroalimentación negativa para aquellos eventos excitativos que conducen a aumentos de calcio intracelular o despolarización de la membrana celular. Por ejemplo, la retroalimentación negativa que el canal MaxiK efectúa es de gran importancia en la regulación de la contracción de la musculatura lisa vascular y, por lo tanto, de la presión arterial.

La modulación del canal MaxiK por diversos mecanismos, como proteínas accesorias u hormonas, tiene grandes consecuencias para la fisiología y será el tema principal de esta tesis.

## **2. El canal de potasio MaxiK**

### **2.1. Identidad molecular del canal MaxiK**

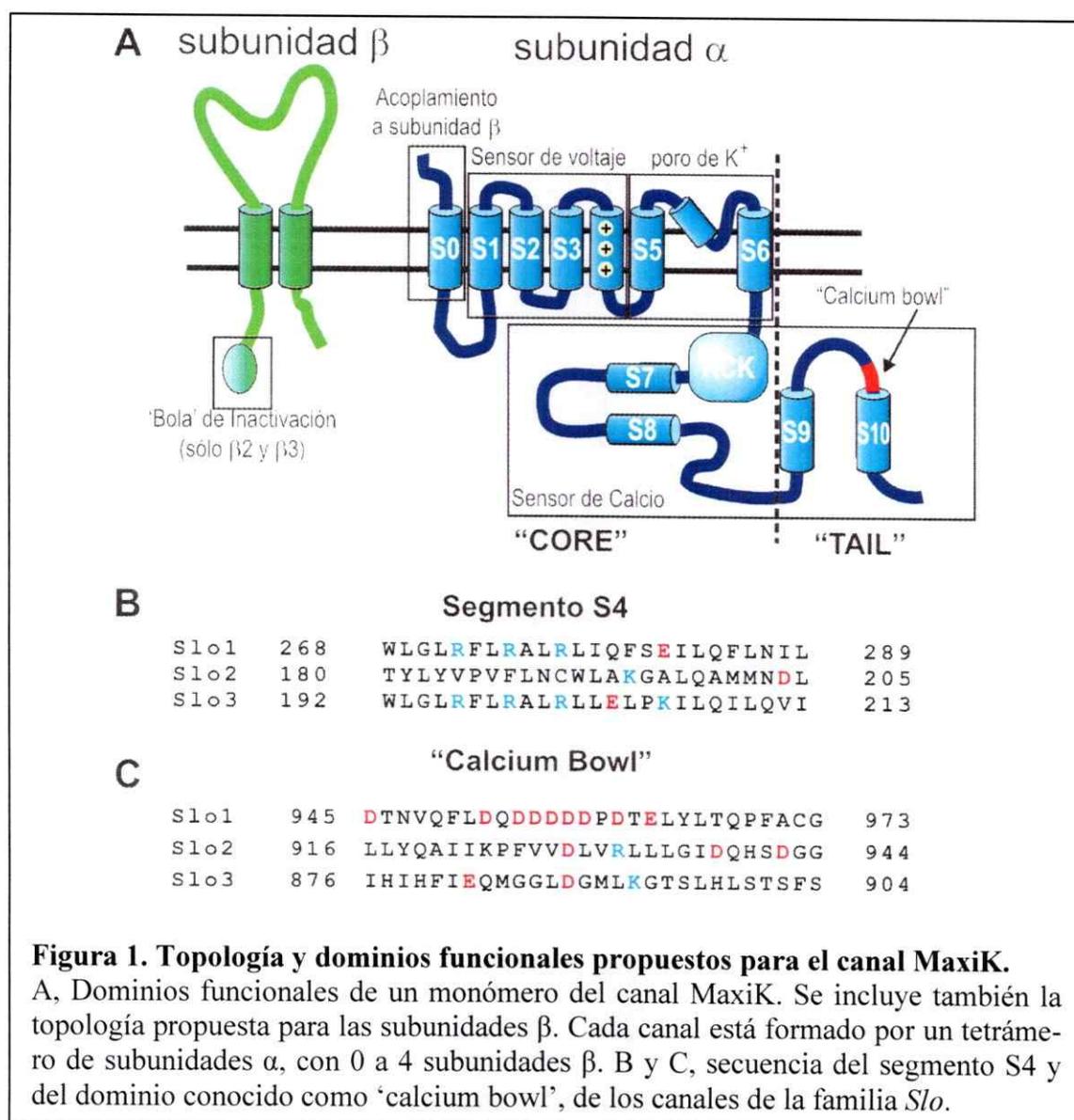
El canal MaxiK fue identificado en distintas preparaciones de músculo (Pallotta y col., 1981; Latorre y col., 1982; Latorre y col., 1983) y cerebro (Adams y col., 1982), e inmediatamente llamó la atención su dependencia de calcio y voltaje y su elevada conductancia. Se ensambla en la membrana como un homotetrámero de su subunidad  $\alpha$  y el gen que codifica esta proteína fue clonado en la mosca *Drosophila melanogaster*. Se denominó *Slo* debido a la mutación *slowpoke* con la que se le identificó (Atkinson y col., 1991) y su nombre fue cambiado a *Slo1* luego de la clonación de los canales *Slo2* y *Slo3* (Wei y col., 1996; Schreiber y col., 1998; Yuan y col., 2000). La secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen muestra que esta proteína pertenece a la superfamilia de canales de potasio dependientes de potencial. Sin embargo, tiene varias diferen-

cias con éstos que hacen de los genes *Slo* una familia particular de canales de potasio. Una de las principales diferencias es la existencia de un segmento de transmembrana adicional en los canales MaxiK y Slo3: mientras los canales de potasio dependientes de potencial tipo *Shaker* o Kv tienen 6 segmentos de transmembrana, el canal MaxiK posee 7 (Meera y col., 1997). Este segmento adicional se denomina S0 y se encuentra hacia el extremo N-terminal, mientras los segmentos S1 a S6 son homólogos a los 6 segmentos de transmembrana de los canales Kv (Figura 1A). Los segmentos S1 a S4 forman el sensor de potencial del canal, y el segmento S4 tiene un papel principal en esta estructura al tener 3 aminoácidos con carga positiva (Diaz y col., 1998). Cuando el potencial de membrana cambia, estas cargas se mueven siguiendo el campo eléctrico, y su movimiento está acoplado a la apertura del canal. Además, el movimiento de las cargas del sensor de potencial origina las denominadas 'corrientes de compuerta' (*gating currents*) que son una de las características de los canales dependientes de potencial (Armstrong y Bezanilla, 1973; Rojas y Keynes, 1975; Bezanilla, 2000; Hille, 2001).

Al igual que en el resto de los canales de potasio, los segmentos S5 y S6 forman el poro o vía de conducción. Entre ambos segmentos, se encuentra el dominio denominado filtro de selectividad, una secuencia conservada en todos los canales de potasio y que es responsable de la selección de iones potasio por sobre los iones sodio. En particular, la secuencia de aminoácidos TVG(Y/F)GD se encuentra pre

col., 1998; Roux y MacKinnon, 1999; Zhou y col., 2001). El lado extracelular del poro del canal MaxiK es también el sitio de interacción con las toxinas peptídicas Caribdo-toxina (CTX) e Iberiotoxina, que bloquean al canal MaxiK de mamíferos pero no al de *Drosophila* (Meera y col., 1997)

El dominio intracelular del canal MaxiK comprende alrededor de dos tercios de la proteína. Contiene 4 dominios de residuos hidrófobos (S7-S10, Figura 1) que en un



principio se pensó que forman segmentos de transmembrana, pero experimentalmente se demostró que se encuentran en el citoplasma (Meera y col., 1997). En este dominio se encuentra el denominado '*calcium bowl*', un segmento rico en residuos aspartato (secuencia -DQDDDDDPD-, Figura 1C) y que aparece como un muy buen candidato para ser el sitio de unión de calcio. Un estudio con proteínas quiméricas entre el canal MaxiK y el canal Slo3, que no es sensible a calcio, demostró que la sensibilidad a calcio reside en un dominio comprendido entre el lazo que une los segmentos S9 y S10, y la primera mitad del segmento S10 (Schreiber y col., 1999). Sin embargo, otros estudios de unión directa de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  a una proteína de fusión conteniendo los 280 residuos del extremo C-terminal del canal de *D. melanogaster* (dSlo1), muestran que al reemplazar los cinco aspárticos consecutivos por alanina sólo se pierde un 56% de la unión de calcio (Bian y col., 2001). Un dominio que se encuentra entre el segmento de transmembrana S6 y segmento hidrófobo S7 tiene cierta similitud de secuencia con un dominio denominado RCK, presente en muchos canales de potasio y cuya estructura se conoce para el canal de potasio de *E. coli* y un canal de *M. thermotrophicum* conocido como MthK (Jiang y col., 2001; Jiang y col., 2002). En el canal MthK, la unión de calcio a este dominio induce un cambio de conformación que resulta en la apertura de la compuerta del canal. En el canal MaxiK, se ha mostrado funcionalmente que este dominio regula la activación del canal por calcio, aunque no se ha comprobado directamente la unión de calcio (Jiang y col., 2001).

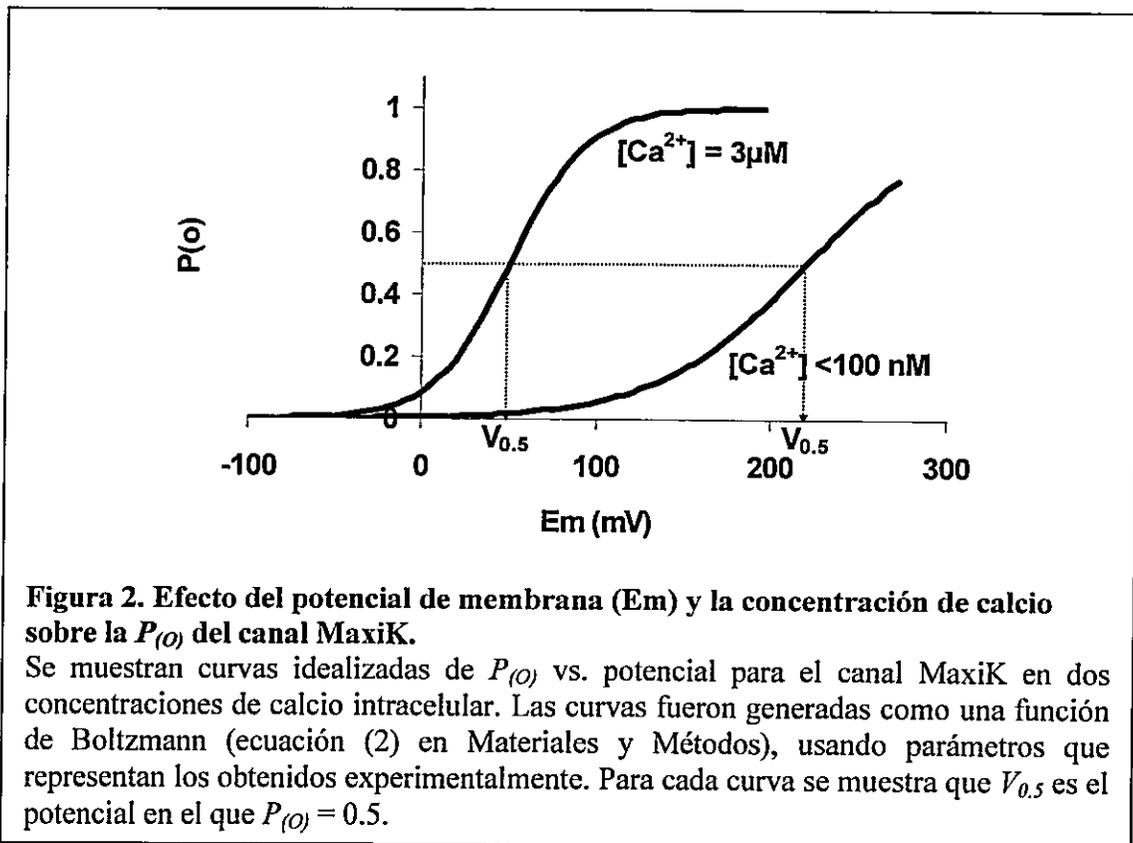
Esto, junto a otras evidencias experimentales (Shi y Cui, 2001; Zhang y col., 2001; Bao y col., 2002), ha llevado a concluir que el canal MaxiK posee dos tipos de sitios de unión para calcio: sitios de alta afinidad y sitios de baja afinidad. Los sitios de

baja afinidad para calcio además unen magnesio, catión que también activa al canal (Shi y Cui, 2001; Zhang y col., 2001; Xia y col., 2002).

Otra de las características de este canal, y a la cual debe su nombre, es una gran conductancia de canal único. En condiciones de potasio simétrico 150 mM, cada canal MaxiK tiene una conductancia de 250-300 pS, la mayor entre todos los canales de potasio (Pallotta y col., 1981; Latorre y col., 2000)

## 2.2. El modelo de activación alostérica por calcio y potencial

La probabilidad de encontrar abierto ( $P_{(o)}$ ) al canal MaxiK crece cuando hay un aumento en el calcio intracelular y/o cuando el potencial de membrana aumenta. A concentraciones bajas de calcio, cercanas a 100 nM –la concentración típica de calcio intra-



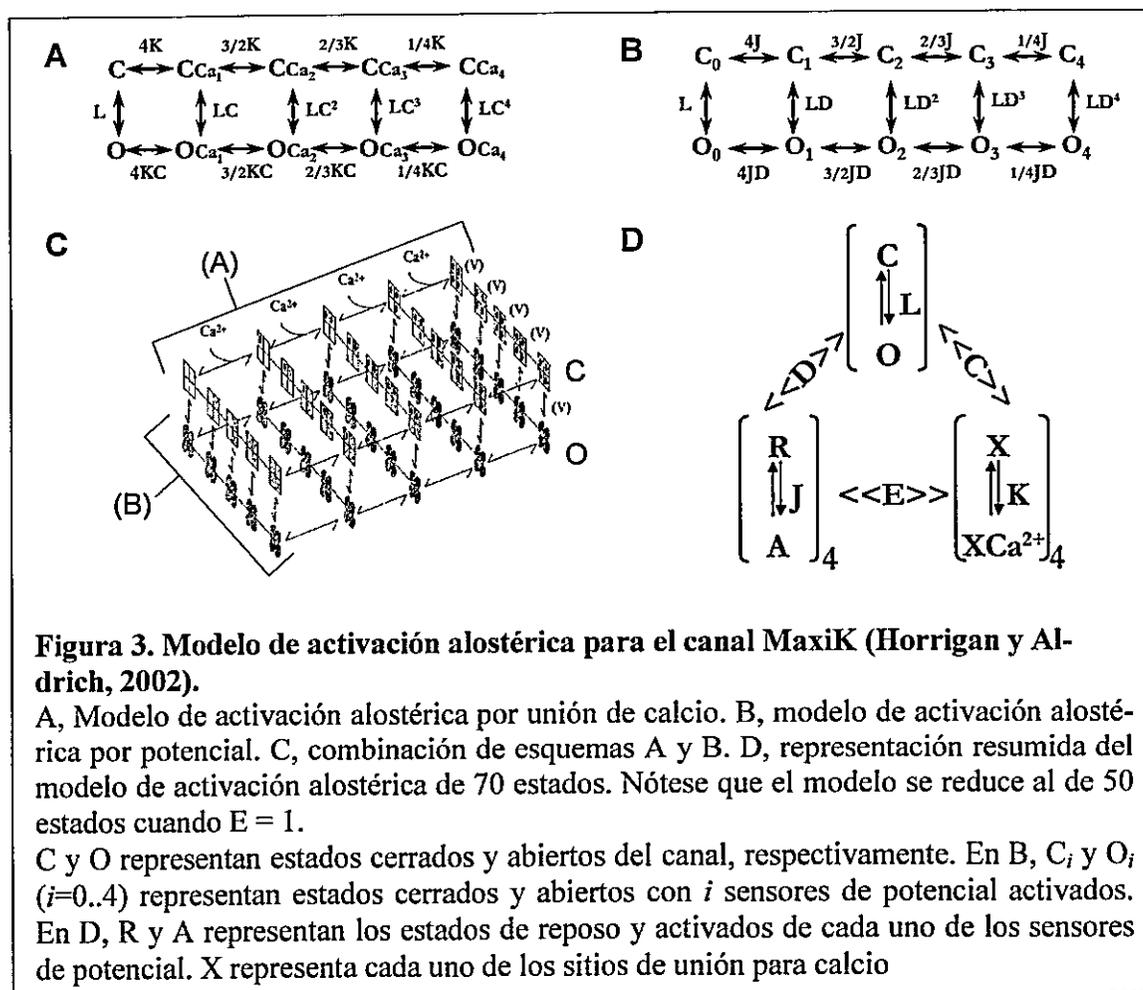
celular para una célula en reposo—, se necesita un potencial de membrana muy elevado para aumentar la  $P_{(O)}$  del canal; la  $P_{(O)}=0.5$  se alcanza alrededor de los 200 mV (este valor de potencial se conoce como  $V_{0.5}$ ; Figura 2). Al aumentar la concentración de calcio, se necesita un potencial de membrana menor para aumentar la  $P_{(O)}$  y el  $V_{0.5}$  disminuye, llegando hasta valores cercanos a -50 mV cuando la concentración de calcio se acerca a 1 mM. De esta manera, el calcio y el potencial funcionan de manera aditiva en la activación del canal.

Sin embargo, ninguno de los dos estímulos —el calcio o el potencial de membrana— es estrictamente necesario para la activación del canal. En ausencia virtual de calcio intracelular, una despolarización de la membrana suficientemente elevada puede incrementar la  $P_{(O)}$  del canal (Pallotta, 1985; Meera y col., 1996; Stefani y col., 1997). Por otra parte, a potenciales de membrana muy bajos, en los cuales no hay activación de los sensores de potencial, el calcio también puede aumentar la  $P_{(O)}$  del canal (Horrigan y Aldrich, 2002). A potenciales muy negativos la dependencia de potencial del canal disminuye. Esto sugiere la existencia de una transición entre estados abiertos y cerrados que es dependiente de potencial pero que no involucra el movimiento de los sensores de potencial (Horrigan y col., 1999; Horrigan y Aldrich, 2002). En otras palabras, el canal se puede abrir en ausencia de calcio y sin los sensores de potencial activados. Esta transición es dependiente de potencial, a pesar de que no involucra el movimiento de los sensores. La naturaleza de este proceso no es clara, pero tiene que estar relacionada al movimiento de cargas o dipolos que no están en el segmento S4.

Estos y otros estudios detallados de las corrientes macroscópicas, de canal único y de compuerta del canal MaxiK apoyan la idea de que la apertura del canal, la unión de

calcio y la activación de los sensores de potencial no son eventos acoplados de manera estricta, sino que serían equilibrios independientes que interactúan entre sí de manera alostérica (Cox y col., 1997; Cui y col., 1997; Horrigan y Aldrich, 1999; Horrigan y col., 1999; Rothberg y Magleby, 1999; Cui y Aldrich, 2000; Rothberg y Magleby, 2000; Horrigan y Aldrich, 2002; Magleby, 2003).

La interacción alostérica de los 4 sensores de calcio con la apertura del canal origina un modelo cinético de dos filas y 10 estados (5 abiertos y 5 cerrados, Figura 3A) (Cui y col., 1997). En este modelo se ha considerado un solo sitio de unión de calcio por



subunidad (de alta afinidad), que cada sitio es independiente de los demás (no hay cooperatividad en la unión) y que todos tienen la misma constante de disociación  $K_d$ . La unión de un calcio a un sitio de unión modifica la constante de equilibrio de apertura del canal ( $L$ ) por un factor  $C$ , y la sucesiva unión a  $n$  sitios la modifica en un factor  $C^n$ . De manera inversa y para respetar el principio de reversibilidad microscópica, cuando el canal está abierto la constante de unión para calcio se ve incrementada por el mismo factor  $C$ . Un esquema similar, de 10 estados, se describió para la apertura del canal en ausencia de calcio, en que la activación de los sensores de potencial favorece alostéricamente el equilibrio entre cerrados y abiertos (Figura 3B) (Horrigan y Aldrich, 1999; Horrigan y col., 1999). En este caso, también se supone un sensor de potencial por cada subunidad, que se mueven de manera independiente y siempre con la misma constante de equilibrio. En la columna izquierda de ambos esquemas se puede ver que el canal se abre en ausencia de calcio y de potencial con una constante de equilibrio  $L$  que normalmente es muy pequeña y que se hace significativa conforme se va multiplicando por los factores  $C$  y  $D$ .

La combinación entre los dos esquemas origina un modelo de 50 estados (Figura 3C), que luego ascienden a 70 si se considera el factor alostérico  $E$ : la interacción entre los sensores de potencial y los sitios de unión de calcio (Horrigan y Aldrich, 2002). A pesar de tener un gran número de estados, se puede apreciar la simplicidad del modelo si se le considera como la interacción alostérica entre tres equilibrios (Figura 3D). De esta manera, se aprecia también que éste queda definido por sólo 8 parámetros: 3 constantes de equilibrio ( $L_0$ ,  $J_0$  y  $K_d$ ), dos dependencias de potencial ( $z_L$  y  $z_J$ ) y los factores alostéri-

cos  $C$ ,  $D$  y  $E$ .  $K_d$  es la constante de disociación de cada sensor de calcio, cuando el canal está cerrado y sin sensores de potencial activados.  $L_0$  es la constante de equilibrio para la apertura del canal a potencial 0, sin sensores activados y en ausencia de calcio.  $J_0$  es la constante de equilibrio para la activación de cada sensor a potencial 0, con el canal cerrado y en ausencia de calcio.  $z_L$  y  $z_J$  son los parámetros que describen la dependencia de potencial de las constantes  $L$  y  $J$ , respectivamente.  $C$ ,  $D$  y  $E$  son los factores alostéricos que relacionan la unión de calcio y la apertura del canal; la activación de un sensor de potencial y la apertura del canal, y la activación de un sensor de potencial y la unión de calcio, respectivamente.

Finalmente, la probabilidad del estado abierto como función de la concentración de calcio y el potencial de membrana queda expresada por la ecuación (1) (deducida en el Apéndice 1):

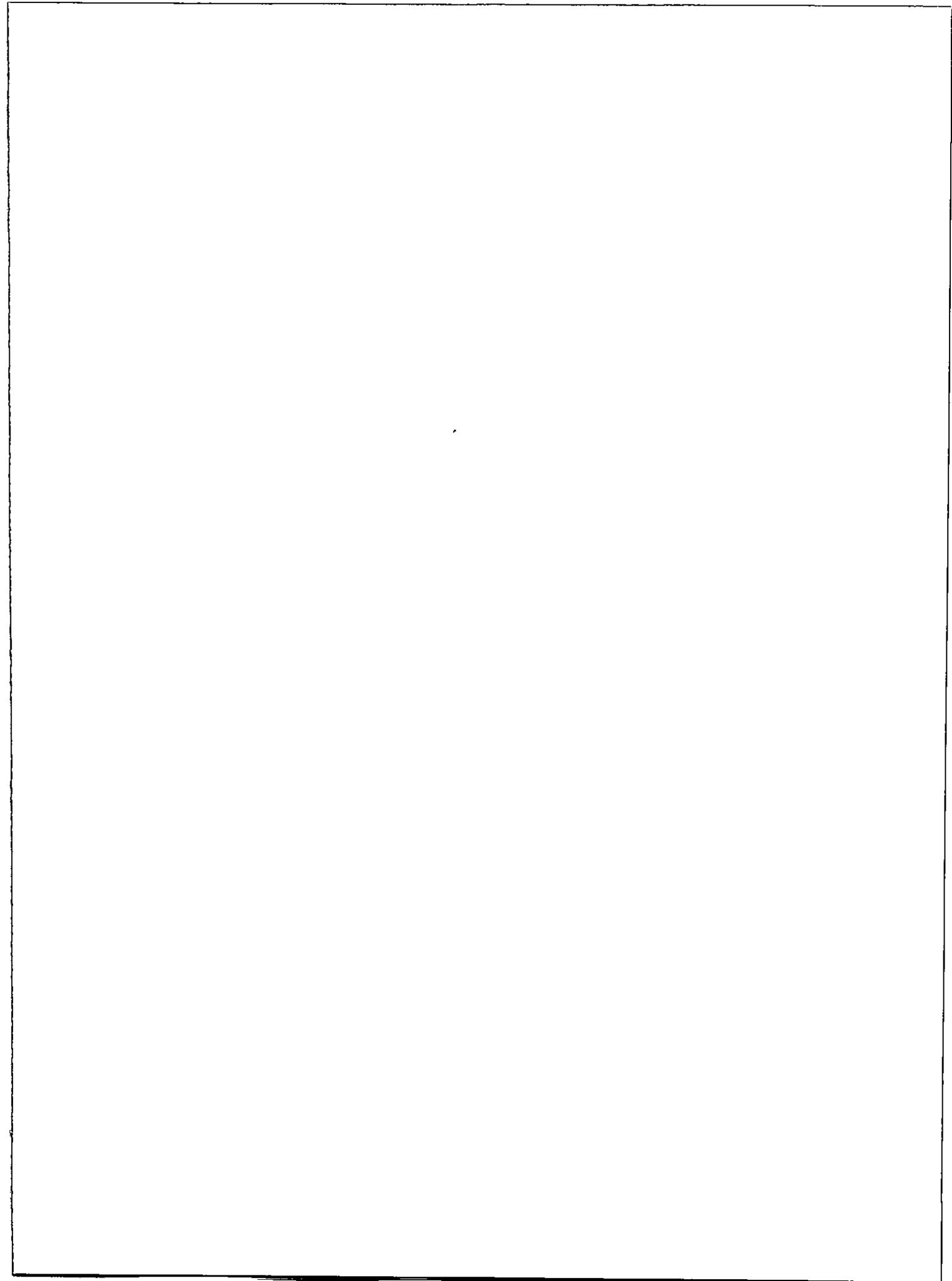
$$P_{(0)} = \frac{L(1 + JD + KC + JKCDE)^4}{L(1 + JD + KC + JKCDE)^4 + (1 + J + K + JKE)^4} \quad (1),$$

en donde

$$J = J_0 \exp\left(\frac{z_J FV}{RT}\right), \quad K = \frac{[Ca^{2+}]}{K_d} \quad \text{y} \quad L = L_0 \exp\left(\frac{z_L FV}{RT}\right).$$

### 2.3. Modulación del canal MaxiK

No sólo el potencial de membrana y la concentración intracelular de calcio regulan la  $P_{(0)}$  del canal. Muchos otros factores del ambiente celular modifican tanto su sensibilidad a calcio y potencial como las propiedades cinéticas de activación y desactivación del canal. Existen evidencias de modulación de la actividad del canal MaxiK por



fosforilación, por interacción con proteínas G, por estimulación mecánica y por sustancias vasoactivas derivadas del endotelio (Vergara y col., 1998; Latorre y col., 2000).

El canal MaxiK de *Drosophila* (dSlo) puede interactuar con dos proteínas diferentes, dSlip1 y Slob. Ambas son proteínas solubles que interactúan con el canal MaxiK por su lado intracelular. Mientras que Slob incrementa la  $P_{(O)}$  del canal (Schopperle y col., 1998; Zhou y col., 1999), dSlip1 aparentemente disminuye el número de canales MaxiK en la membrana (Xia y col., 1998).

El procesamiento alternativo del mRNA origina canales MaxiK con diferentes propiedades. La mayoría de los sitios de procesamiento alternativo se encuentran en el dominio intracelular, entre los segmentos hidrófobos S8 y S10. Estos sitios originan variantes del canal que difieren principalmente en su sensibilidad a calcio y cinética (Adelman y col., 1992; Lagrutta y col., 1994; Tseng-Crank y col., 1994; Saito y col., 1997). La regulación de la expresión de estas variantes del canal MaxiK también es usada como respuesta a eventos fisiológicos. Por ejemplo en las células cromafines, secretoras de adrenalina, la condición de estrés promueve la expresión de una variante con mayor sensibilidad a calcio y cinética de apertura más rápida, que a su vez permite un disparo más repetitivo de potenciales de acción (Xie y McCobb, 1998). Una variante identificada en el miometrio actúa como dominante negativa, de manera que cuando ésta se expresa el canal MaxiK es retenido en compartimentos intracelulares y disminuye su expresión en la membrana plasmática (Zarei y col., 2001).

### 3. Las Subunidades $\beta$ del Canal MaxiK

La mayor variación en las propiedades biofísicas del canal MaxiK se observa gracias a la existencia de proteínas accesorias reguladoras denominadas subunidades  $\beta$  (revisadas en Orio y col., 2002). En mamíferos, se ha clonado hasta el momento 4 subunidades  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 4) (Knaus y col., 1994b; Xia y col., 1999; Meera y col., 2000; Uebele y col., 2000; Brenner y col., 2000a). En *Drosophila* y *C. elegans* no se ha reportado ninguna y se conoce sólo una subunidad  $\beta$  clonada en aves (Oberst y col., 1997).

Las 4 subunidades  $\beta$  de mamífero –y la subunidad  $\beta$  de aves– comparten la misma predicción de topología en la membrana: dos segmentos de transmembrana conectados por un lazo de 120 a 126 aminoácidos y extremos N- y C-terminal orientados hacia el citoplasma (Figura 1). El largo total de las subunidades  $\beta$  oscila entre los 191 ( $\beta$ 1) y 279 ( $\beta$ 3d) aminoácidos. La mayor similitud de secuencia es entre las subunidades  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 (46%), y las subunidades  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 (47%). La subunidad  $\beta$ 4 es la más distinta de todas (similitud menor a 40%). En el caso de la subunidad  $\beta$ 1, su secuencia se conoce en 6 especies y la similitud de secuencia entre ellas es superior al 85%.

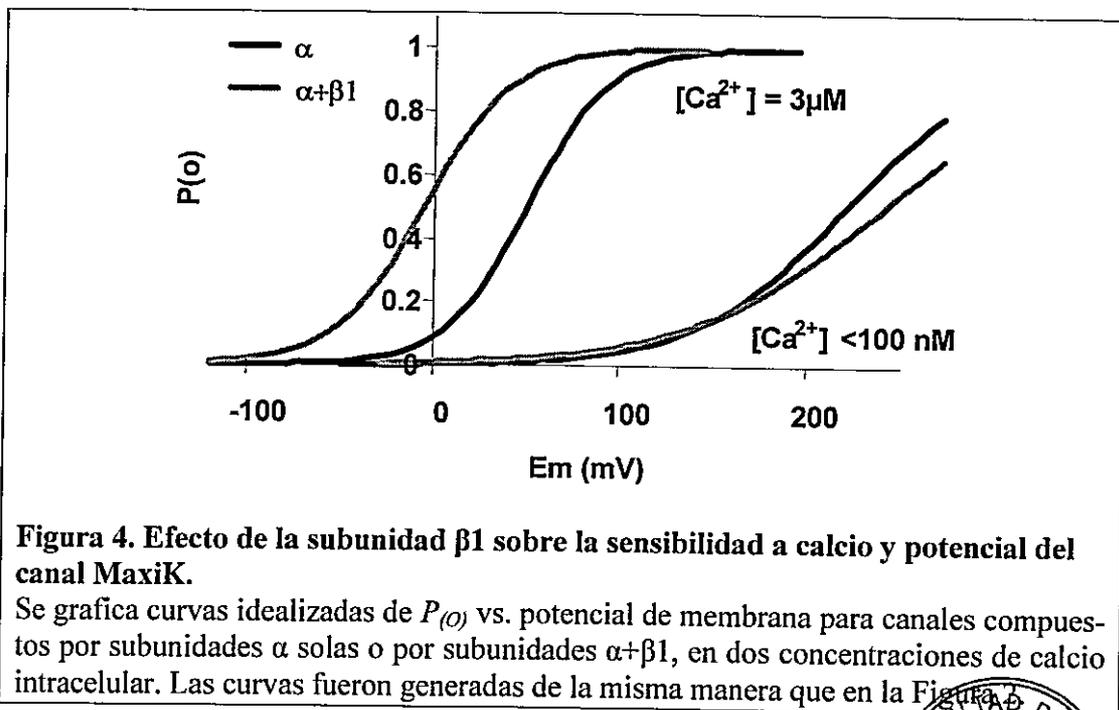
#### 3.1. La subunidad $\beta$ 1

La primera subunidad  $\beta$  del canal MaxiK en ser clonada fue identificada como una proteína de alta afinidad por CTX (Knaus y col., 1994a; Knaus y col., 1994b; Knaus y col., 1994c). Esta proteína de 191 aminoácidos se encuentra preferentemente en diversos tipos de musculatura lisa y muy poco en otros tejidos (Chang y col., 1997).



El efecto más notorio de la coexpresión de la subunidad  $\beta 1$  con el canal MaxiK es una mayor sensibilidad a calcio. En las concentraciones más bajas de calcio no hay un gran efecto de la subunidad  $\beta 1$  sobre los valores de  $V_{0.5}$ , sin embargo al aumentar la concentración del catión divalente el valor de  $V_{0.5}$  es menor en comparación al canal en ausencia de subunidad  $\beta$  (Figura 4). En otras palabras, en presencia de la subunidad  $\beta 1$  el calcio tiene un mayor efecto sobre los valores de  $V_{0.5}$ , efecto que sólo se aprecia en concentraciones de calcio superiores a 100 nM (Meera y col., 1996). Sin embargo, estudios más detallados mostraron que en ausencia de calcio la subunidad  $\beta 1$  también modula la  $P_{(0)}$  del canal. A potenciales de membrana menores de 150 mV, la  $P_{(0)}$  es mayor en presencia de la subunidad  $\beta 1$ . Al mismo tiempo, el  $V_{0.5}$  es más positivo y la dependencia de potencial es menor (Figura 4) (Cox y Aldrich, 2000; Nimigean y Magleby, 2000).

Hay también otros efectos de la subunidad  $\beta 1$  sobre el canal MaxiK que no de-



**Figura 4. Efecto de la subunidad  $\beta 1$  sobre la sensibilidad a calcio y potencial del canal MaxiK.**

Se grafica curvas idealizadas de  $P_{(0)}$  vs. potencial de membrana para canales compuestos por subunidades  $\alpha$  solas o por subunidades  $\alpha + \beta 1$ , en dos concentraciones de calcio intracelular. Las curvas fueron generadas de la misma manera que en la Figura 3.



penden de la concentración de calcio. Por una parte, la relajación de las corrientes macroscópicas ante pulsos cuadrados de potencial es mucho más lenta en presencia de la subunidad  $\beta 1$  que en ausencia de ésta. Además, la subunidad  $\beta 1$  modula la interacción del canal con toxinas y drogas: aumenta la afinidad por las toxinas CTX (subunidad  $\beta 1$  bovina, pero no la humana) e iberiotoxina (IbTX) (Dworetzky y col., 1996; Hanner y col., 1997) y permite la activación del canal por dehidrosoyasaponina-I (DHS-I) (Tanaka y col., 1997) y por estrógenos y compuestos relacionados (Valverde y col., 1999; Dick y col., 2001; Dick, 2002).

### 3.2. La subunidad $\beta 2$

La subunidad  $\beta 2$  del canal MaxiK fue clonada buscando secuencias similares a la subunidad  $\beta 1$  en bases de datos de ESTs humanos (Wallner y col., 1999; Xia y col., 1999; Uebele y col., 2000). Se encuentra preferentemente en riñón, páncreas y cerebro, y su principal característica es un motivo o dominio de inactivación rápida en su extremo N-terminal. Debido a este dominio, las corrientes del canal en presencia de la subunidad  $\beta 2$  se inactivan rápidamente luego de evocarlas con un pulso de potencial. La inactivación es un proceso diferente al cierre de los canales; en este caso la vía de conducción del canal es ocluida por el extremo N-terminal de la subunidad  $\beta 2$  y no por la compuerta natural del canal, que permanece abierta. A este fenómeno, característico de muchos canales, se le denomina 'inactivación rápida', 'inactivación tipo N' o 'inactivación de bola y cadena' (Bezanilla y Armstrong, 1977; Hille, 2001). El fenómeno de inactivación desaparece completamente si se remueve el extremo N-terminal de la subunidad  $\beta 2$ , ya sea por tratamiento con tripsina o por técnicas de biología molecular (Wallner y col.,

1999). Más aún, basta con eliminar o sustituir por glicina desde el segundo al cuarto aminoácido de la subunidad  $\beta 2$  (secuencia FIW) para que la inactivación desaparezca casi por completo (Xia y col., 2003).

Respecto a las otras propiedades del canal, la subunidad  $\beta 2$  tiene efectos similares a los de la  $\beta 1$ . Ésta también aumenta el efecto del calcio sobre el canal de manera similar a  $\beta 1$ , y no altera significativamente la constante de disociación de CTX, pero hace más lentas la asociación y disociación de la toxina, al igual que la subunidad  $\beta 1$  humana (Xia y col., 2000). Además, en presencia de la subunidad  $\beta 2$  se observa rectificación de las corrientes instantáneas (Zeng y col., 2002; Zeng y col., 2003), pero en menor magnitud que en presencia de las subunidades  $\beta 3$  (ver más adelante)

### 3.3. Las subunidades $\beta 3$

La búsqueda de proteínas similares a las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  llevó a la identificación de una nueva integrante de la familia de las subunidades  $\beta$  del canal MaxiK, llamada  $\beta 3$  (Riazi y col., 1999; Uebele y col., 2000; Brenner y col., 2000a). En este caso, y a diferencia de las anteriores subunidades  $\beta$ , se identificó 4 variantes de procesamiento alternativo del mRNA, que fueron denominadas  $\beta 3a$ ,  $b$ ,  $c$  y  $d$ . Las diferencias entre ellas se encuentran sólo en la longitud y la secuencia de la región N-terminal. Las subunidades  $\beta 3$  se expresan preferentemente en testículo, páncreas, riñón y bazo.

El efecto más notorio de las subunidades  $\beta 3a$ ,  $b$  y  $c$  es, al igual que la  $\beta 2$ , una inactivación rápida. La inactivación producida por  $\beta 3b$  es más rápida y hace, además, que la cinética de activación sea aparentemente más rápida (Uebele y col., 2000; Xia y col., 2000). Un efecto que todas las subunidades  $\beta 3$  tienen sobre el canal (y quizás el único

efecto de la subunidad  $\beta 3d$ ) es una rectificación de las corrientes instantáneas. Es decir, cuando el canal está abierto, la relación corriente/potencial no es una línea recta en todo el rango de potencial. A potenciales menores que  $-50$  mV, la corriente es significativamente menor que a  $+50$  mV en presencia de las subunidades  $\beta 3$  (Zeng y col., 2001; Zeng y col., 2002). Así, las corrientes del canal MaxiK se ven fuertemente disminuidas cuando hay una hiperpolarización pronunciada. Este efecto es modulado por el ambiente redox en el lado extracelular e involucra a las cisteínas extracelulares de las subunidades  $\beta 3$  (Zeng y col., 2003).

Ninguna de las subunidades  $\beta 3$  produce cambios notorios en el efecto que el calcio tiene sobre el canal MaxiK (Uebele y col., 2000; Brenner y col., 2000a).

#### **3.4. La subunidad $\beta 4$**

La subunidad  $\beta 4$  fue clonada junto con la subunidad  $\beta 3$  y con la misma metodología (Meera y col., 2000; Weiger y col., 2000; Brenner y col., 2000a). Se expresa abundantemente en el cerebro. El efecto que tiene sobre la sensibilidad a calcio del canal es bifásico: en concentraciones de calcio menores de  $10$   $\mu$ M, los valores de  $V_{0.5}$  son mayores que en ausencia de subunidad  $\beta$  (efecto opuesto al de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ); mientras que por sobre  $10$   $\mu$ M calcio los valores de  $V_{0.5}$  se hacen más negativos (Weiger y col., 2000; Brenner y col., 2000a). El acoplamiento funcional de la subunidad  $\beta 4$  con el canal es además regulado por fosforilación de residuos en ambos dominios intracelulares de  $\beta 4$  (Jin y col., 2002).

La subunidad  $\beta 4$  también modula la unión de CTX e IbTX al canal, haciendo mucho más lenta la cinética de unión y disociación (Meera y col., 2000), y también permite la activación del canal por 17- $\beta$ -estradiol (Behrens y col., 2000).

#### **4. El Canal MaxiK en la Vasodilatación y el Efecto de Estrógenos**

##### **4.1. Control fisiológico de la presión arterial**

La presión arterial está comandada por dos factores: la fuerza impulsora impartida por el corazón y la resistencia periférica del sistema vascular, que depende del diámetro de vasos, arterias pequeñas y arteriolas. El diámetro de vasos y arterias está gobernado por el tono contráctil de la musculatura lisa que forma la pared vascular. La contracción de las fibras musculares está controlada por la concentración del calcio intracelular. Este catión, por medio de la calmodulina, activa la quinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK), permitiendo el movimiento de las cadenas de miosina respecto a las de actina. Este proceso se mantendrá mientras exista ATP y se mantengan los niveles de calcio elevados por encima de los valores basales. A diferencia de otros tejidos musculares, el músculo liso vascular presenta un tono contráctil basal, caracterizado por niveles de calcio ligeramente superiores a los observados en un estado de relajación muscular. Cualquier estímulo que determine un aumento de la concentración intracelular de calcio aumentará la contracción muscular, disminuirá el diámetro de los vasos y aumentará la presión arterial. Este estímulo puede ser una despolarización que active canales de calcio dependientes de voltaje (aumentando la entrada de calcio desde el medio extracelular),

de manera que el potencial de membrana de las células de la musculatura lisa vascular es un factor determinante en la regulación de la presión arterial.

#### 4.2. Las 'chispas de calcio' y el canal MaxiK

No sólo los aumentos globales del calcio intracelular tienen un papel en la señalización por calcio; existen aumentos transitorios y localizados ('chispas de calcio') que en los últimos años han cobrado gran importancia en la fisiología de células musculares, particularmente en el músculo liso (Jaggar y col., 2000). Una chispa de calcio consiste en un aumento en la concentración de calcio a valores entre 10 y 100  $\mu\text{M}$  en una región muy pequeña (~ 1% del volumen celular). Se produce por la apertura de un grupo de canales de calcio sensibles a ryanodina localizados en el retículo sarcoplásmico. Si bien las chispas de calcio producen un leve aumento global en el calcio intracelular, su efecto más pronunciado es el de activar grupos de canales MaxiK localizados precisamente en las cercanías del lugar en donde se produce la chispa. El aumento localizado de la concentración de calcio induce entonces corrientes de salida (de potasio) espontáneas y transitorias (*spontaneous transient outward currents*, STOCs), que hiperpolarizan la membrana celular. La magnitud y frecuencia de estas chispas de calcio tiene entonces un gran impacto en el potencial de membrana y, por lo tanto, en el tono contráctil de la musculatura lisa (Jaggar y col., 2000).

Para una correcta señalización por calcio del sistema (chispa de calcio – STOC – hiperpolarización), la sensibilidad de los canales MaxiK a los aumentos de calcio debe estar ajustada finamente. Este es el papel de la subunidad  $\beta 1$ , ampliamente expresada en el músculo liso, ya que en su presencia el canal se abre a concentraciones de calcio a las

cuales el canal formado sólo por la subunidad  $\alpha$  no lo hace. La importancia de la subunidad  $\beta_1$  se demostró experimentalmente en el análisis de un ratón *knock-out* que carece del gen de la subunidad  $\beta_1$ . Al carecer de esta subunidad regulatoria, las chispas de calcio en la musculatura lisa no son capaces de provocar STOCs, los miocitos tienen un tono contráctil elevado y los ratones son hipertensos con respecto a ratones controles (Brenner y col., 2000b). Así también, otros estudios han correlacionado una disminución en la expresión de la subunidad  $\beta_1$  del canal MaxiK con la hipertensión (Amberg y Santana, 2003; Amberg y col., 2003).

#### **4.3. Efectos de los estrógenos en la vasoregulación**

Los estrógenos tienen un conocido efecto protector contra enfermedades cardiovasculares: las mujeres en edad fértil –y aquellas que después de la menopausia reciben terapia de reemplazo hormonal– tienen una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares. Esto se debe a diversos efectos que las hormonas femeninas tienen sobre el sistema vascular, que incluyen efectos genómicos a largo plazo, y efectos rápidos no genómicos (Orshal y Khalil, 2004). Entre los mecanismos reportados se encuentran la modulación del metabolismo de los lípidos y diversos cambios en el endotelio y la musculatura lisa vascular. Estos últimos conducen a un menor tono vascular y la consiguiente vasodilatación (Pham y Rosen, 2002; Orshal y Khalil, 2004).

Desde hace muchos años los efectos no genómicos de 17- $\beta$ -estradiol y otras hormonas esteroidales han captado la atención (revisados en Falkenstein y col., 2000; Losel y col., 2003). Estos son efectos que no son mediados por la vía de acción clásica de estas hormonas, que es la regulación de la expresión génica, sino por otros mecanis-

mos de los cuales sólo en algunos casos se conoce el mecanismo molecular. Los efectos no genómicos se observan en el lapso de minutos o segundos después de aplicar la hormona, mientras que los efectos genómicos tardan horas o incluso días. Particularmente y respecto a la vasoregulación, se ha reportado en diversos modelos experimentales que 17- $\beta$ -estradiol produce una vasodilatación rápida de la musculatura lisa vascular en forma independiente del endotelio (Jiang y col., 1991; Gilligan y col., 1994; Shaw y col., 2000). Esta vasodilatación rápida se ha explicado por inhibición de canales de calcio tipo L (Sheldon y Argentieri, 1995; Ruehlmann y col., 1998) y activación de canales MaxiK por un mecanismo dependiente de fosforilación y mensajeros intracelulares (White y col., 1995; Rosenfeld y col., 2000). Sin embargo, a nivel molecular no se ha identificado ningún receptor de membrana para estradiol que dé cuenta del fenómeno.

#### 4.4. Activación del canal MaxiK por 17- $\beta$ -estradiol

En un trabajo de nuestro laboratorio mostramos que el 17- $\beta$ -estradiol puede activar al canal MaxiK cuando éste es expresado en oocitos de *X. laevis*. Este efecto requiere de la presencia de la subunidad  $\beta$ 1, y no es mediado por segundos mensajeros ya que el 17- $\beta$ -estradiol activa al canal MaxiK reconstituido en bicapas lipídicas, método experimental en donde todo tipo de mensajeros intracelulares está ausente (Valverde y col., 1999). La activación también se observó usando estradiol conjugado químicamente con BSA, compuesto que no atraviesa la membrana plasmática. En este caso, la activación se observó al aplicar el compuesto por el lado extracelular pero no por el intracelular. Estas y otras evidencias presentadas sugieren que, en presencia de la subunidad  $\beta$ 1, el 17- $\beta$ -estradiol interactúa directamente con el canal MaxiK por el lado extracelular de la mem-

brana. Si bien la afinidad de esta interacción ( $EC_{50} = 2,6 \mu M$ ) es baja comparada con la interacción de estradiol con sus receptores clásicos, se encuentra perfectamente dentro del rango reportado para el efecto vasodilatador de 17- $\beta$ -estradiol en algunos sistemas (Salas y col., 1994; Kitazawa y col., 1997)

De manera similar, otros trabajos han reportado que, en presencia de la subunidad  $\beta 1$ , el canal MaxiK puede ser activado por tamoxifeno (un antagonista no esteroidal de 17- $\beta$ -estradiol) y Faslodex (ICI 182780, un antagonista esteroidal), también en presencia de la subunidad  $\beta 1$  (Dick y col., 2001; Dick y Sanders, 2001; Dick, 2002). El efecto de tamoxifeno también sería solo por el lado extracelular de la membrana (Dick y col., 2002). Además, se ha reportado activación del canal MaxiK por 17- $\beta$ -estradiol en presencia de la subunidad  $\beta 4$  (Behrens y col., 2000).

Todos estos resultados proponen a la subunidad  $\beta 1$  del canal MaxiK como la identidad molecular de al menos uno de los objetivos del 17- $\beta$ -estradiol y compuestos relacionados en la musculatura lisa vascular. Es posible que el efecto vasodilatador de los estrógenos sea la suma de muchos mecanismos, pero la investigación de la subunidad  $\beta 1$  como receptor de 17- $\beta$ -estradiol arrojará importantes luces sobre la interacción hormona-proteína y la modulación del canal MaxiK. Igualmente, sentará las bases para el desarrollo de nuevos fármacos vasodilatadores.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo General e Hipótesis de Trabajo**

El Objetivo General propuesto en este trabajo de tesis es **definir bases moleculares para los efectos que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  tienen sobre las dependencias a calcio y potencial del canal MaxiK y sobre su activación por estrógenos.**

Este objetivo se desarrollará sobre la base de la hipótesis de que los distintos efectos que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  tienen sobre las propiedades biofísicas del canal MaxiK, se originan en interacciones moleculares específicas. En otras palabras, este trabajo de tesis buscará determinantes moleculares para algunas de las interacciones entre el canal MaxiK y sus subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Esta búsqueda se centrará en: a) el efecto de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  sobre la compuerta de activación del canal y sus sensores de calcio y de potencial, b) determinantes moleculares de la activación del canal MaxiK por 17- $\beta$ -estradiol y compuestos relacionados y c) la identificación de dominios funcionales en las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  que se asocien a los efectos previamente mencionados. Cada uno de estos puntos se desarrolla en los Objetivos Específicos.

### **5.2. Objetivos Específicos**

**1) Caracterizar biofísicamente el efecto de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  sobre las características de activación macroscópica del canal MaxiK, interpretando los resultados en el marco del modelo de activación alostérica por calcio y potencial.**

Como se mencionó en la sección 3.2, las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 1$  del canal tienen efectos aparentemente similares sobre la dependencia a calcio y potencial del canal MaxiK. Sin embargo, éstos han sido estudiados de manera detallada sólo para la subuni-

dad  $\beta 1$  y es necesario un estudio detallado de los efectos de la subunidad  $\beta 2$  para establecer similitudes y diferencias que puedan entregar pistas importantes sobre el funcionamiento del canal. Tampoco hay datos acerca de los efectos que tiene la subunidad  $\beta 2$  sobre la cinética macroscópica de apertura y cierre del canal, ya que sólo se ha estudiado en detalle el fenómeno de inactivación.

Se relacionará los efectos determinados con las distintas maquinarias moleculares que se han identificado en el canal MaxiK: la compuerta, los sensores de potencial y los sensores o sitios de unión de calcio. Esto se logrará estudiando en detalle los efectos de las subunidades  $\beta$  y determinando qué cambios en los parámetros del modelo de activación alostérica (descrito en la sección 2.2) pueden dar cuenta de los efectos observados.

## **2) Estudio Farmacológico del efecto de estrógenos sobre el canal MaxiK.**

Se pretende, por una parte, identificar los grupos químicos de la molécula de 17- $\beta$ -estradiol necesarios para su unión a la subunidad  $\beta 1$  del canal MaxiK. Esto se hará determinando el efecto que otros agonistas y antagonistas de 17- $\beta$ -estradiol tienen sobre el canal MaxiK en presencia de su subunidad  $\beta 1$ . Por otra parte se estudiará el efecto de estos compuestos en presencia de otras subunidades  $\beta$ , como un primer paso en la definición de los dominios de la subunidad  $\beta 1$  que son necesarios para la activación del canal por estrógenos.

## **3) Asociar los efectos estudiados de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ a dominios discretos de éstas.**

El tercer objetivo específico pondrá a prueba la hipótesis de trabajo desde el punto de vista de las subunidades  $\beta$ , es decir, se buscará si los efectos estudiados pueden

asociarse a algún(os) dominio(s) de éstas. La herramienta experimental de este objetivo será la construcción y caracterización de subunidades  $\beta$  quiméricas compuestas por distintas partes de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Se abordarán todas las diferencias entre ambas subunidades que se encuentren en el desarrollo de los objetivos específicos 1 y 2, incluyendo efectos en la sensibilidad a calcio y potencial del canal, cambios en la cinética macroscópica y el efecto de 17- $\beta$ -estradiol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

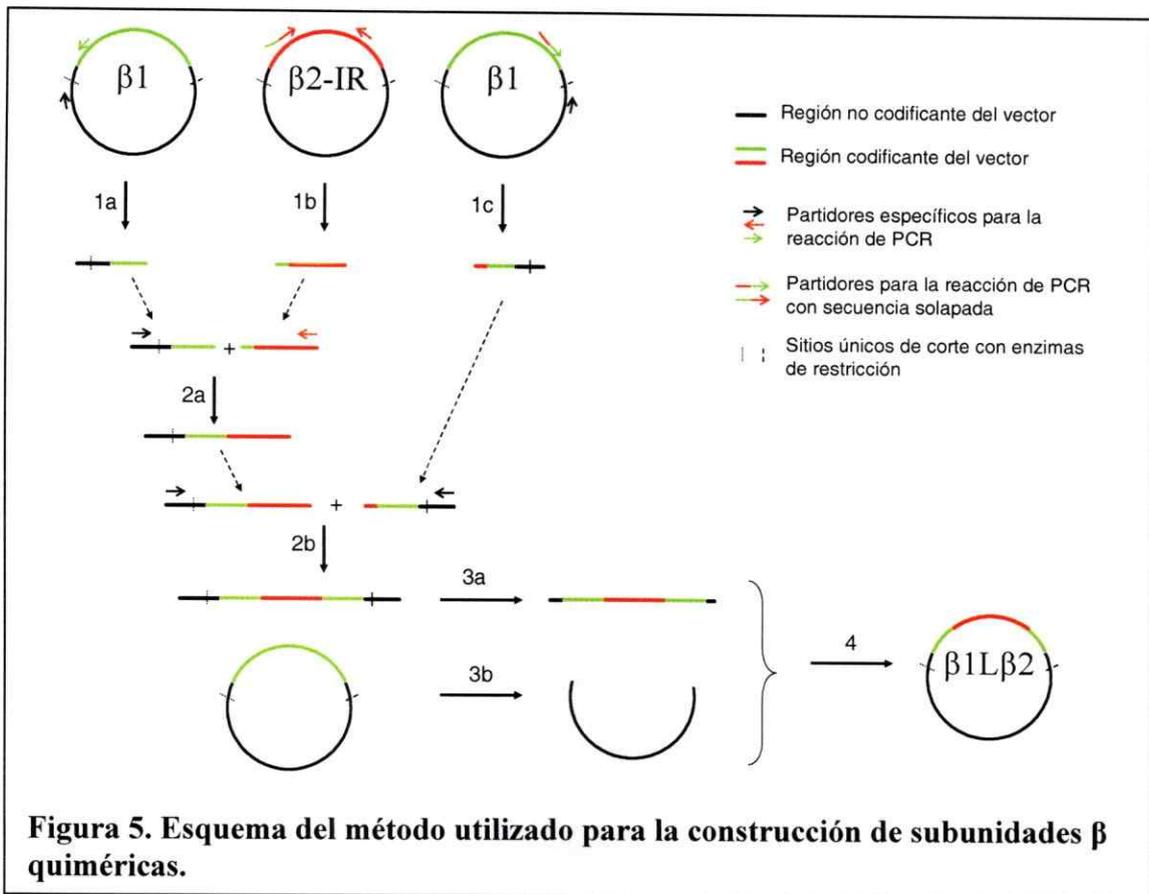
### 1. Biología Molecular

#### 1.1. Clones y vectores utilizados

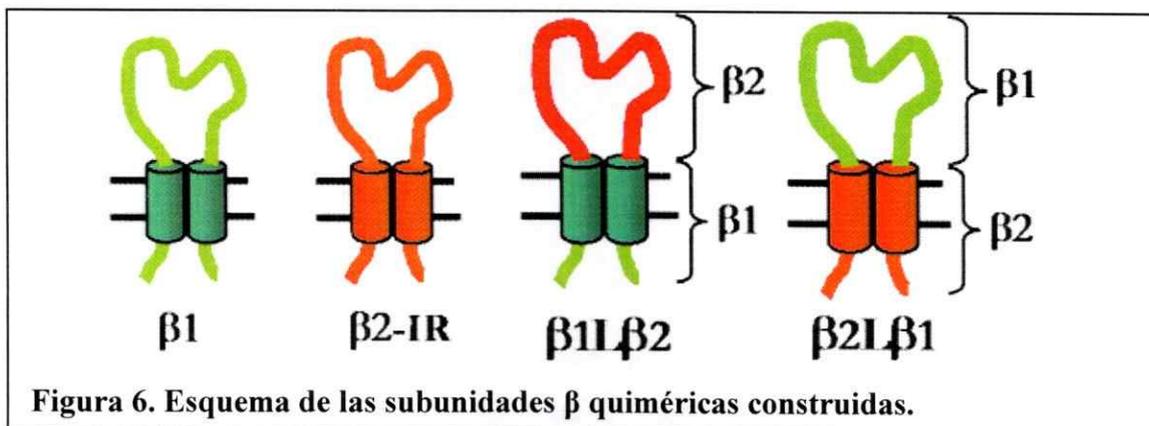
Se utilizaron los cDNAs de subunidad  $\alpha$  de BK de miometrio humano, la subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$  de humano y la subunidad  $\beta 2$  de humano sin dominio de inactivación rápida ( $\beta 2IR$ ). Todos éstos fueron donados por la Dra. Ligia Toro (UCLA) en los vectores pGEMzf9- (utilizado para transcripción *in vitro*) y pcDNA3 (utilizado para transfección de células HEK293).

#### 1.2. Construcción de subunidades $\beta$ quiméricas.

Se utilizó el método de solapamiento de partidores para obtener subunidades  $\beta$  quiméricas que contienen distintos fragmentos de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$ . El método consiste en obtener por reacción en cadena de polimerasa (PCR) los fragmentos que se desea combinar de las subunidades  $\beta$  nativas (Figura 5, reacciones 1a, 1b y 1c). Algunos de los partidores utilizados contienen una secuencia solapada, es decir, que es complementaria con el DNA de la otra subunidad  $\beta$  (partidores de 2 colores en la Figura 5). De esta manera, los fragmentos obtenidos pueden combinarse en sendas reacciones de PCR (2a y 2b) hasta formar un solo producto de PCR que contiene la secuencia de DNA para una proteína quimérica. Luego, este fragmento es insertado en uno de los vectores de origen mediante corte con enzimas de restricción (3a, 3b) y una posterior ligación (4).



Con el método descrito se obtuvo las quimeras  $\beta 2L\beta 1$  ( $\beta 2$ -IR con el lazo extracelular de  $\beta 1$ ) y  $\beta 1L\beta 2$  (opuesta a la anterior). Un esquema de éstas se puede ver en la Figura 6.



## 2. Expresión heteróloga y electrofisiología.

### 2.1. Expresión heteróloga

Se han utilizado dos sistemas de expresión: (a) transcripción *in vitro* (mMES-SAGE mMACHINE, Ambion) para obtener mRNAs que fueron inyectados en oocitos de *X. leavis* (Stühmer y Parekh, 1995) y (b) transfección de células HEK293 con los DNAs que codifican para la subunidad  $\alpha$  y distintas subunidades  $\beta$  del canal MaxiK. La mayor parte de los resultados presentados en este trabajo fueron realizados expresando el canal MaxiK en oocitos. Los experimentos realizados en células HEK293 se encuentran especificados en las leyendas de figuras.

La transfección de DNA se realizó con Lipofectamina Plus (Invitrogen), usando las cantidades de DNA recomendadas por el fabricante. Al contransfectar subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , se usó una razón  $\alpha:\beta=1:2$  en  $\mu\text{g}$ .

Para la microinyección de cRNA en oocitos, se inyectó 0.75 a 2 ng de cRNA de subunidad  $\alpha$  por oocito; para la coexpresión con subunidades  $\beta$ , se inyectó 0.5-1.5ng de cRNA de  $\alpha$  + 2 a 3ng de cRNA de subunidad  $\beta$  por oocito. Se probó razones peso/peso  $\alpha:\beta$  de 1:2 y 1:4 (equivalentes a una razón molar aproximada de 1:6 y 1:12, respectivamente), sin encontrar diferencias entre ambas condiciones. Para los experimentos en los cuales se necesitó una mayor expresión de canales, se inyectó 30 ng de subunidad  $\alpha$  sola ó 12.5 ng de subunidad  $\alpha$  + 25 ng de subunidad  $\beta$  por oocito. La concentración del cRNA se midió espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm y éste fue disuelto en agua libre de nucleasas (Winkler).

## 2.2. Registros electrofisiológicos

Las corrientes macroscópicas se registraron usando la técnica de *patch-clamp* 1 a 4 días después de la transfección del DNA o inyección del cRNA. Para el estudio del efecto de estradiol y tamoxifeno sobre los canales se usó la configuración *outside-out*, y para el estudio del efecto del calcio intracelular sobre el canal se usó la configuración *inside-out*.

Las pipetas de *patch* se fabricaron en un estirador horizontal de pipetas (Sutter Instruments Co., modelo P80/PC). Se usó capilares de vidrio borosilicato de composición Corning 7740 (Pyrex) y composición Corning 8520 (Warner Instruments). La resistencia de las pipetas usadas fue de 0.8 a 1.5 MOhm (usando soluciones de  $K^+$  110 mM).

Los registros de corriente se hicieron con un equipo EPC-7 (List-Medical), pasados por un filtro pasabajo de 8 polos (Frequency Devices) y adquiridos en un computador mediante una tarjeta NI-PCI-6014 (National Instruments) y un software propio desarrollado en el ambiente de programación LabView (National Instruments). Se analizaron con los programas Analysis (desarrollado por Viktor Grabarchuk en el laboratorio del Dr. Francisco Bezanilla, UCLA) y pClamp 9 (Axon Instruments).

## 2.3. Soluciones de registro electrofisiológico

Para los registros electrofisiológicos, las soluciones utilizadas fueron (en mM): 110 (oocitos) ó 140 (células) KOH, 10 HEPES, 2 KCl y 5 EGTA (calcio 0 a 500nM), HEDTA (calcio libre entre 500 nM y 20  $\mu$ M), ó NTA (calcio > 20  $\mu$ M); todas ajustadas a pH 7.4 con ácido metanosulfónico. Dependiendo de la magnitud de las corrientes re-

gistradas, y para evitar errores de caída de potencial por la resistencia en serie, en algunos experimentos en oocitos se utilizó soluciones conteniendo 36 KOH, 74 N-metil-D-glucamina y el resto de los componentes iguales a los ya descritos. Como solución de pipeta se usó siempre una de 100 nM  $\text{Ca}^{2+}$  o menor.

La concentración de calcio se ajustó agregando  $\text{CaCl}_2$  y calculando la concentración de calcio libre con el programa WinMaxChelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>). Posteriormente fue comprobada con un electrodo de calcio (World Precision Instruments).

En los experimentos con 17- $\beta$ -estradiol, éste se diluyó en etanol puro para tener una solución stock 5 ó 10 mM, que luego fue diluida en la solución de registro correspondiente para alcanzar la concentración deseada de 17 $\beta$ E. En el caso de Tamoxifeno, se usó una solución 5 mM en etanol al 70%. En ambos casos, el etanol en la solución de registro no superó el 0,1%; concentración que no tiene efecto sobre el canal MaxiK en las condiciones estudiadas (no mostrado).

### **3. Análisis de los datos**

#### **3.1. Análisis de propiedades en estado estacionario**

Para determinar la  $P_{(0)}$  del canal y su dependencia de calcio y potencial, se aplicó a los parches de membrana un protocolo de colas. Este consiste en aplicar un pulso variable de potencial (pulso de prueba) que abre el canal, y luego de que se alcanza el estado estacionario se aplica un pulso fijo (cola) que cierra el canal, típicamente a -60 mV. En la Figura 7 (página 36) se muestran de manera gráfica algunos ejemplos de protocolos de cola aplicados.

Para cada experimento los valores instantáneos de corriente de cola fueron graficados contra el potencial de prueba y se les restó la recta definida por 4 a 10 puntos de menor potencial, para eliminar cualquier componente lineal proveniente de fugas de corriente en el parche o de corrientes originadas por la capacidad de la membrana. Se utilizó la función Solver de Microsoft Excel para ajustar los datos corregidos a una ecuación de Boltzmann:

$$G = \frac{G_{max}}{1 + \exp\left(\frac{zF(V - V_{0.5})}{RT}\right)} \quad (2),$$

en donde  $G_{max}$  es la conductancia máxima obtenida,  $z$  es una constante que da cuenta de la dependencia de potencial,  $V_{0.5}$  es el potencial en que se obtiene la mitad de la conductancia,  $F$  es la constante de Faraday (96500 C/mol),  $R$  es la constante de gases (8.314 J/(mol×K)) y  $T$  la temperatura absoluta (usualmente 295K). Del ajuste de los datos de  $G$  vs.  $V$  se obtuvo los valores de  $G_{max}$ ,  $z$  y  $V_{0.5}$ . Para las concentraciones más bajas de calcio sólo se pudo colectar datos de conductancias muy bajas por los que la estimación de  $G_{max}$  es incierta o imposible mediante ajuste no lineal. En estos casos se fijó  $G_{max}$  usando el valor obtenido a concentraciones de calcio más altas en el mismo experimento. Para los análisis posteriores, se trabajó con los valores de  $G/G_{max}$ .

### 3.2. Ajuste y análisis estadístico de los valores de $V_{0.5}$

Para caracterizar el cambio de energía libre  $\Delta G$  inducido por el aumento de la concentración de calcio, se usó el software Prism 4.0 (GraphPad) para ajustar los datos de  $\Delta G/[Ca^{2+}]$  a la siguiente ecuación sigmoidea de concentración-efecto:

$$\Delta G = \Delta G^0 - \frac{\Delta G^0 - \Delta G^\infty}{1 + \left( \frac{10^{\log EC_{50}}}{10^{\log [Ca^{2+}]}} \right)^n} \quad (3)$$

En la ecuación (3),  $\Delta G^0$  y  $\Delta G^\infty$  son los valores de  $\Delta G$  en ausencia de calcio y en calcio saturante, respectivamente;  $EC_{50}$  es la concentración de calcio en la que se obtiene la mitad del efecto y  $n$  es el número de Hill o coeficiente de cooperatividad. Ya que las concentraciones de calcio usadas están distribuidas uniformemente en una escala logarítmica, se ajustó los datos de  $\Delta G$  contra  $\log[Ca^{2+}]$  y se obtuvo un  $\log EC_{50}$  que fue convertido a  $EC_{50}$  aplicando antilogaritmo. De esta manera se le dio el mismo peso estadístico a los datos en toda la escala de concentraciones de calcio.

### 3.3. Prueba estadística F de suma de cuadrados

Para probar estadísticamente la diferencia de un parámetro en el ajuste de 2 ó más grupos de datos, se usó una prueba  $F$  de suma de cuadrados para comparar ajustes independientes contra un ajuste global. Esta prueba, realizada de manera automática por el programa Prism 4.0 (GraphPad), consiste en realizar dos ajustes: en uno se ajusta cada conjunto de datos de manera independiente y en el otro se realiza un ajuste simultáneo de todos los datos buscando el mejor ajuste en el que un parámetro es el mismo para todos los conjuntos de datos. Con la razón entre las sumas de cuadrados obtenidas en cada ajuste, normalizadas por los grados de libertad, se obtiene una razón  $F$ , que indica cuál de los dos ajustes es más probable. Este valor es convertido luego a una probabilidad  $P$ .

### 3.4. Análisis de pendiente límite

Para determinar la dependencia de potencial límite del canal MaxiK se necesita determinar valores de  $P_{(0)}$  muy bajos, cercanos a  $10^{-6}$ . Para esto se registró los eventos unitarios de apertura de canales en parches que contienen cientos o miles de canales en condiciones de probabilidad del estado abierto muy baja. Para la subunidad  $\alpha$ , los datos se adquirieron digitalmente a razón de 33.333 ó 50.000 muestras por segundo y fueron filtrados a 6.6 ó 10kHz. Para canales  $\alpha+\beta 1$  y  $\alpha+\beta 2IR$ , se adquirió a 20.000 muestras por segundo y se filtró a 3 ó 4kHz. Se construyó histogramas de amplitud de los registros y a los picos observados se les asignó los estados de conductancia  $k=0,1,2,3\dots$  correspondientes al número de canales abiertos, desde  $k=0$  para el pico de menor valor de corriente. La probabilidad ( $P_k$ ) de cada estado abierto  $k$  se determinó como la razón entre el área del pico (con un criterio de  $\frac{1}{2}$  de la amplitud) y el área total. Luego, la probabilidad total de encontrar un canal abierto ( $NP_{(0)}$ ) se calculó con la fórmula

$$NP_{(0)} = \sum_k kP_k .$$

Donde N es el número de canales presentes en la membrana. Para los potenciales mayores a 50 mV, se calculó  $NP_{(0)}$  midiendo corrientes macroscópicas con un protocolo de colas, y normalizando el valor de corriente de cola por la conductancia unitaria (se supuso igual a 220 pS) y el potencial de cola.

En algunos experimentos, se calculó el número de canales en el parche ( $N$ ) subiendo la concentración de calcio intracelular a 3  $\mu\text{M}$  y efectuando un análisis de ruido no estacionario (Alvarez y col., 2002), o subiendo el calcio a 500  $\mu\text{M}$  y midiendo la conductancia del parche entre -10 y +10 mV. De esta manera, se pudo establecer un va-

lor de  $P_{(0)}$  que luego sirvió para normalizar y promediar el resto de los experimentos. Aún así, los valores absolutos de  $P_{(0)}$  pueden contener errores que hacen poco confiable la determinación del parámetro  $L_0$  por este método (ver texto y ecuación (6) en Resultados).

### 3.5. Ajuste al modelo alostérico de 70 estados

Para cada concentración de calcio se obtuvo un valor promedio de  $V_{0.5} (\langle V_{0.5} \rangle)$  y luego cada curva  $G/V$  se desplazó en el eje de potencial en un  $\Delta V = V_{0.5} - \langle V_{0.5} \rangle$ . De esta manera, se eliminó de los datos la variabilidad de  $V_{0.5}$  típica del canal MaxiK y al mismo tiempo se preservó la forma de las curvas  $G/V$ . Cada curva, constituida hasta por 300 puntos, fue reducida a 40 puntos usando la función *smooth* del programa Sigmaplot 8 (SPSS Inc.). Estos conjuntos de 40 puntos fueron ajustados a la ecuación (1), por minimización de los cuadrados de las diferencias con un algoritmo Marquardt-Levenberg en el programa SigmaPlot 8 (SPSS Inc.). Las restricciones impuestas a los parámetros fueron: las constantes de equilibrio  $J_0$ ,  $L_0$  y  $K_d$  se restringieron a valores mayores que 0;  $z_J$  se supuso mayor que 0.3, mientras que  $z_L$ , sobre la base de los resultados de pendiente límite, se restringió a un valor entre 0.25 y 0.35. Finalmente, las constantes alostéricas C, D y E fueron sólo restringidas a ser mayores que 0. Al ajustar, se probaron varios sets de parámetros iniciales. Mientras algunos originaron soluciones con valores fuera de lo razonable, otras convergieron a conjuntos de parámetros muy similares. Entre estas últimas se escogió el ajuste con el menor valor de  $r^2$  informado por el programa.

### 3.6. Análisis de la cinética de las corrientes

Las corrientes macroscópicas de activación del canal fueron ajustadas a una ecuación exponencial simple con un retraso en la activación, de la forma

$$I(t) = I_{\infty} \left( 1 - \exp\left(\frac{t - \Delta t}{\tau_{act}}\right) \right) \quad (4),$$

en donde  $\tau_{act}$  es la constante de tiempo de activación ( $\tau_{act} = k_{act}^{-1}$ ) y  $\Delta t$  es el retraso en la activación, relacionado con el tiempo entre la aplicación del potencial y el establecimiento de un curso exponencial simple en la corriente. El ajuste se realizó con el programa Prism 4.0 (GraphPad).

La corriente de desactivación o cierre fue ajustada a una exponencial simple, sin cuantificar el retraso, utilizando el programa Clampfit 9 (Axon Instruments).

## RESULTADOS

### 1. Efectos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ -IR sobre el canal MaxiK

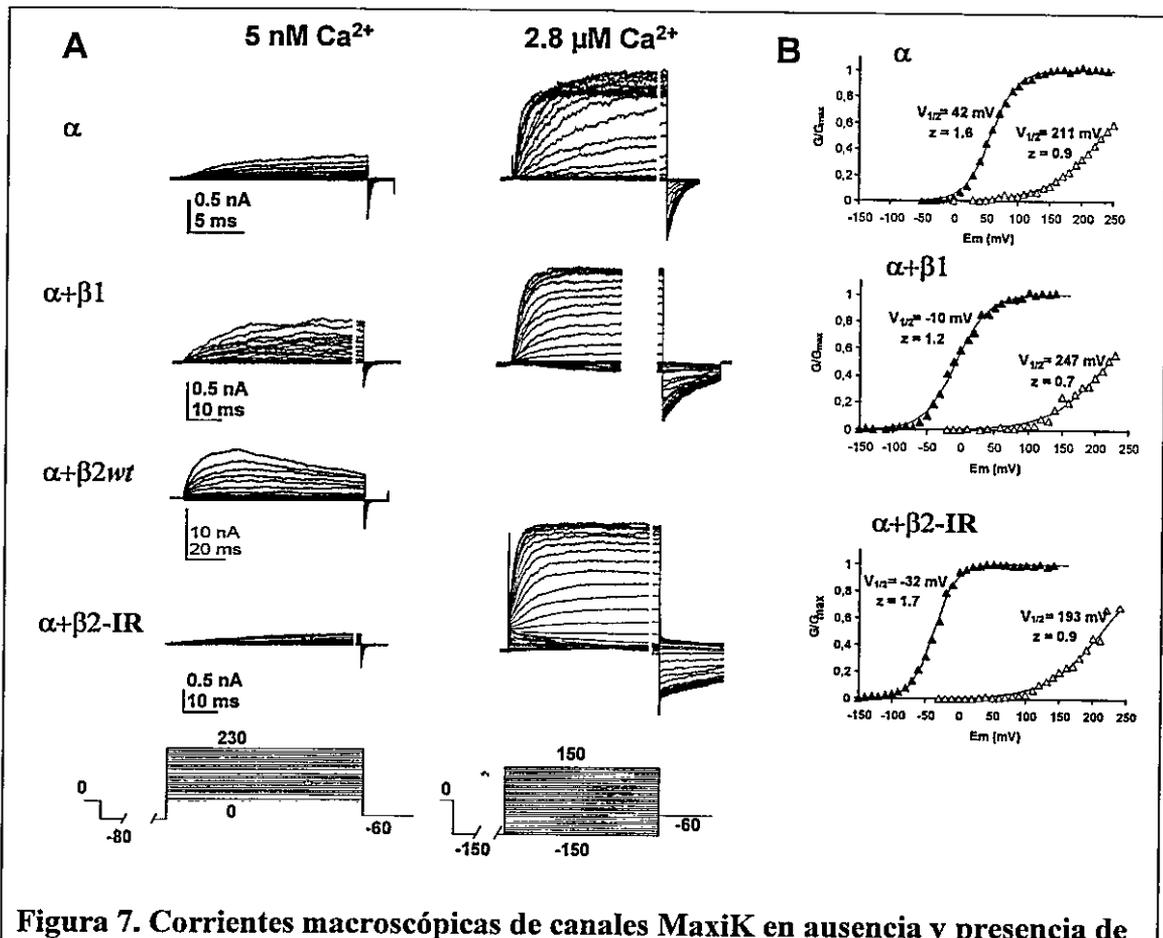
#### 1.1. Efectos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ sobre las propiedades del canal en estado estacionario.

En la Figura 7 se resumen los efectos de la concentración de calcio intracelular y el potencial de membrana sobre el canal MaxiK. Al despolarizar la membrana celular la probabilidad de encontrar el canal abierto ( $P_{(O)}$ ) se incrementa incluso en la virtual ausencia de calcio intracelular (Figura 7A,  $\alpha$ ). Al aumentar la concentración de calcio intracelular la  $P_{(O)}$  aumenta a potenciales menores, es decir, se necesita menos potencial para abrir el canal y la relación  $P_{(O)}/V$  se desplaza hacia la izquierda. Para cuantificar este desplazamiento se puede ajustar los datos a una función de Boltzmann (ecuación (2)) y obtener el  $V_{0.5}$  o potencial en que  $P_{(O)}=0.5$ . Este valor, relacionado a la energía necesaria para abrir el canal, se hace menor cuando la concentración de calcio aumenta.

En presencia de la subunidad  $\beta 1$  el efecto más evidente es un mayor desplazamiento de la curva de  $P_{(O)}/V$  al aumentar la concentración de calcio; a  $2,8\mu\text{M}$  el valor de  $V_{0.5}$  es menor para  $\alpha+\beta 1$  que para  $\alpha$  (Figura 7B,  $\alpha+\beta 1$ ). Sin embargo, si la concentración de calcio es de  $5\text{ nM}$  el efecto de la subunidad  $\beta 1$  es el inverso: el valor de  $V_{0.5}$  es mayor para  $\alpha+\beta 1$  comparado con  $\alpha$ ; la curva se desplaza hacia la derecha. Además se observa

que la dependencia de potencial (indicada por el valor de  $z$  en el ajuste a la función de Boltzmann) se hace menor en presencia de la subunidad  $\beta 1$ .

La subunidad  $\beta 2$  tiene en su extremo N-terminal un motivo de inactivación rápida, de manera que al coexpresarla con el canal las corrientes evocadas por despolariza-



**Figura 7. Corrientes macroscópicas de canales MaxiK en ausencia y presencia de subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 2\text{IR}$ .**

**A**, Corrientes registradas en parches de membrana en configuración *outside-out* de la técnica de *patch clamp*. La columna izquierda muestra corrientes registradas con una solución intracelular de 5 nM  $\text{Ca}^{2+}$ . A la derecha, corrientes registradas en 2.8  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Abajo se representan de manera gráfica los protocolos de potencial utilizados en cada caso. Los números indican la magnitud del potencial aplicado en mV. **B**, Gráfico de las corrientes de cola normalizadas versus el potencial de prueba de los registros mostrados en **A**. Los triángulos vacíos corresponden a 5 nM calcio y los llenos, a 2.8  $\mu\text{M}$ . Las líneas corresponden al mejor ajuste a una distribución de Boltzmann. Junto a las curvas se muestran los valores de  $V_{0.5}$  y  $z$  correspondientes al promedio de varias observaciones.

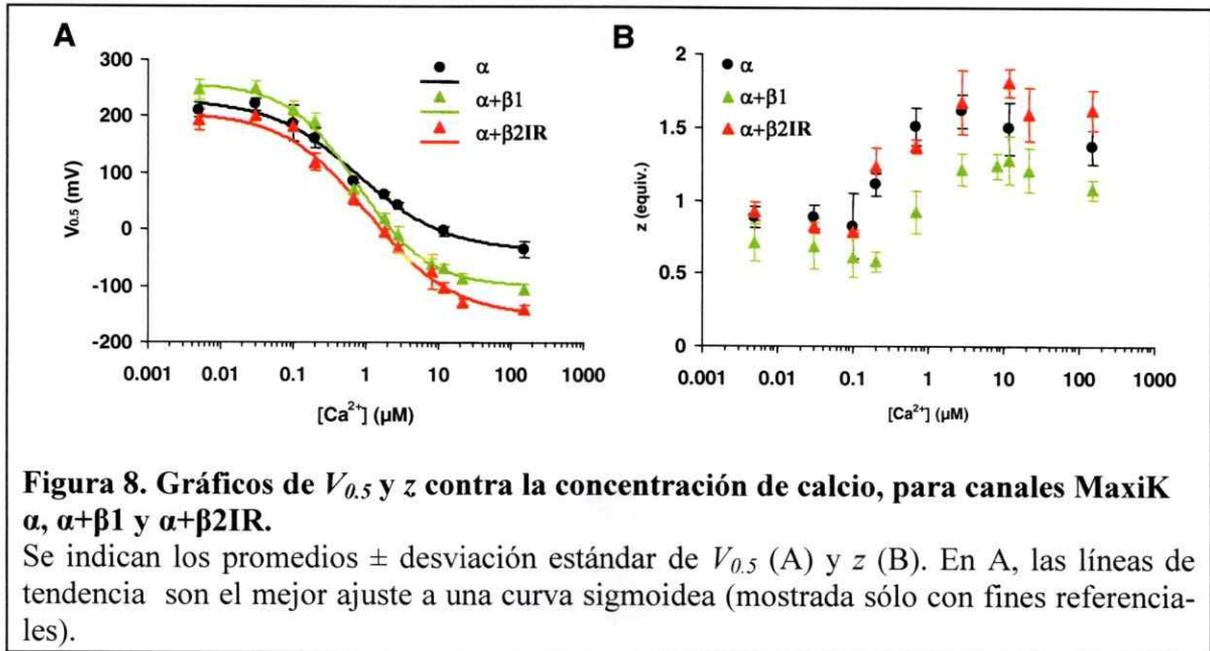
ción se inactivan rápidamente (Figura 7A,  $\alpha+\beta 2wt$ ). Para estudiar los efectos que la subunidad  $\beta 2$  tiene sobre la activación del canal MaxiK y en ausencia de inactivación, se usó una subunidad  $\beta 2$  mutada que carece de la bola o compuerta de inactivación (residuos del 2 al 19) denominada  $\beta 2IR$ . Las corrientes registradas al coexpresar canales MaxiK  $\alpha+\beta 2IR$  se observan en la Figura 7A. El efecto de la subunidad  $\beta 2IR$  sobre la relación  $P_{(O)}/V$  en calcio  $2.8 \mu M$  es similar al de  $\beta 1$ : la curva se desplaza más hacia la izquierda que con  $\alpha$  sola y el valor de  $V_{0.5}$  es menor. Sin embargo, cuando el calcio intracelular es  $5 nM$  el efecto es opuesto al de la subunidad  $\beta 1$ : la subunidad  $\beta 2IR$  desplaza la curva hacia la izquierda con un valor menor de  $V_{0.5}$ . Los valores de  $z$  en presencia de la subunidad  $\beta 2IR$  son mayores que con  $\alpha+\beta 1$  y similares a los de  $\alpha$ .

La Tabla 1 muestra los valores promedio de  $V_{0.5}$  y  $z$  para distintas concentraciones

[Ca <sup>2+</sup> ] $\mu M$	$\alpha$		$\alpha + \beta 1$		$\alpha + \beta 2IR$	
	$V_{0.5}$ mV	$z$ equiv.	$V_{0.5}$ mV	$z$ equiv.	$V_{0.5}$ mV	$z$ equiv.
0.005	211 ± 12	0.9 ± 0.07 (3)	247 ± 18	0.7 ± 0.13 (6)	193 ± 19	0.9 ± 0.06 (6)
0.03	222 ± 11	0.9 ± 0.08 (3)	251 ± 11	0.7 ± 0.16 (2)	201 ± 5	0.8 ± 0.05 (3)
0.1	187 ± 32	0.8 ± 0.23 (5)	213 ± 13	0.6 ± 0.14 (4)	183 ± 7	0.8 ± 0.01 (2)
0.2	161 ± 17	1.1 ± 0.08 (5)	191 ± 14	0.6 ± 0.07 (4)	119 ± 16	1.2 ± 0.12 (8)
0.68	86 ± 4	1.5 ± 0.13 (5)	72 ± 19	0.9 ± 0.15 (6)	54 ± 12	1.4 ± 0.05 (4)
2.8	42 ± 7	1.6 ± 0.11 (9)	-10 ± 15	1.2 ± 0.11 (7)	-32 ± 5	1.7 ± 0.22 (6)
8	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-60 ± 10	1.2 ± 0.08 (5)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
12	-2 ± 8	1.5 ± 0.18 (8)	-69 ± 8	1.3 ± 0.16 (8)	-102 ± 9	1.8 ± 0.10 (4)
22	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-86 ± 9	1.2 ± 0.15 (7)	-128 ± 6	1.6 ± 0.19 (4)
150	-36 ± 15	1.4 ± 0.11 (5)	-105 ± 9	1.1 ± 0.07 (3)	-141 ± 8	1.6 ± 0.14 (4)

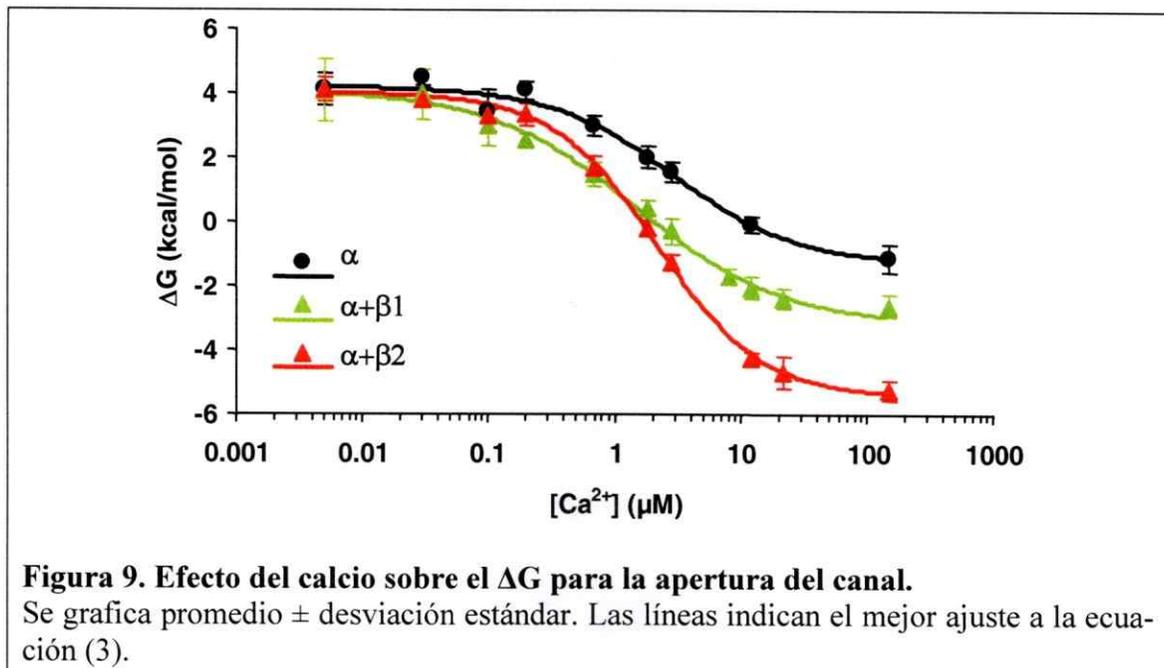
**Tabla 1. Valores de  $V_{0.5}$  y  $z$  a distintas concentraciones de calcio, para canales MaxiK  $\alpha$ ,  $\alpha+\beta 1$  y  $\alpha+\beta 2IR$**

Los valores se obtuvieron como el mejor ajuste de las curvas de  $P_{(O)}/V$  a una distribución de Boltzmann (ver Materiales y Métodos). Se indica promedio ± desviación estándar y número de experimentos. Cada experimento se hizo por triplicado. *n.d.* denota los valores que no fueron determinados



nes de calcio intracelular. Estos valores se encuentran graficados en la Figura 8. Se puede ver que los valores de  $V_{0.5}$  para  $\alpha+\beta2IR$  son siempre menores que los de  $\alpha+\beta1$  y las diferencias son mayores en las concentraciones de calcio menores a 1  $\mu M$ . Además, los valores de  $z$  para  $\alpha+\beta2IR$  son mayores que para  $\alpha+\beta1$  (y muy similares a  $\alpha$ ) en todo el intervalo de concentraciones de calcio estudiadas.

El efecto que las subunidades  $\beta1$  y  $\beta2IR$  sobre la relación  $V_{0.5}/[Ca^{2+}]$  podría ser interpretado como un aumento en la afinidad de los sitios para unión de calcio del canal, pero un análisis de estas curvas indica que no es así. Los valores de  $V_{0.5}$  y  $z$  son propiedades del canal bajo una condición dada y están relacionados con la diferencia de energía libre ( $\Delta G$ ) entre los estados abiertos y cerrados. Se puede considerar que el efecto del calcio es modificar esta energía, desde un valor basal en ausencia del catión (cuando  $[Ca^{2+}]=0$ ) hasta un valor final en calcio saturante ( $[Ca^{2+}]\rightarrow\infty$ ). En un modelo de dos es-



tados para la activación por potencial, el cambio de energía libre entre el estado cerrado y el abierto está dado por la expresión

$$\Delta G = zV_{0.5}F \quad (5)$$

en donde  $F$  es la constante de Faraday. La Figura 9 muestra los valores de  $\Delta G$  calculados con la ecuación (5) a partir de los datos de la Tabla 1. Estos datos fueron ajustados a una ecuación sigmoidea de concentración-efecto (ecuación (3) en Materiales y Métodos):

$$\Delta G = \Delta G^0 - \frac{\Delta G^0 - \Delta G^\infty}{1 + \left( \frac{10^{\log EC_{50}}}{10^{\log [Ca^{2+}]}} \right)^n}$$

El ajuste se muestra en la Figura 9 (líneas) y los parámetros que mejor ajustaron se muestran en la Tabla 2. El único valor significativamente distinto entre los tres ajustes

	$\alpha$	$\alpha+\beta_1$	$\alpha+\beta_2IR$
$\Delta G^0$ , kcal/mol	$4.2 \pm 0.2$	$4.1 \pm 0.2$	$4.0 \pm 0.1$
$\Delta G^\infty$ , kcal/mol	$-1.3 \pm 0.4$	$-3.2 \pm 0.3$	$-5.5 \pm 0.2$
$\log EC_{50}$	$0.47 \pm 0.1$	$0.18 \pm 0.07$	$0.34 \pm 0.03$
$n$	$0.9 \pm 0.2$	$0.74 \pm 0.1$	$1.04 \pm 0.06$
$EC_{50}$ ( $\mu M$ )	2.96 (2.3–3.7)	1.5 (1.3–1.8)	2.19 (2.1–2.3)

**Tabla 2. Parámetros de ajuste de los valores de  $\Delta G$  a la ecuación sigmoidea de concentración-efecto.**

Se indican los parámetros del mejor ajuste  $\pm$  el error estándar. Ya que el ajuste se realizó con  $\log([Ca^{2+}])$ , el valor reportado es  $\log(EC_{50})$ . Como referencia, se muestran los valores de  $EC_{50}$  y un rango calculado con las desviaciones estándar de  $\log(EC_{50})$ . Sólo el valor de  $\Delta G^\infty$  es significativamente distinto entre los tres ajustes ( $P < 0.001$ ).

es  $\Delta G^\infty$  ( $P < 0.001$ ), indicando que las subunidades  $\beta$  no están afectando la energía intrínseca del canal en ausencia de calcio ( $\Delta G^0$ ) ni la unión del catión al canal ( $EC_{50}, n$ ).

### 1.2. Las subunidades $\beta$ y el límite de la dependencia de potencial

En los canales dependientes de potencial, la relación  $d \ln(P_{(O)})/dV$  alcanza un valor máximo –conocido como pendiente límite– a probabilidades del estado abierto muy pequeñas. Se ha demostrado (Almers, 1978; Sigg y Bezanilla, 1997) que para todo modelo lineal de activación por potencial

$$\lim_{V \rightarrow -\infty} \frac{d \ln(P_{(O)})}{dV} = \frac{\Delta q F}{RT},$$

en donde  $\Delta q$  (Coulomb/mol) es la carga del sensor de potencial efectivamente acoplada a la apertura del canal y  $R$  y  $T$  tienen sus significados usuales. En el canal MaxiK la pendiente del gráfico  $\ln(P_{(O)})/V$  tiene un máximo de  $2.0 V^{-1}$ , pero cuando la  $P_{(O)}$  disminuye por debajo de  $10^{-4}$ , disminuye drásticamente para llegar a un valor cercano a  $0.3 V^{-1}$  (Horrigan y col., 1999; Horrigan y Aldrich, 2002). Este fenómeno, incom-

patible con un modelo lineal de activación por potencial, es una de las observaciones que dio origen al modelo alostérico de activación por potencial para el canal MaxiK. Este modelo (Figura 3) predice que en ausencia de calcio y cuando todos los sensores de potencial se encuentran en reposo (a potenciales muy negativos), la  $P_{(O)}$  del canal está gobernada sólo por el equilibrio C—O con constante de equilibrio L. De esta forma,

$$P_{(O)} = \frac{O}{O+C} = \frac{1}{1+\frac{C}{O}} = \frac{1}{1+\frac{1}{L}}$$

Como  $L \ll 1$ , se puede aproximar  $P_{(O)} = L = L_0 \times \exp(z_L FV/RT)$  y entonces

$$\lim_{V \rightarrow -\infty} \frac{d \ln(P_{(O)})}{dV} = \frac{z_L F}{RT}$$

Además, se puede ajustar los valores de  $P_{(O)}$  a la ecuación

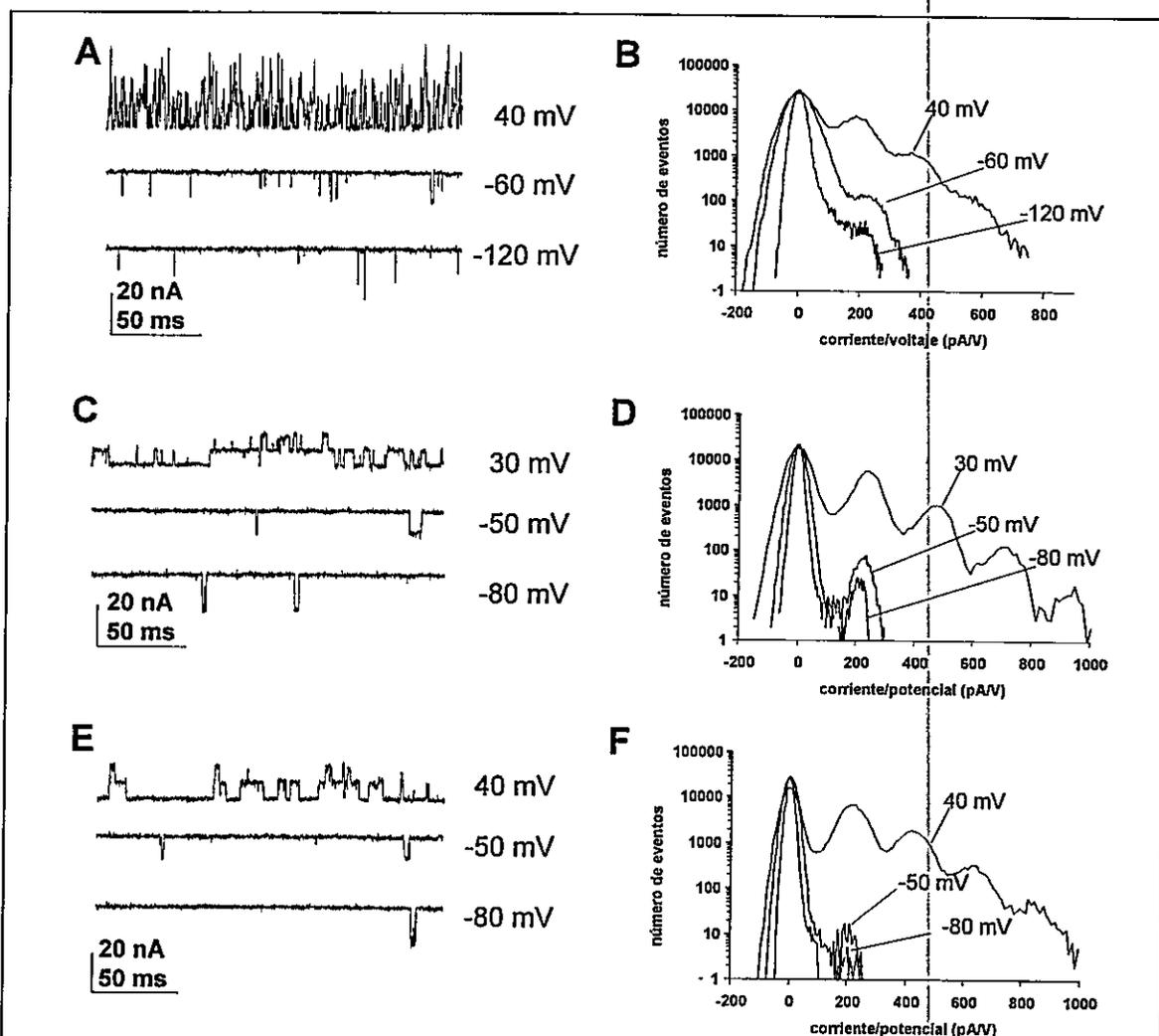
$$P_{(O)} = L_0 \exp\left(\frac{z_L FV}{RT}\right) \quad (6)$$

y de esa manera tener también una estimación del parámetro  $L_0$ .

Se estudió el efecto que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  tienen sobre este comportamiento del canal. Para determinar el límite de la dependencia de potencial se cuantificó los eventos unitarios de apertura en parches de membrana que contenían varios cientos y hasta miles de canales. En la Figura 10A se muestra la actividad de un parche con alrededor de 10000 canales (subunidad  $\alpha$  sola), registrada a distintos potenciales de membrana. Los histogramas de eventos (Figura 10B) muestran que conforme el potencial se hace más negativo los eventos correspondientes a canales abiertos disminuyen. A partir de gráficos de este tipo se puede calcular la probabilidad del estado abierto  $NP_{(O)}$ , y si se

conoce el número de canales del parche ( $N$ ) se puede conocer  $P_{(0)}$  (ver materiales y métodos).

En presencia de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$ , se observó el mismo comportamiento (Figura 10C-F). La única diferencia es que en presencia de las subunidades  $\beta$  los eventos



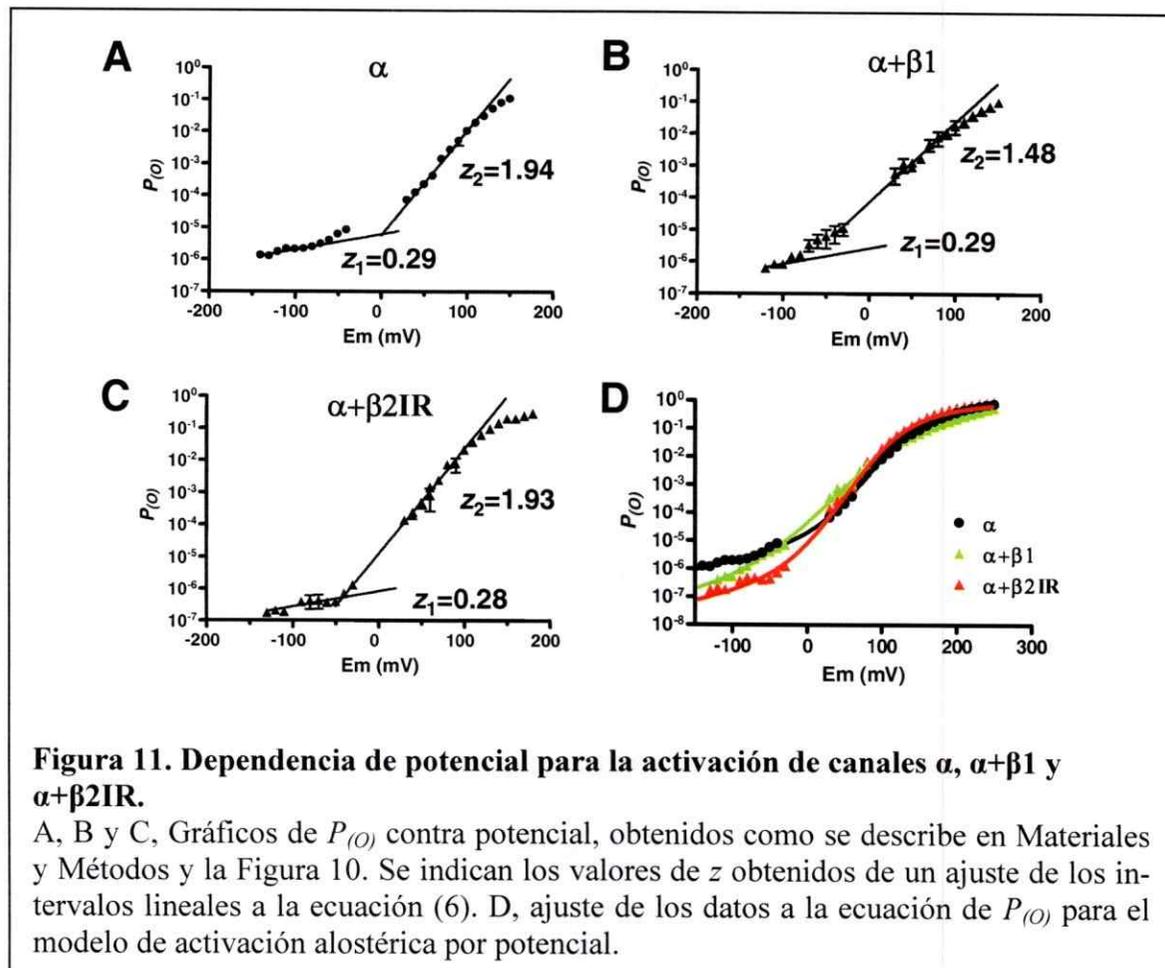
**Figura 10. Cuantificación de eventos unitarios en ausencia de calcio.**

A, C y E, registros de actividad de corriente en parches con canales MaxiK  $\alpha$  (A),  $\alpha+\beta 1$  (C) ó  $\alpha+\beta 2IR$  (E), a 5 nM calcio y los potenciales de membrana indicados. Para la construcción de la figura, los registros fueron pasados digitalmente por un filtro pasabajos de 2 kHz. B, D y F, histogramas en escala semilogarítmica de eventos en función de la conductancia. Los histogramas fueron construidos con registros de 9(B), 8 (D) ó 10 (F) segundos de duración.

unitarios de apertura son más escasos y tienen una mayor duración. Los histogramas de eventos muestran que al igual que para la subunidad  $\alpha$ , la  $P_{(0)}$  en presencia de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  disminuye conforme el potencial es más negativo.

En la Figura 11 se observa el resumen de muchas mediciones de este tipo, realizadas en parches con canales  $\alpha$ ,  $\alpha+\beta 1$  ó  $\alpha+\beta 2IR$ . De este gráfico, hay tres observaciones importantes respecto al efecto que las subunidades  $\beta$  tienen sobre la dependencia de potencial del canal. En primer lugar, las tres curvas tienden a una misma pendiente cuando el potencial se hace más negativo, indicando que la dependencia de potencial límite (parámetro  $z_L$  en el modelo de activación alostérica) prácticamente no es modificado por las subunidades  $\beta$  estudiadas. En el intervalo de 40 a 100 mV, las tres curvas tienen un segundo segmento lineal, que corresponde al valor de pendiente límite que se obtiene por métodos de medición de corriente macroscópica (Diaz y col., 1998). La pendiente en este segundo segmento es prácticamente la misma para  $\alpha$  y  $\alpha+\beta 2IR$ , y bastante menor para  $\alpha+\beta 1$ . En la Figura 11D se puede apreciar que el valor absoluto de  $P_{(0)}$  varía entre las tres curvas, sugiriendo que el parámetro  $L_0$  –la constante de equilibrio intrínseca para la apertura del canal– es levemente menor en presencia de las subunidades  $\beta$  con respecto a la subunidad  $\alpha$  sola. Sin embargo, es muy probable que los valores de  $P_{(0)}$  para  $\alpha$  estén sobreestimados debido a la mayor frecuencia y ancho de banda utilizados en la adquisición.

Para comprobar de una forma más rigurosa que el valor de  $z_L$  es el mismo para las tres curvas, se ajustó los valores de  $P_{(0)}$  a la ecuación (1) considerando  $[Ca^{2+}]=0$ . En esta condición, la ecuación se simplifica a un modelo de activación alostérica por potencial:



$$P_{(O)} = \frac{L(1+JD)^4}{L(1+JD)^4 + (1+J)^4} = \frac{1}{1 + \frac{(1+J)^4}{L(1+JD)^4}}, \quad (7)$$

en donde los parámetros a ajustar son  $L_0$ ,  $z_L$ ,  $J_0$ ,  $z_J$  y  $D$ . Se realizó un ajuste de los datos de  $\log(P_{(O)})/V$ , incluyendo también las  $P_{(O)}$  determinadas con registros de corrientes macroscópicas hasta 250 mV. Una prueba estadística de ajuste simultáneo mostró que el parámetro  $z_L$  no es significativamente distinto entre los tres conjuntos de datos ( $P=0.1$ ). En la Figura 11D se muestra el mejor ajuste simultáneo junto a los datos experimentales. La Tabla 3 muestra los parámetros obtenidos cuando  $z_L$  se considera igual para los tres conjuntos de datos. Ambas subunidades  $\beta$  aumentan el factor alostérico  $D$ ,

	$\alpha$		$\alpha+\beta_1$		$\alpha+\beta_2IR$	
$J_0$	0.034	$\pm 0.002$	0.156	$\pm 0.009$	0.060	$\pm 0.005$
$z_J$	0.74	$\pm 0.02$	0.51	$\pm 0.02$	0.71	$\pm 0.03$
$L_0$	$7.8 \times 10^{-6}$	$\pm 1.0 \times 10^{-6}$	$1.2 \times 10^{-6}$	$\pm 2.8 \times 10^{-7}$	$5.8 \times 10^{-7}$	$\pm 1.7 \times 10^{-7}$
$z_L$	0.37	$\pm 0.07$	0.37	$\pm 0.07$	0.37	$\pm 0.07$
$D$	8.7	$\pm 0.9$	12.1	$\pm 1.6$	17.5	$\pm 3.3$
$V_{0.5}(J)$ , mV	116	(115-118)	94	(91-97)	101	(98-103)

**Tabla 3. Parámetros de mejor ajuste simultáneo de las curvas  $P_{(O)}/V$  en ausencia de calcio.**

Se muestra el ajuste simultáneo a la ecuación (7) restringiendo  $z_L$  igual para los tres conjuntos de datos. Se indica el error estándar en la determinación del parámetro.  $V_{0.5}(J)$  fue calculado como  $-RT/z_J F \times \ln(J_0)$  y se indica el intervalo calculado con el error estándar de  $J_0$ .

es decir, mejoran el acoplamiento funcional entre el movimiento de los sensores de potencial y la apertura del canal. Sin embargo, la subunidad  $\beta_1$  tiene además un importante efecto sobre el parámetro  $z_J$ , la dependencia de potencial del movimiento de los sensores. Este valor explica la menor pendiente que tienen la curva  $P_{(O)}/V$  de  $\alpha+\beta_1$  en el segundo intervalo lineal. Además, la subunidad  $\beta_1$  cambia el parámetro  $J_0$ , pero este cambio es compensado por  $z_J$  y  $V_{0.5}(J)$ , el voltaje medio de activación de los sensores de potencial, no cambia.

### 1.3. Ajuste de las curvas de $P_{(O)}$ al modelo de activación alostérica

Con el fin de determinar qué efectos tienen las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  sobre el canal MaxiK en el contexto del modelo de activación alostérica (Figura 3, página 8), se realizó un ajuste simultáneo de las curvas  $G/V$  a la ecuación (1). Inicialmente, se intentó un ajuste utilizando los valores de la Tabla 3 y dejando que el ajuste entregara los demás parámetros. Sin embargo, de esta forma no se obtuvo un ajuste satisfactorio, probablemente porque el ajuste de la Tabla 3 fue hecho dando un mayor peso estadístico a las probabilidades menores y no ajusta correctamente cuando  $P_{(O)} > 0.1$ . Se prefirió entonces realizar un ajuste diferente, restringiendo sólo  $z_L$  ya que este valor proviene directamente de la pendiente límite. Sobre la base de estos resultados,  $z_L$  se mantuvo entre 0.25 y 0.35. Tampoco se utilizó el valor de  $L_0$  obtenido de este ajuste, porque es muy sensible a una correcta determinación del valor absoluto de  $P_{(O)}$  y, como se mencionó, es muy probable que en el caso de  $\alpha$  esté sobreestimado. En la Tabla 4 se muestran los parámetros que mejor ajustaron a las curvas experimentales obtenidas, y en la Figura 12A se pueden ver las curvas  $G/V$  experimentales junto con las predicciones del ajuste con los parámetros dados. Los ajustes obtenidos predicen razonablemente bien el comportamiento macroscópico tanto para la subunidad  $\alpha$  sola como con la coexpresión de las subunidades  $\beta 1$  ó  $\beta 2IR$ . Los valores de  $V_{0.5}$  derivados del ajuste también se acercan bastante bien a los datos experimentales (Figura 12B), sin embargo la predicción de los valores de  $z$  se desvía un poco de los datos experimentales de  $\alpha$  y  $\alpha + \beta 1$  y está completamente alejado de los datos de  $\alpha + \beta 2IR$ , aunque mantiene su forma y su dependencia de la concentración de calcio.

Un análisis de las diferencias entre las tres columnas de valores en la Tabla 4 entrega cierta información sobre el efecto que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ IR tienen sobre el canal MaxiK y las principales diferencias entre ambas. Es interesante observar que los valores de  $K_d$  no son muy distintos entre sí, reforzando nuevamente la idea de que la unión de calcio al canal no es el parámetro afectado por las subunidades  $\beta$ . Sin embargo, sí se ve un aumento del factor alostérico  $C$ , que cuantifica el efecto del calcio sobre la  $P_{(0)}$  del canal una vez que se ha unido. Esto es absolutamente consistente con lo planteado previamente en el análisis de las curvas de  $\Delta G/[Ca^{2+}]$ . Sin embargo, es necesario considerar que cuando el canal está abierto la constante de disociación de los sitios de unión de calcio es  $K_d/C$ , ya que la constante de equilibrio para la unión de calcio es  $KC$ . En la

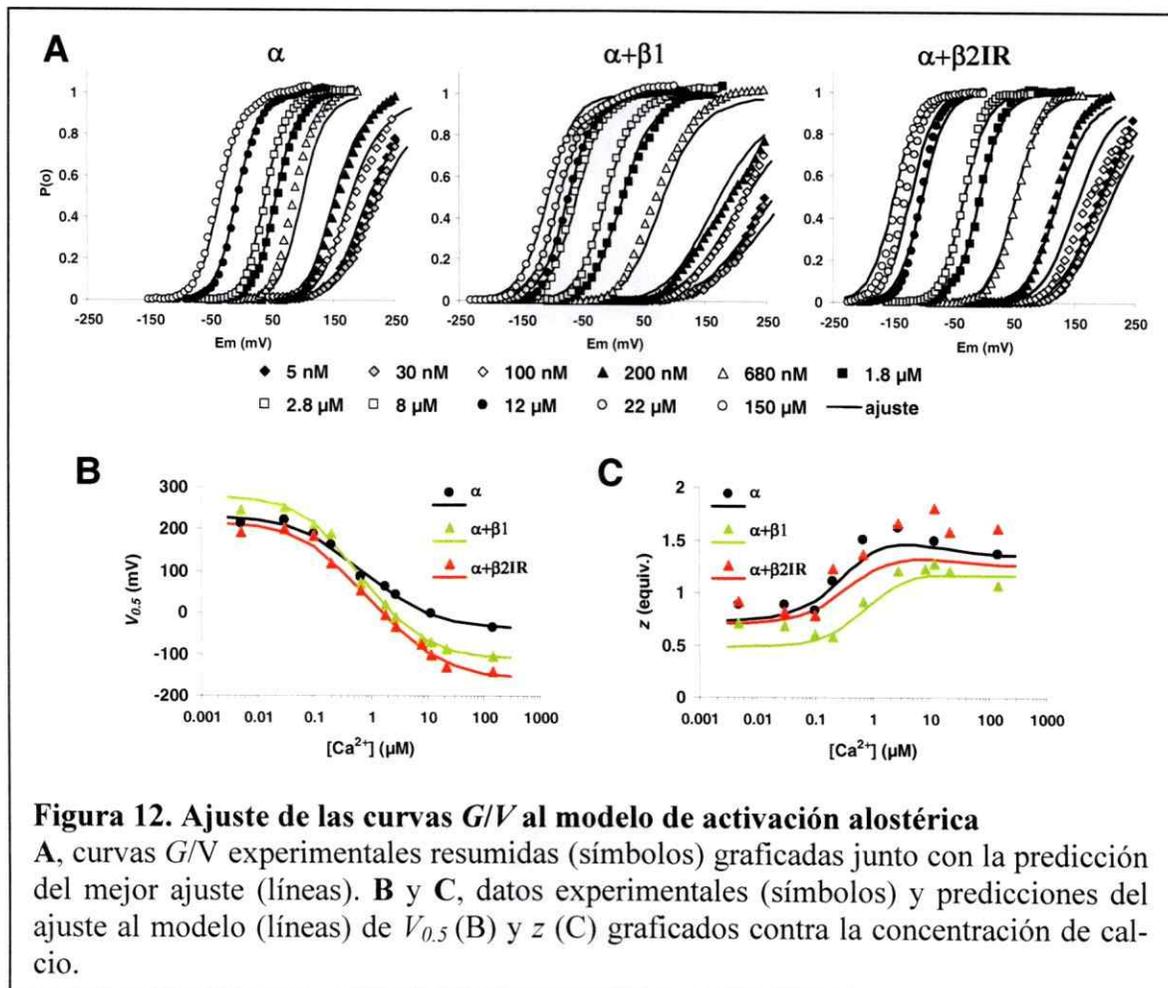
	$\alpha$	$\alpha+\beta 1$	$\alpha+\beta 2$ IR
$J_0$	0.083 $\pm$ 0.028 †	0.513 $\pm$ 0.123 ‡	0.221 $\pm$ 0.091 ‡
$K_d$ ( $\mu$ M)	9.9 $\pm$ 1.48 ‡	7.4 $\pm$ 0.8 ‡	13.1 $\pm$ 1.74 ‡
$L_0$	$1.0 \times 10^{-6} \pm 2.8 \times 10^{-6}$	$6.7 \times 10^{-8} \pm 9.9 \times 10^{-8}$	$2.2 \times 10^{-8} \pm 1.66 \times 10^{-8}$
$z_J$	0.45 $\pm$ 0.013 ‡	0.31 $\pm$ 0.019 ‡	0.31 $\pm$ 0.014 ‡
$z_L$	0.35 $\pm$ 0.11 †	0.35 $\pm$ 0.073 ‡	0.35 $\pm$ 0.137 ‡
$C$	6.4 $\pm$ 1.46 ‡	15.7 $\pm$ 4.17 ‡	21.6 $\pm$ 15.54 ‡
$D$	15.2 $\pm$ 8.08	25.3 $\pm$ 13.63	52.7 $\pm$ 25.62
$E$	8.7 $\pm$ 2.74 †	1.8 $\pm$ 0.56 †	3.3 $\pm$ 2.65 †
$r^2$	0.988	0.993	0.985
$V_{0.5}(J)$ (mV)	143 (127 – 167)	55 (37 – 78)	126 (98 – 171)
$K_d/C$ ( $\mu$ M)	1.6	0.5	0.6
$J_0 D$	1.26	12.99	11.65
$V_{0.5}(JD)$ (mV)	-13	-212	-206

**Tabla 4. Parámetros del mejor ajuste de las curvas  $G/V$  a la ecuación (1).**

Se indican los parámetros obtenidos con el ajuste de mínimos cuadrados  $\pm$  el error estándar. Se calculó  $V_{0.5}(J)$  como  $-(RT/z_J F) \times \ln(J_0)$  y se indica el rango que resulta del error estándar en  $J_0$ . Como un índice del valor predictivo de cada parámetro, se indica la probabilidad  $P$  de que el parámetro no sirve para predecir la variable dependiente (†,  $P < 0.05$ ; ‡,  $P < 0.001$ ). El significado de cada parámetro se puede ver en el Apéndice 2.

Tabla 4 se puede ver que aunque los valores de  $K_d/C$  calculados sí varían en presencia de las subunidades  $\beta$ , esta variación es menor a medio orden de magnitud.

Sobre los parámetros que definen la constante de equilibrio propia de la apertura del canal,  $L_0$  y  $z_L$ , no es mucho lo que se puede concluir.  $z_L$  fue restringido sobre la base de un resultado experimental, sin embargo en la búsqueda del mejor ajuste siempre se intentó sobreestimar y en los tres casos quedó como 0.35, el valor máximo permitido por la restricción. Con respecto a los valores de  $L_0$  obtenidos, el valor de  $\alpha$  es muy cercano al reportado previamente en la proposición de este modelo de activación alostérica (Horri-gan y col., 1999; Horrigan y Aldrich, 2002) y los valores de  $\alpha+\beta 1$  y  $\alpha+\beta 2IR$  son meno-



res a éste y a lo esperado del ajuste de pendiente límite. Sin embargo, de todos los parámetros del modelo,  $L_0$  es el que tiene siempre la menor confiabilidad estadística y el mayor error estándar relativo.

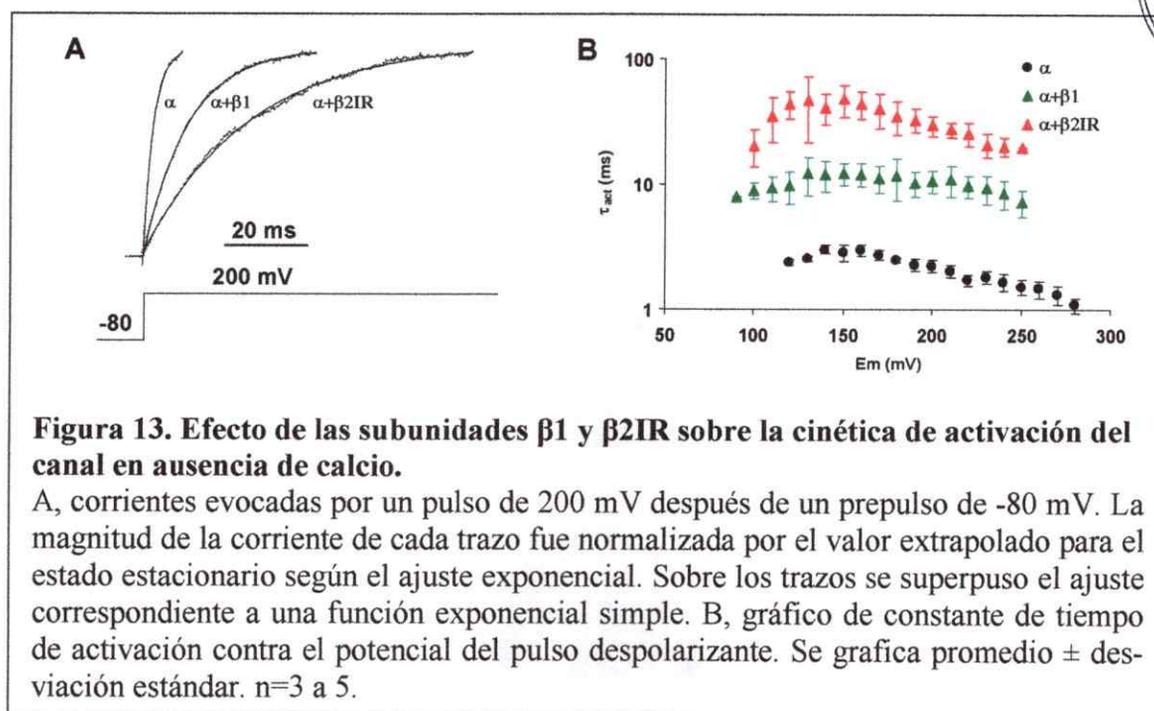
$J_0$  se entiende mejor en términos de  $V_{0.5}(J)$ , que es el potencial al cual la probabilidad de encontrar un sensor de potencial en estado activo es 0.5. Se puede ver que sólo la subunidad  $\beta 1$  provoca un cambio significativo, y el resultado sugiere que en su presencia los sensores de potencial se activan a potenciales menores que para  $\alpha$  ó  $\alpha + \beta 2IR$ . Este resultado es consecuente con lo observado en el análisis de pendiente límite, y constituye una predicción que puede ser verificada directamente con mediciones de corrientes de compuerta. Llama la atención que en el ajuste anterior (Tabla 3) la subunidad  $\beta 1$  aparece con un mayor efecto sobre  $z_J$  que sobre  $V_{0.5}(J)$ , y pone de manifiesto que se pueden obtener resultados muy diferentes si se hace el ajuste con probabilidades de estado abierto muy pequeñas o macroscópicas. De cualquier manera, los dos ajustes coinciden en que la subunidad  $\beta 1$  tiene efectos mayores sobre los sensores de potencial que no los tiene la subunidad  $\beta 2IR$ .

El factor alostérico  $D$  tiene su mayor variación en presencia de la subunidad  $\beta 2IR$ , tanto respecto a  $\alpha$  como a  $\alpha + \beta 1$ . Este aumento en  $D$  puede explicar que, en este ajuste, los canales  $\alpha + \beta 2IR$  tengan una mayor dependencia de potencial que  $\alpha + \beta 1$  a pesar de tener un valor similar de  $z_J$  y un menor valor de  $J_0$ . Al igual que con la unión de calcio, hay que considerar que para el canal abierto la constante de equilibrio para la activación de los sensores de potencial se ve modificada. Los valores de  $V_{0.5}(JD)$  nos dicen que ambas subunidades  $\beta$  tienen un efecto significativo sobre el movimiento del sensor de potencial cuando el canal está abierto, y que entre ambas no hay gran diferencia.

El factor alostérico  $E$  es también modificado de manera significativa por las subunidades  $\beta$ . Para la subunidad  $\alpha$  se ha reportado que el simple ajuste de las  $G/V$  macroscópicas al modelo –como se ha hecho aquí– tiende a sobreestimar el valor de este factor (Horrihan y Aldrich, 2002). Es posible entonces que el valor para la subunidad  $\alpha$  sola sea bastante menor al obtenido y similar al de  $\alpha+\beta 1$  y  $\alpha+\beta 2IR$ . De cualquier manera, este factor alostérico –al igual que  $C$  y  $D$ – no tiene un significado estructural claro.

#### 1.4. Efecto de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2IR$ sobre la cinética macroscópica del canal

Las coexpresión de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  afecta también la cinética de corrientes macroscópicas del canal MaxiK. Se realizó un estudio detallado de la cinética del canal en ausencia virtual de calcio (5 a 10 nM), porque en esas condiciones el canal sólo se activa por potencial y el esquema cinético de activación del canal se reduce a un modelo de 10 estados (Figura 3B y Figura 15).



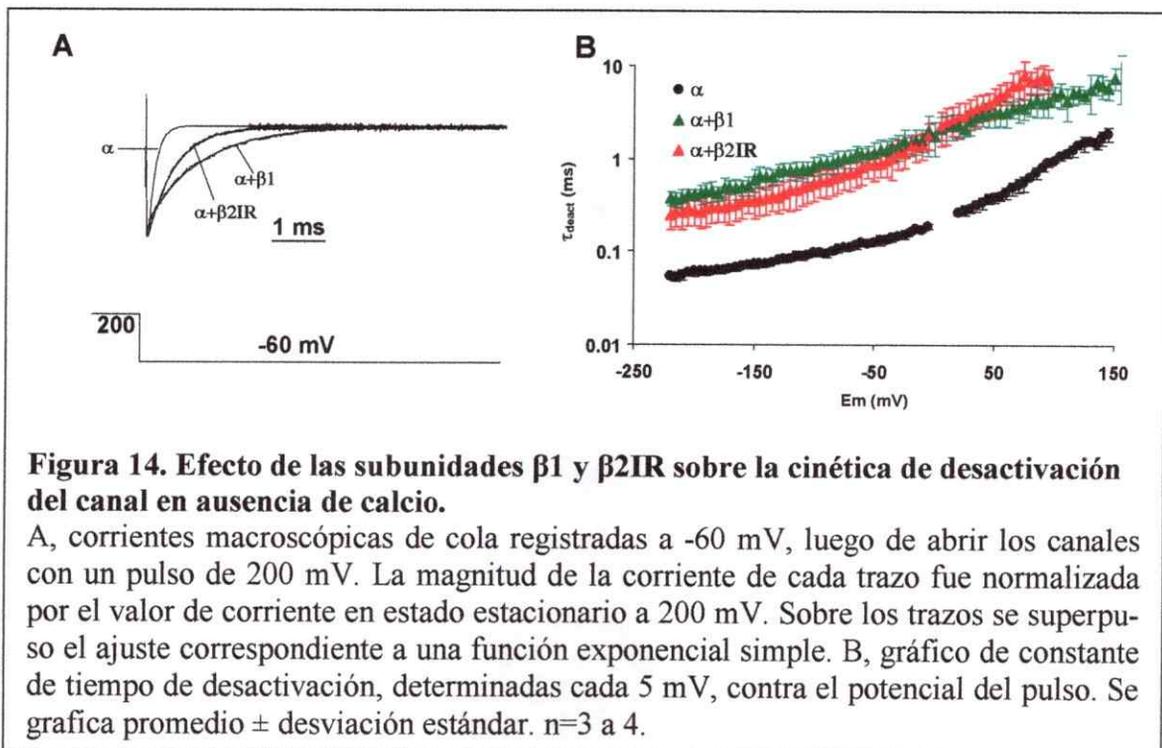
**Figura 13. Efecto de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  sobre la cinética de activación del canal en ausencia de calcio.**

A, corrientes evocadas por un pulso de 200 mV después de un prepulso de -80 mV. La magnitud de la corriente de cada trazo fue normalizada por el valor extrapolado para el estado estacionario según el ajuste exponencial. Sobre los trazos se superpuso el ajuste correspondiente a una función exponencial simple. B, gráfico de constante de tiempo de activación contra el potencial del pulso despolarizante. Se grafica promedio  $\pm$  desviación estándar.  $n=3$  a 5.



En la Figura 13 se muestran trazos representativos de corrientes y los valores promedio de constante de tiempo de activación obtenidos, para canales MaxiK  $\alpha$ ,  $\alpha+\beta 1$  y  $\alpha+\beta 2IR$  en 5 nM de calcio intracelular. Ambas subunidades  $\beta$  hacen que la apertura de los canales MaxiK sea más lenta, siendo el efecto de  $\beta 2IR$  notablemente mayor al de  $\beta 1$ . Sin embargo, llama la atención que las tres curvas de  $\tau_{act}/V$  tienen aproximadamente la misma forma, con la misma dependencia de potencial y con un máximo alrededor de 140 mV.

La desactivación o cierre del canal ante un pulso de potencial negativo también se hace más lenta en presencia de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$ . Sin embargo, a -60 mV el cierre es más lento con la subunidad  $\beta 1$  que con la subunidad  $\beta 2IR$  (Figura 14A), al contrario de lo que ocurre con la activación. Al analizar el valor de la constante de tiempo para la desactivación ( $\tau_{desact}$ ) en un amplio intervalo de potenciales (Figura 14B) se ob-



serva un comportamiento más complejo: tanto  $\alpha$  como  $\alpha+\beta 2IR$  tienen una dependencia de potencial con dos pendientes, mientras que  $\alpha+\beta 1$  tiene aparentemente una sola pendiente, al menos hasta 150 mV

### 1.5. Modelo cinético de activación alostérica por potencial en ausencia de calcio.

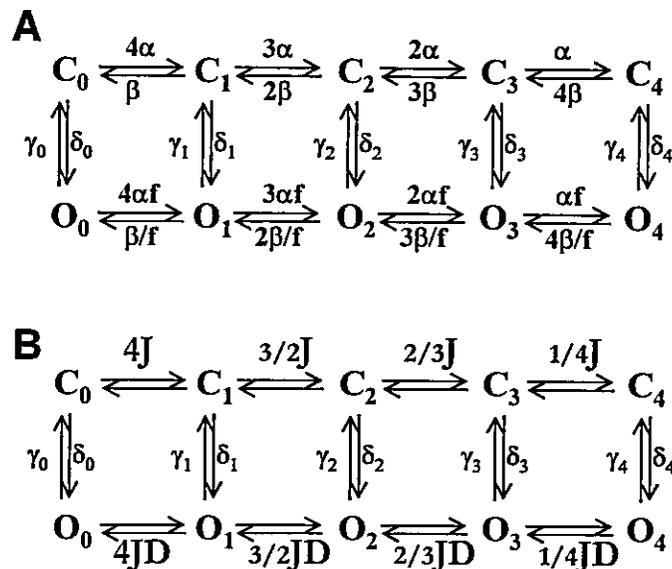
En el caso de canales compuestos sólo por la subunidad  $\alpha$ , el comportamiento descrito de la curva  $\tau/V$  ya ha sido reportado (Horrigan y col., 1999) y ha sido explicado en términos del modelo de activación alostérica por potencial, en ausencia de calcio. En la Figura 15A se muestra el modelo alostérico descrito en la Figura 3B (página 8) con las constantes de rapidez reemplazando a las constantes de equilibrio. En el canal MaxiK el movimiento de los sensores de potencial ocurre mucho más rápido que la apertura o cierre de los canales, siendo las constantes cinéticas que comandan este proceso hasta 100 veces mayores que las que median el cierre y la apertura. Por esta razón, se puede considerar que mientras la corriente macroscópica del canal se relaja, los sensores de potencial se encuentran en equilibrio y entonces el esquema de la Figura 15A se reduce al de la Figura 15B (Cox y col., 1997; Horrigan y col., 1999).

Ante un pulso cuadrado de potencial, la constante de tiempo para la relajación de la corriente está dada por las constantes cinéticas  $\gamma_n$  y  $\delta_n$ , ponderadas por las probabilidades relativas ( $p$ ) de los estados  $O_n$  y  $C_n$ , respectivamente. Esto equivale a la expresión:

$$\tau_{(I_K)} = \left[ \sum (\gamma_i p O_i + \delta_i p C_i) \right]^{-1}.$$

A potenciales menores al  $V_{0.5}$ , las constantes  $\gamma$  son mayores que las constantes  $\delta$  y se puede aproximar a

$$\tau_{(I_K)} = \left( \sum \gamma_i p O_i \right)^{-1}.$$



**Figura 15. Esquema cinético para el canal MaxiK en ausencia de calcio.**

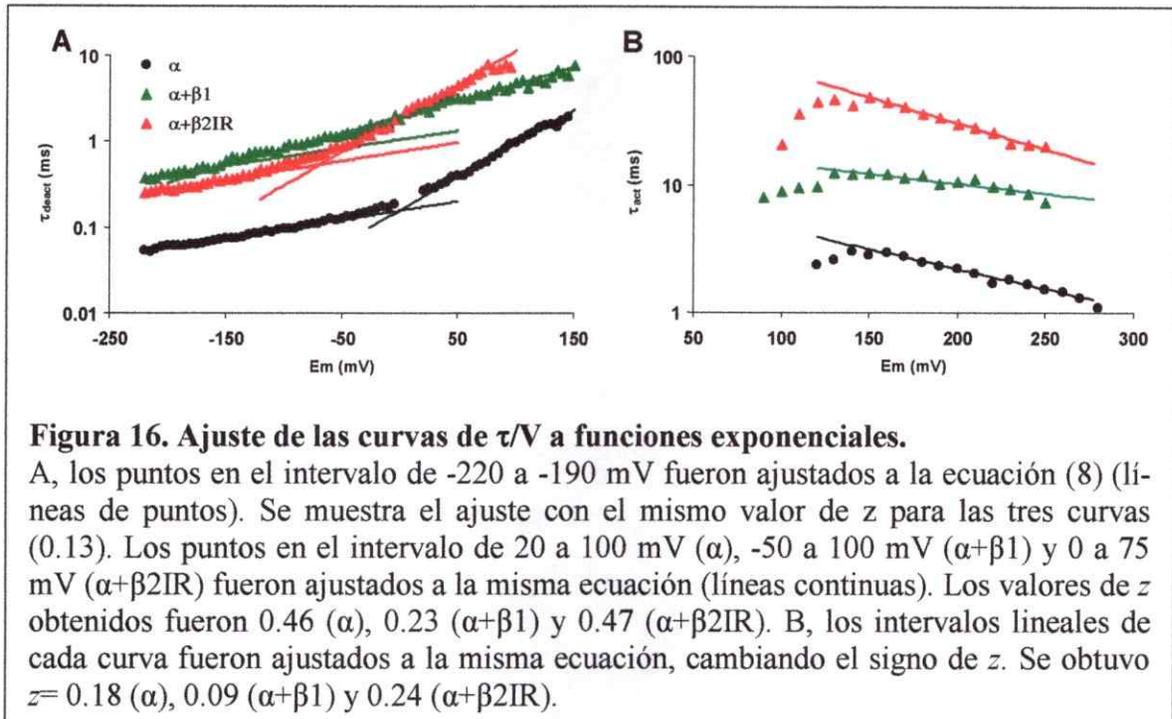
A, esquema cinético propuesto por Horrigan y col. (1999).  $\alpha = \alpha_{(0)} \exp(z_\alpha FV/RT)$ ,  $\beta = \beta_{(0)} \exp(-z_\beta FV/RT)$ ,  $\delta_n = \delta_{n(0)} \exp(z_\delta FV/RT)$  y  $\gamma_n = \gamma_{n(0)} \exp(-z_\gamma FV/RT)$ . La equivalencia con el esquema de la Figura 3B se verifica por las siguientes igualdades:  $J = \alpha/\beta$ ,  $L = \delta_0/\gamma_0$ ,  $z_J = z_\alpha + z_\beta$ ,  $z_L = z_\delta + z_\gamma$  y  $D = (\delta_{n+1}/\gamma_{n+1})/(\delta_n/\gamma_n) = f^2$ . B, esquema abreviado que considera los sensores de potencial en equilibrio respecto a la apertura o cierre del canal.

Cuando el potencial es muy negativo, todos los sensores de potencial se encuentran en estado de reposo y el único estado abierto es  $O_0$ . Entonces,

$$\tau_{(I_K)} = (\gamma_0)^{-1} = \left( \gamma_{0(0)} \exp\left(\frac{-z_\gamma FV}{RT}\right) \right)^{-1}$$

$$\tau_{(I_K)} = (\gamma_{0(0)})^{-1} \exp\left(\frac{z_\gamma FV}{RT}\right) \quad (8)$$

Es decir, la constante de tiempo para la desactivación de la corriente macroscópica tiene una relación exponencial respecto al potencial (relación lineal en un gráfico semilogarítmico) siempre que  $O_1/O_0$  se aproxime a 0 ( $O_0 \gg O_1$ ). En la Figura 16A se muestra en líneas punteadas el mejor ajuste de los 6 primeros puntos de cada conjunto de datos a la ecuación (8). Se puede ver que todas tienen la misma pendiente (una prueba es-



**Figura 16. Ajuste de las curvas de  $\tau/V$  a funciones exponenciales.**

A, los puntos en el intervalo de -220 a -190 mV fueron ajustados a la ecuación (8) (líneas de puntos). Se muestra el ajuste con el mismo valor de  $z$  para las tres curvas (0.13). Los puntos en el intervalo de 20 a 100 mV ( $\alpha$ ), -50 a 100 mV ( $\alpha+\beta 1$ ) y 0 a 75 mV ( $\alpha+\beta 2IR$ ) fueron ajustados a la misma ecuación (líneas continuas). Los valores de  $z$  obtenidos fueron 0.46 ( $\alpha$ ), 0.23 ( $\alpha+\beta 1$ ) y 0.47 ( $\alpha+\beta 2IR$ ). B, los intervalos lineales de cada curva fueron ajustados a la misma ecuación, cambiando el signo de  $z$ . Se obtuvo  $z=0.18$  ( $\alpha$ ), 0.09 ( $\alpha+\beta 1$ ) y 0.24 ( $\alpha+\beta 2IR$ ).

tadística de ajuste global entrega  $P=0.17$  para las pendientes diferentes), que equivale a  $z_{\gamma}=0.13\pm 0.01$ . Para la subunidad  $\alpha$  sola se había reportado un valor de 0.14 (Horrigan y col., 1999). Esto quiere decir que las subunidades  $\beta$  tampoco afectan la dependencia de potencial límite para la constante de tiempo de la desactivación. Ya que  $z_L=z_{\gamma}+z_{\delta}$ , las subunidades  $\beta$  tampoco afectarían la dependencia de potencial límite para la constante de tiempo de activación ( $z_{\delta}$ ). Sin embargo, es imposible determinar este valor experimentalmente porque se debería llevar el canal a potenciales cercanos a 400 mV.

El ajuste de las curvas  $\tau_{desact}/V$  a la ecuación (8) pone también en evidencia que la curva para  $\alpha+\beta 1$  sí tiene dos pendientes, pero que la segunda es mucho menor que para  $\alpha$  y  $\alpha+\beta 2IR$ . Esta segunda pendiente está relacionada con el movimiento de los sensores de potencial entre estados abiertos. Cuando  $O_1/O_0$  no es despreciable, el gráfico semilogarítmico pierde su linealidad. Como  $O_1/O_0=4JD$ , el cambio en el punto de in-

flexión de las curvas de  $\tau_{desact}/V$  es un reflejo de el efecto que tienen las subunidades  $\beta$  sobre la constante de equilibrio entre los estados abiertos del canal. Este punto se encuentra alrededor de -20 mV para la subunidad  $\alpha$ , -100 mV para  $\alpha+\beta 2IR$  y cerca de los -180 mV para  $\alpha+\beta 1$ . Nuevamente se confirma que en presencia de la subunidad  $\beta 1$  los sensores de potencial afectan el comportamiento del canal desde potenciales más negativos, es decir, deben moverse a potenciales menores. Por otra parte, el corrimiento del punto de inflexión en presencia de la subunidad  $\beta 2IR$  se debe a que el factor alostérico  $D$  es mayor. El valor de la segunda pendiente obedece a una relación más compleja que la primera, que involucra los otros valores de  $\gamma_n$  y  $\delta_n$ , así como también el movimiento de los sensores de potencial y su dependencia de potencial. Podemos confirmar entonces, que la subunidad  $\beta 2IR$  tiene efectos menores en el movimiento de los sensores, no así la subunidad  $\beta 1$  cuyos efectos son apreciables.

Las curvas de  $\tau_{act}/V$  también tienen un intervalo que puede ser ajustado a la ecuación (8), con un valor de  $z$  negativo. En la Figura 16B, se observa el mejor ajuste de las curvas. En presencia de la subunidad  $\beta 1$  la pendiente disminuye casi a la mitad que para  $\alpha$  ( $z=0.09$  y  $0.18$ , respectivamente), mientras que con la subunidad  $\beta 2IR$  se hace levemente mayor ( $z=0.24$ ). Este valor también es de difícil interpretación, pero evidencia que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  afectan de manera diferente los equilibrios entre los estados abiertos del canal.

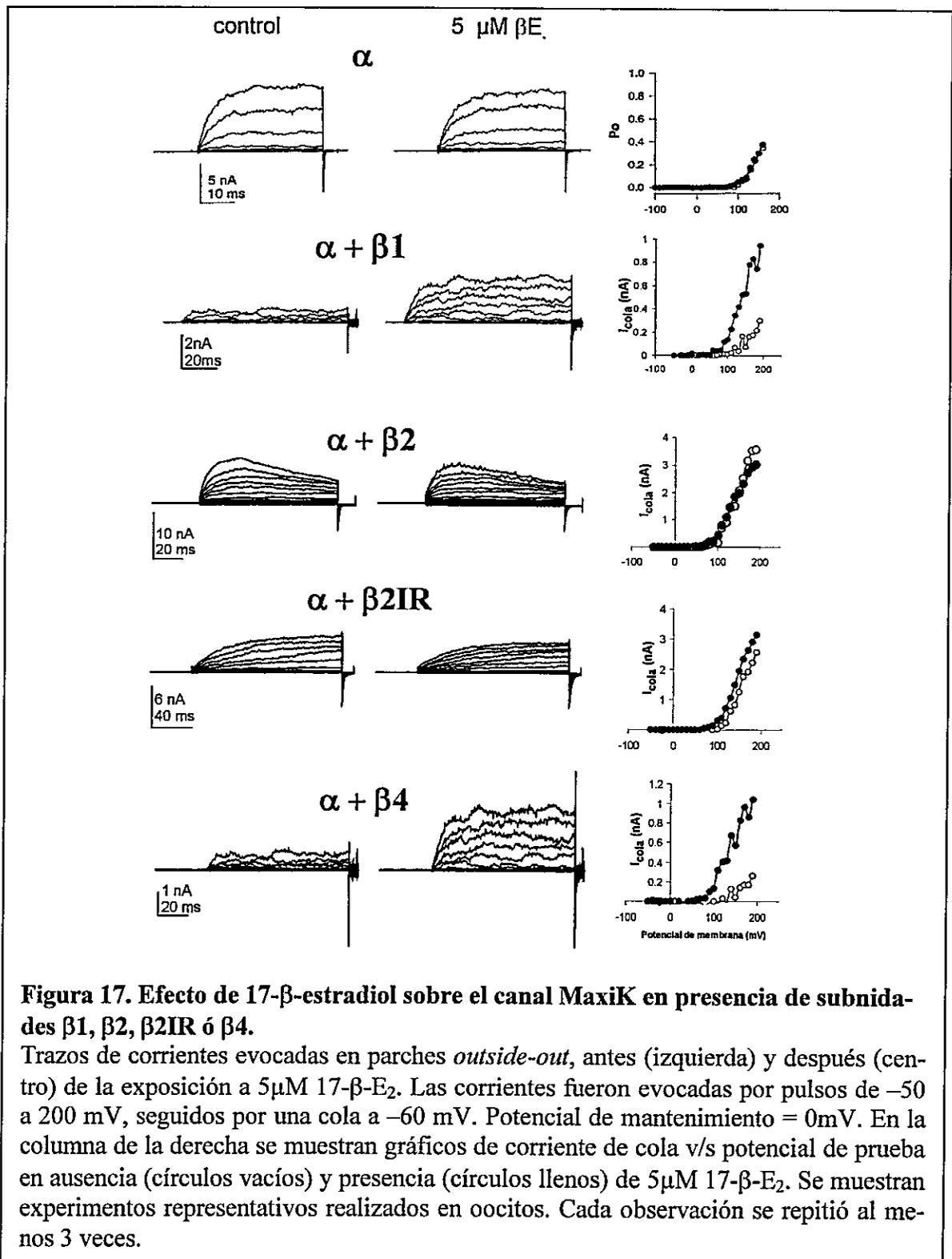
## 2. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol y Tamoxifeno en presencia de distintas subunidades $\beta$ del canal MaxiK

### 2.1. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol en presencia de distintas subunidades $\beta$ del canal MaxiK.

Para comenzar la búsqueda de un determinante estructural en la subunidad  $\beta 1$  para la activación del canal por 17- $\beta$ -estradiol, se estudió el efecto que esta hormona tiene sobre el canal en presencia de distintas subunidades  $\beta$ . En la Figura 17 se resumen los resultados obtenidos. Como ya se ha descrito (Valverde y col., 1999), en ausencia de subunidad  $\beta$  (subunidad  $\alpha$  sola) no hay efecto de 5  $\mu$ M 17- $\beta$ -estradiol (17- $\beta$ -E<sub>2</sub>) sobre la actividad del canal MaxiK. En contraste, al coexpresar la subunidad  $\beta 1$  el canal se vuelve sensible a estradiol; las corrientes se incrementan al exponer el canal a la hormona y la relación de  $P_{(0)}$  v/s potencial de membrana se desplaza hacia la izquierda.

Como ya se mencionó, al expresar la subunidad  $\alpha$  junto con la subunidad  $\beta 2$  se obtienen corrientes que se inactivan. Al agregar 17- $\beta$ -E<sub>2</sub>, estas corrientes no mostraron ningún aumento, ni en el valor de corriente máximo, ni en la corriente de cola (Figura 17). Tampoco se observó efecto de 17- $\beta$ -E<sub>2</sub> al utilizar la subunidad  $\beta 2IR$ , carente del dominio de inactivación.

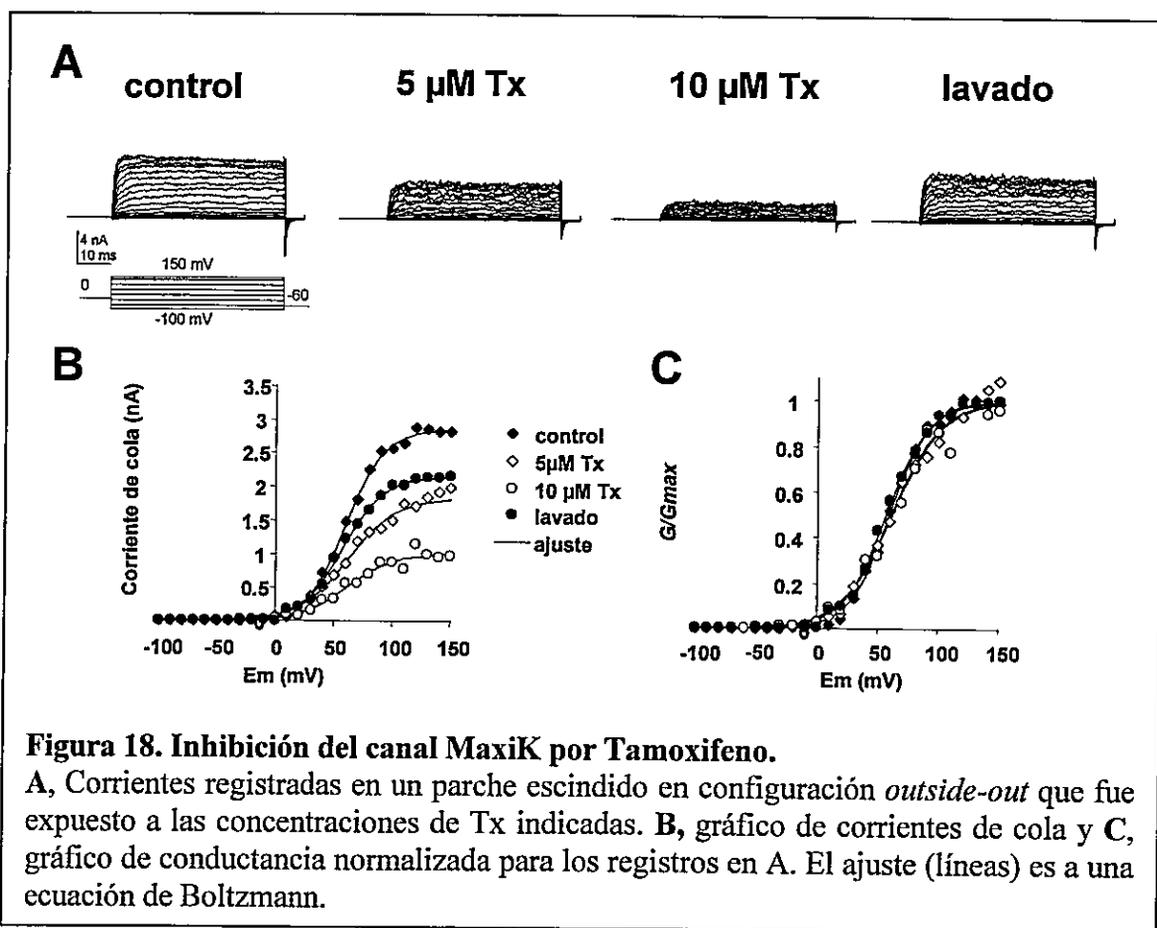
En presencia de la subunidad  $\beta 4$  sí se observó efecto de estradiol, como se puede ver en la Figura 17 ( $\alpha+\beta 4$ ). El efecto es un aumento de las corrientes y un desplazamiento de la curva de corrientes de cola v/s potencial, semejante al obtenido con la subunidad  $\beta 1$ .



## 2.2. Efecto de Tamoxifeno (Tx) en presencia de distintas subunidades $\beta$ del canal MaxiK.

Para obtener información sobre los grupos químicos de la molécula de  $17\beta\text{E}$  que son necesarios para la activación del canal MaxiK, se estudió qué efecto tiene el Tamoxifeno (Tx) sobre el canal MaxiK. Tx es un antagonista del estradiol; su mecanismo de acción es unirse al receptor nuclear de estrógenos e impedir su dimerización y traslocación al núcleo. Tiene además una estructura química completamente distinta al estradiol.

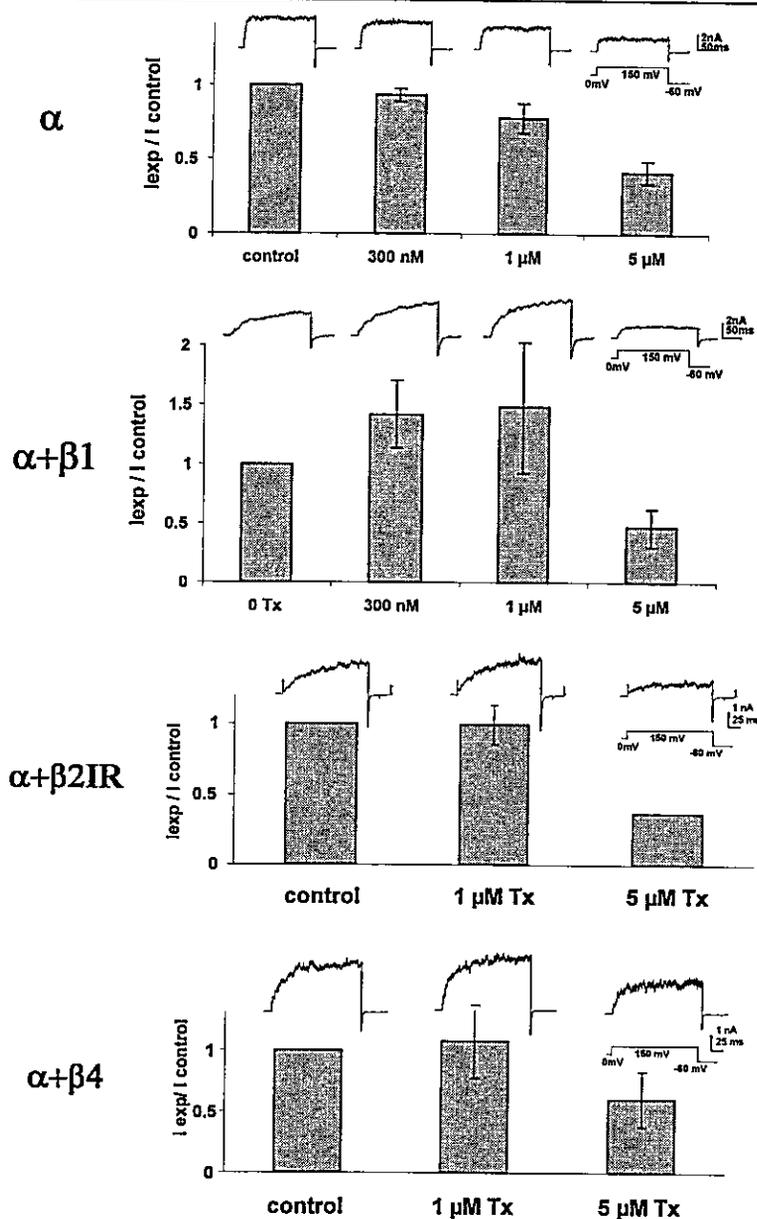
A diferencia de  $17\beta\text{-estradiol}$ , se encontró que Tx sí tiene un efecto sobre el canal en ausencia de subunidades  $\beta$ , pero éste resultó ser un efecto inhibitorio. En la Figura



18 se puede ver que Tx 5  $\mu$ M reduce las corrientes del canal MaxiK formado sólo por subunidad  $\alpha$  casi hasta la mitad, y en Tx 10  $\mu$ M las corrientes son de alrededor de un 30%. Las corrientes de cola presentan una disminución similar (Figura 18B). Al comparar las corrientes de cola normalizadas (Figura 18C), se ve que la curva  $G/V$  no se desplaza debido a la inhibición por Tx, observación que es compatible con un simple bloqueo independiente del estado (abierto o cerrado) del canal.

Al exponer canales MaxiK  $\alpha+\beta 1$  a distintas concentraciones de Tx, se observó un efecto bifásico. Como se puede ver en la Figura 19, Tx 300nM es suficiente para producir un incremento de alrededor de un 40% en la corriente evocada por un pulso de +150 mV. Sin embargo, al aumentar la concentración de Tx por sobre 1  $\mu$ M, se produce un importante decremento o inhibición de la corriente, al igual que en ausencia de la subunidad  $\beta 1$ . Se puede concluir entonces, que Tx tiene un efecto activador, dependiente de subunidad  $\beta 1$ , y un efecto bloqueador, independiente de subunidad  $\beta$ . Este último se debe a una interacción de la droga con la subunidad  $\alpha$ .

En presencia de la subunidad  $\beta 2IR$  no se observó activación del canal por Tx (Figura 19); sólo se observa el bloqueo a concentraciones mayores que 1  $\mu$ M. Para la subunidad  $\beta 4$ , tampoco se observó el efecto activador de Tx (Figura 19). Este último resultado no era esperado, dado que 17- $\beta$ -E2 sí fue capaz de activar canales  $\alpha +\beta 4$ . Esto pone de manifiesto que existen diferencias en la especificidad farmacológica del Tx respecto al 17- $\beta$ -E2.



**Figura 19. Efecto de Tamoxifeno (Tx) sobre el canal MaxiK en ausencia y presencia de subunidades  $\beta$ .**

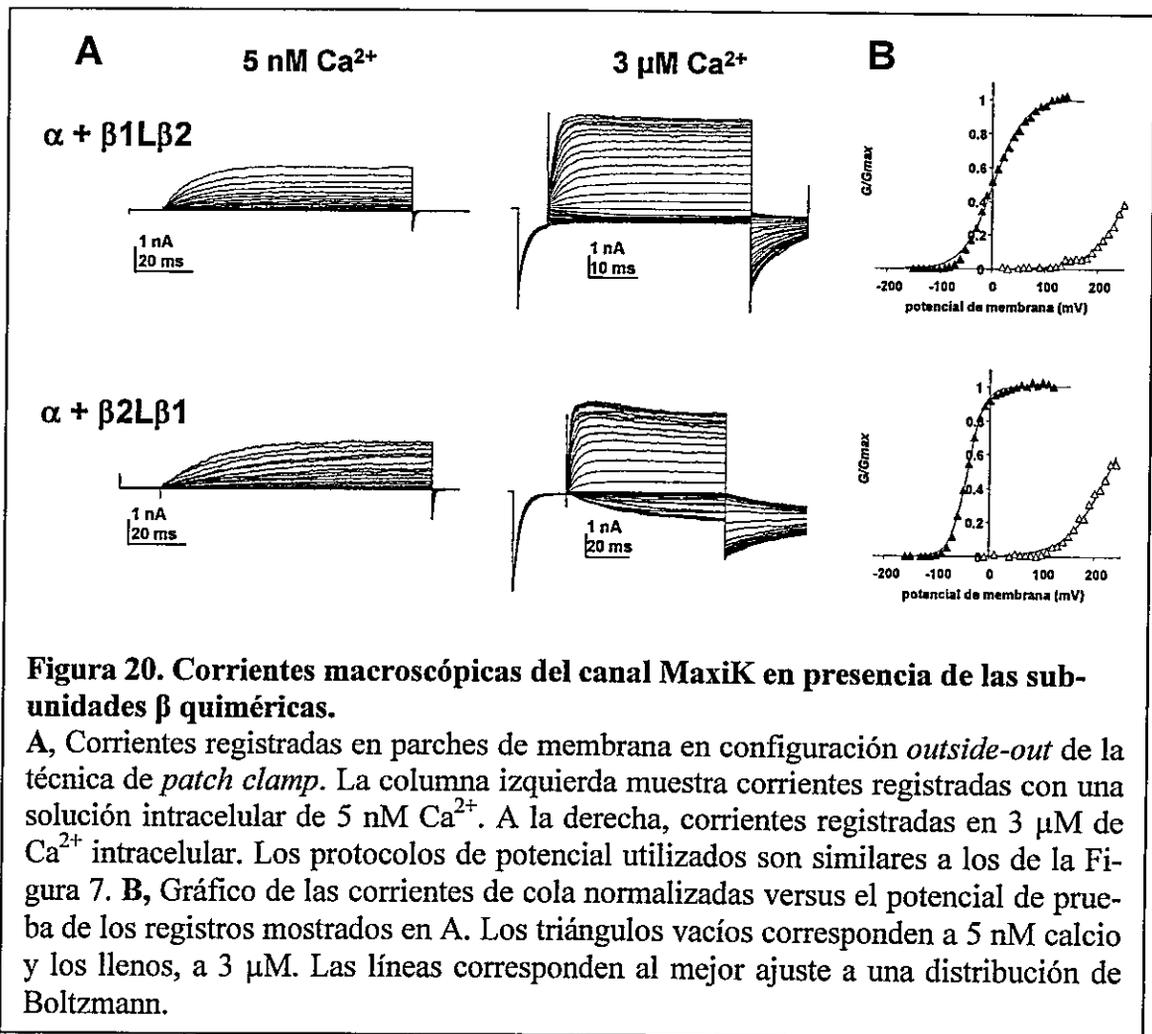
Se estudió el efecto de Tx en células HEK293 transfectadas con los DNAs correspondientes. Las barras muestran el valor promedio ( $\pm$  desviación estándar) de corriente en estado estacionario evocada por un pulso de 150 mV. El potencial de mantenimiento fue 0 mV y se aplicó un pulso de cola de -60 mV. La corriente fue normalizada en cada experimento por el valor en ausencia de Tx ( $\alpha$ : n=5;  $\alpha+\beta1$ : n=3;  $\alpha+\beta2$ -IR: n=2-4;  $\alpha+\beta4$ : n=2). Sobre cada barra se muestran trazos de corrientes representativas de cada condición.

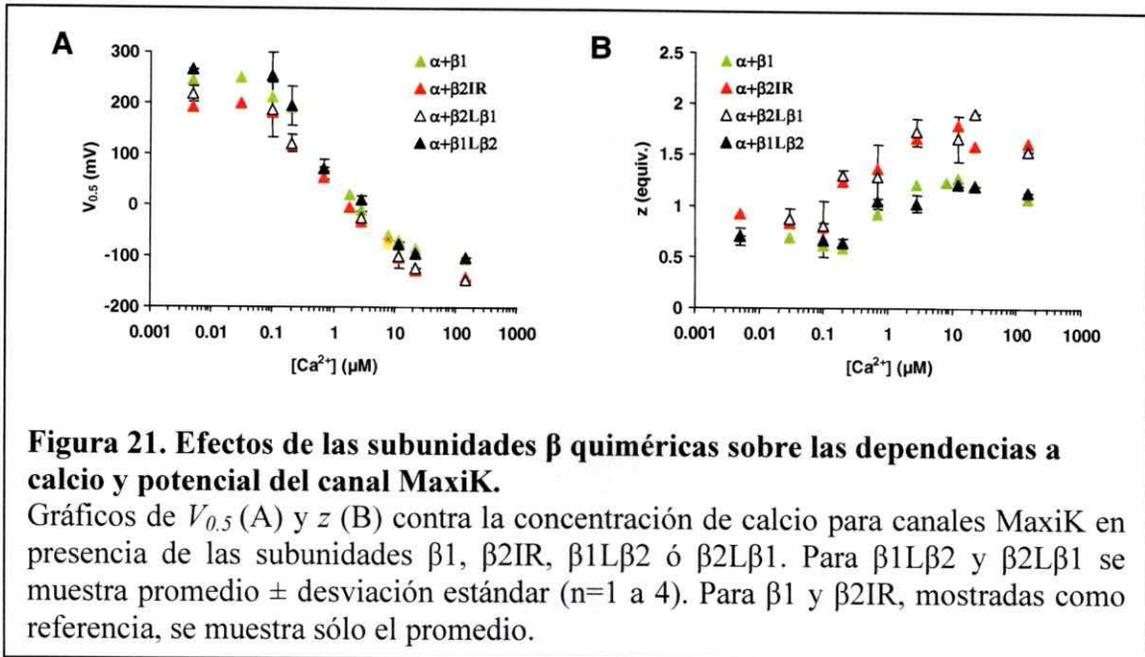
### 3. Efecto de Subunidades $\beta$ quiméricas sobre el canal MaxiK

#### 3.1. Efecto de las subunidades $\beta$ quiméricas sobre la sensibilidad a calcio y potencial del canal

Se construyeron subunidades  $\beta$  quiméricas entre  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$ , representadas esquemáticamente en la Figura 6 (Materiales y Métodos, página 26).  $\beta 2L\beta 1$  tiene los dominios transmembrana e intracelular de  $\beta 2IR$  y el dominio extracelular de  $\beta 1$ .  $\beta 1L\beta 2$  es la quimera inversa a  $\beta 2L\beta 1$ .

Se estudió el efecto que estas subunidades tienen sobre la sensibilidad a calcio y

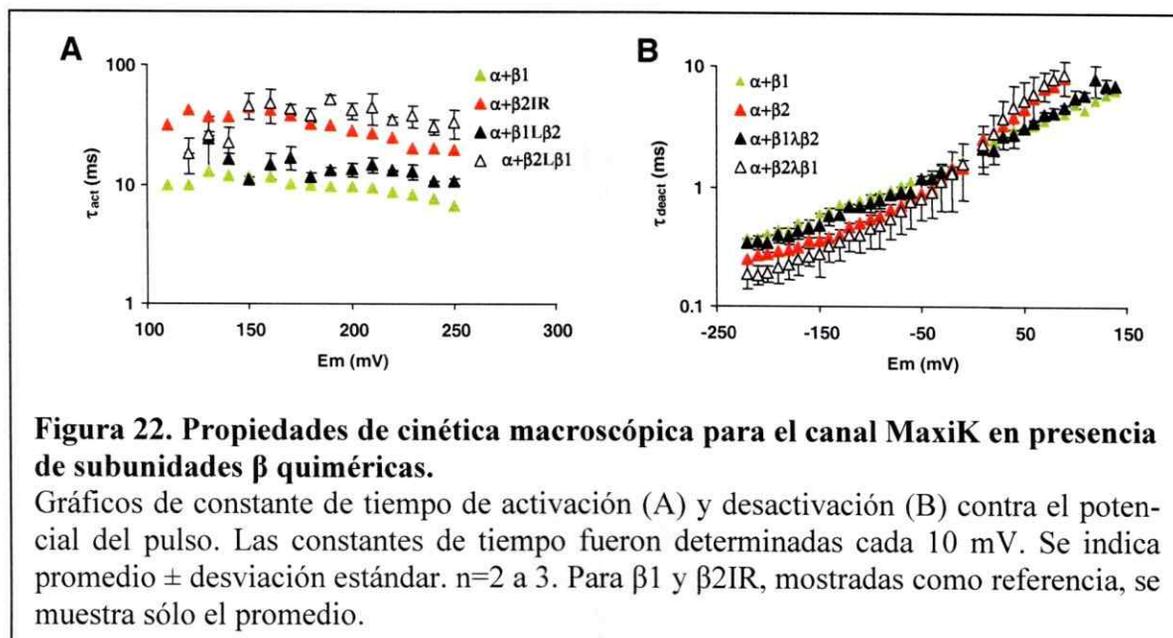




potencial del canal MaxiK. Se esperaba encontrar, en cada caso, similitudes ya sea con la subunidad  $\beta 1$  o con la subunidad  $\beta 2IR$ . En la Figura 20A se pueden ver familias de curvas de corriente macroscópica, evocadas por pulsos cuadrados de potencial. En la Figura 20B, el análisis de las corrientes de cola muestra que las curvas  $G/V$  se desplazan hacia potenciales negativos cuando aumenta el calcio intracelular, y que el desplazamiento es levemente mayor en el caso de  $\alpha+\beta 2L\beta 1$ . Además,  $\alpha+\beta 2L\beta 1$  tiene una mayor dependencia de potencial que  $\alpha+\beta 1L\beta 2$ . En la Figura 21 se resumen los resultados de análisis de curvas  $G/V$ , graficados como los valores de  $V_{0.5}$  y  $z$  contra la concentración de calcio. Los resultados muestran que el comportamiento de  $\alpha+\beta 1L\beta 2$  es similar al de  $\alpha+\beta 1$ , mientras que  $\alpha+\beta 2L\beta 1$  se parece a  $\alpha+\beta 2IR$ . Esto significa que las diferencias en los efectos de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  sobre el canal se asocia a los dominios transmembrana y/o intracelulares de las subunidades  $\beta$ .

### 3.2. Efecto de las subunidades $\beta$ quiméricas sobre la cinética macroscópica del canal MaxiK en ausencia de calcio.

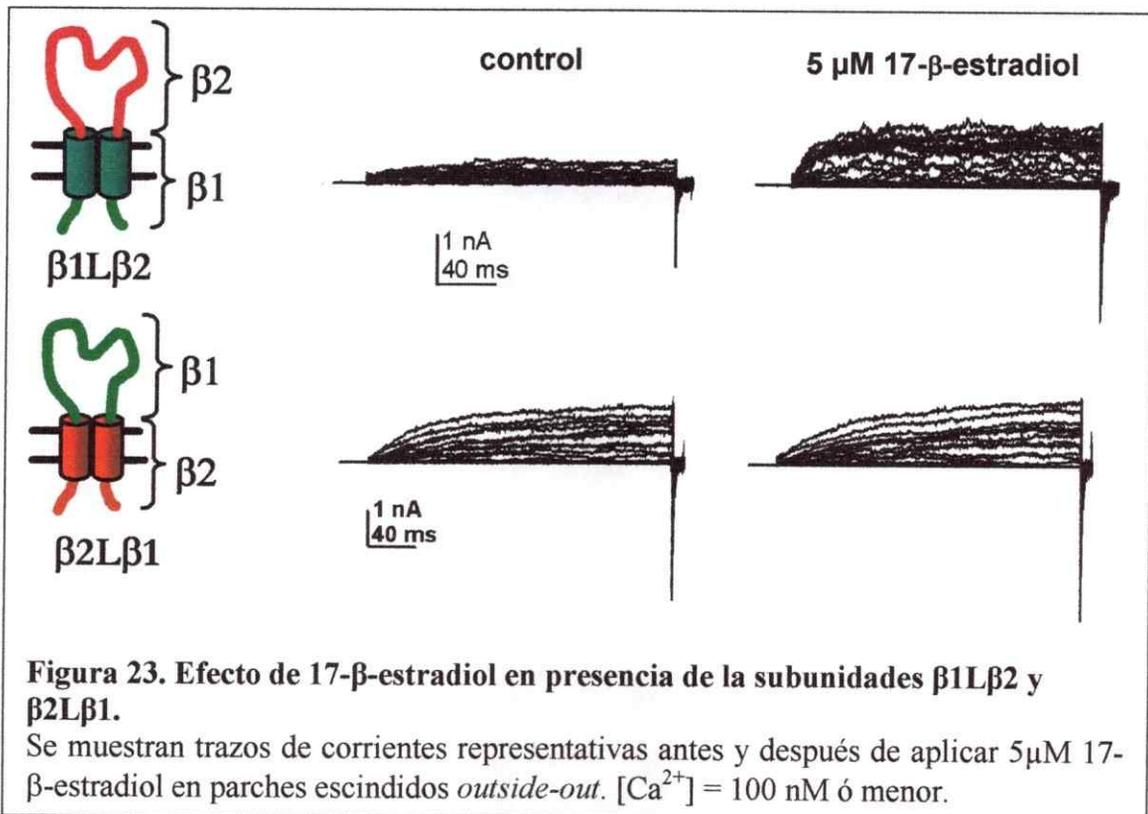
Algo similar ocurre con las propiedades de cinética macroscópica en ausencia de calcio del canal MaxiK. La cinética de activación de los canales  $\alpha+\beta 1L\beta 2$  es más rápida (tiene menores constantes de tiempo para la activación) que la de los canales  $\alpha+\beta 2L\beta 1$ , de manera que  $\alpha+\beta 1L\beta 2$  se asemeja a  $\alpha+\beta 1$  y  $\alpha+\beta 2L\beta 1$  se asemeja a  $\alpha+\beta 2IR$  (Figura 22A). En cuanto a la cinética de desactivación,  $\alpha+\beta 2L\beta 1$  es más rápida que  $\alpha+\beta 1L\beta 2$  a potenciales menores de 0 mV y se hace más lenta en potenciales positivos, exactamente el mismo patrón que se obtuvo al comparar canales  $\alpha+\beta 1$  y  $\alpha+\beta 2IR$  (Figura 22B). Estos resultados muestran que los efectos de las subunidades  $\beta$  sobre la cinética macroscópica del canal MaxiK también está relacionada con los dominio de transmembrana y/o intracelulares de éstas.



### 3.3. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol en presencia de las subunidades $\beta$ quiméricas

Se estudió el efecto de 17- $\beta$ -estradiol 5  $\mu$ M sobre canales MaxiK en presencia de las subunidades  $\beta$  quiméricas. Como se puede ver en la Figura 23, los canales  $\alpha$ + $\beta$ 1L $\beta$ 2 son activados por 17 $\beta$ E, y no así los canales  $\alpha$ + $\beta$ 2L $\beta$ 1. Al igual que en los estudios anteriores, podemos concluir que los segmentos de transmembrana e intracelular de las subunidades  $\beta$  están relacionados con el efecto de la hormona, y no el dominio extracelular.

Este resultado deja abierta dos posibles interpretaciones. En primer lugar, el sitio de interacción de 17 $\beta$ E puede encontrarse en los dominios de transmembrana de la subunidad  $\beta$ 1. Sin embargo, esta interpretación entra en cierto conflicto con los resultados obtenidos con análogos de 17- $\beta$ -E2 y Tx que no atraviesan la bicapa lipídica (Valverde y col., 1999; Dick y col., 2002). La segunda interpretación es que el estradiol puede inter-



**Figura 23. Efecto de 17- $\beta$ -estradiol en presencia de la subunidades  $\beta$ 1L $\beta$ 2 y  $\beta$ 2L $\beta$ 1.**

Se muestran trazos de corrientes representativas antes y después de aplicar 5  $\mu$ M 17- $\beta$ -estradiol en parches escindidos *outside-out*.  $[Ca^{2+}] = 100$  nM ó menor.

actuar tanto con la subunidad  $\beta 1$  como con la subunidad  $\beta 2IR$ , pero que los segmentos de transmembrana y/o intracelulares de  $\beta 1$  son necesarios para una correcta transducción del efecto activador. Esta interpretación se ve reforzada por los resultados que relacionan estos dominios con los efectos que las subunidades  $\beta$  tienen sobre las propiedades biofísicas del canal. Para distinguir entre ambas posibilidades, se intentó cuantificar, por distintos métodos, la unión directa de 17- $\beta$ -estradiol o de un análogo de Tamoxifeno a células que expresan el canal MaxiK. Sin embargo, ninguna de las metodologías empleadas entregó resultados reproducibles. Esto puede deberse a la baja constante de afinidad aparente (del orden de 1  $\mu M$ ) y también a la naturaleza liposoluble de estas moléculas, que hace que en los experimentos realizados la unión no específica sea muy alta.

## DISCUSIÓN

### 1. El efecto de las subunidades $\beta$ sobre el canal MaxiK

#### 1.1. Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2IR$ afectan la apertura del canal MaxiK por un mecanismo independiente a la unión de calcio.

La primera parte de los resultados presentados en esta tesis analiza los efectos que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  tienen sobre las propiedades más importantes del canal MaxiK: su sensibilidad a calcio y potencial y la cinética macroscópica. El efecto más llamativo de las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$  es un desplazamiento de las curvas  $P_{(O)}/V$ , efecto que ha sido inicialmente interpretado como un aumento (o disminución, en el caso de la subunidad  $\beta 4$ ) de la afinidad por calcio del canal. Para la subunidad  $\beta 1$  ya se ha mostrado que gran parte de su efecto es por un mecanismo independiente de la unión de calcio (Cox y Aldrich, 2000; Nimigeon y Magleby, 2000), y los resultados aquí presentados sugieren que lo mismo ocurre con la subunidad  $\beta 2IR$ . Dentro del contexto del modelo de activación alostérica por calcio y potencial del canal MaxiK, el efecto de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2IR$  puede ser perfectamente explicado sin un cambio importante en la afinidad de los sitios de unión de calcio.

El ajuste de las curvas  $G/V$  al modelo indica que ambas subunidades  $\beta$  tienen su principal efecto sobre los factores alostéricos, especialmente  $C$  y  $D$ . Estos parámetros representan la eficiencia del acoplamiento funcional entre los estímulos que activan el canal (unión de calcio y la activación de los sensores de potencial) y la apertura del ca-

nal. Por ejemplo, cada vez que se activa un sensor de potencial la constante de equilibrio para la apertura del canal se incrementa  $D$  veces. Es así como el modesto aumento en  $D$  de 15 a 25 (Tabla 4) cuando el canal está en presencia de la subunidad  $\beta 1$ , implica un aumento en 8 veces la constante de equilibrio cuando los cuatro sensores de potencial estén activados ( $LD^4$ ). Los factores alostéricos son de difícil interpretación estructural, pero su incremento puede estar relacionado a la facilitación de los cambios de conformación que ocurren cuando el canal se abre y a la estabilización de los estados abiertos. En efecto, los registros de canal único muestran que la subunidad  $\beta 1$  incrementa tanto la duración de los episodios de actividad ('bursts') como la de los periodos silentes que quedan entre ellos ('gaps'). La duración de los episodios de actividad aumenta aproximadamente 7 veces más que la de los periodos silentes lo que trae como consecuencia un aumento en la probabilidad del estado abierto (Nimigeon y Magleby, 2000).

Una predicción estricta de este modelo alostérico es que un cambio en los factores alostéricos no afecta el comportamiento del canal cerrado, pero sí el del canal abierto. Es decir, la afinidad del canal cerrado por calcio (con constante de equilibrio  $K$ ) no se ve afectada pero sí cambia la afinidad por calcio del canal abierto (con constante de equilibrio  $KC$ ;  $C > 1$ ). Lo mismo se espera para el movimiento del sensor de potencial (con constantes de equilibrio  $J$  y  $JD$ , respectivamente;  $D > 1$ ). La caracterización de la unión de calcio y del movimiento de los sensores de potencial cuando el canal está abierto, verificaría experimentalmente esta predicción (ver por ejemplo Horrigan y Aldrich, 2002).

### 1.2. Diferencias entre las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$

El sello distintivo de la subunidad  $\beta 2$  es su dominio de inactivación rápida, pero ésta también tiene efectos importantes sobre la sensibilidad a calcio del canal. Si bien los efectos son cualitativamente similares a los de la subunidad  $\beta 1$ , un estudio detallado de los efectos de la subunidad  $\beta 2$  sin su dominio de inactivación ( $\beta 2IR$ ) revela importantes diferencias. A todas las concentraciones de calcio estudiadas, la subunidad  $\beta 2IR$  hace que el canal tenga valores de  $V_{0.5}$  menores que con la subunidad  $\beta 1$ . Esta diferencia se acentúa en las concentraciones de calcio más extremas.

Cuando el calcio intracelular es menor a 100 nM el canal MaxiK deja de ser dependiente de calcio y sólo se activa por potencial. Es muy interesante que en estas condiciones el  $V_{0.5}$  en presencia de la subunidad  $\beta 1$  sea hasta 50 mV mayor que en su ausencia o con la subunidad  $\beta 2IR$ , ya que esta diferencia debe originarse en algún cambio en la dependencia de potencial del canal. Tanto el análisis de la pendiente límite como el ajuste al modelo de activación alostérico sugieren que la subunidad  $\beta 1$ , pero no la subunidad  $\beta 2IR$ , afecta el movimiento de los sensores de potencial del canal entre los estados cerrados. Este efecto puede deberse a una disminución del potencial medio de activación o a una reducción de la dependencia de potencial de los sensores.

### 1.3. Relevancia fisiológica de los efectos de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$

Todas las subunidades  $\beta$  tienen un patrón de expresión bastante definido en los tejidos de mamíferos. La subunidad  $\beta 1$  se encuentra preferentemente en distintos tipos de musculatura lisa (Chang y col., 1997; Jiang y col., 1999). Por su parte, la subunidad  $\beta 2$  se encuentra casi exclusivamente en el riñón y el páncreas (Wallner y col., 1999; Ue-

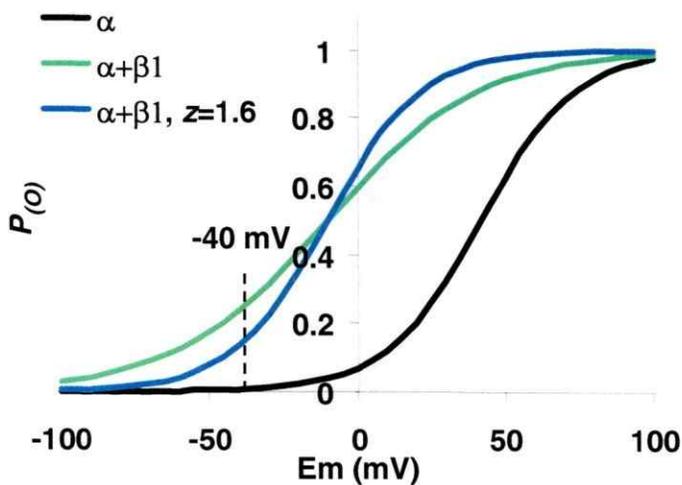
bele y col., 2000), aunque algunos reportes la han detectado en tejidos cerebrales (Xia y col., 1999). Este estricto patrón de expresión sugiere que las subunidades  $\beta$  regulan al canal MaxiK de manera específica, confiriéndole propiedades particulares en cada uno de los tejidos en que se expresa.

La correspondencia función–expresión ya ha sido demostrada para la subunidad  $\beta 1$  en la musculatura lisa vascular, gracias al estudio de un ratón *knock-out* que carece del gen que codifica esta proteína (Pluger y col., 2000; Brenner y col., 2000b). La sensibilidad a calcio que el canal tiene en presencia de la subunidad  $\beta 1$ , es un requisito para el acoplamiento correcto entre las chispas de calcio de las células musculares y la aparición de las corrientes espontáneas de salida (STOCs) que hiperpolarizan la célula. Cuando la subunidad  $\beta 1$  no está presente, la frecuencia de las STOCs disminuye drásticamente, las células musculares lisas no se hiperpolarizan lo suficiente, las paredes vasculares se estrechan y los animales son hipertensos (Pluger y col., 2000; Brenner y col., 2000b).

Si bien el factor más importante para el acoplamiento entre las chispas de calcio y las STOCs es la sensibilidad a calcio del canal, la menor dependencia de potencial que éste tiene en presencia de la subunidad  $\beta 1$  también puede ser un factor relevante. La Figura 24 muestra curvas  $P_{(O)}/V$  teóricas calculadas con una función de Boltzmann (ecuación (2)) usando los valores experimentales de  $V_{0.5}$  y  $z$  para canales MaxiK  $\alpha$  y  $\alpha+\beta 1$  en  $2.8 \mu\text{M}$  de calcio intracelular, concentración cercana a la estimación mínima para una chispa de calcio. Junto a la curva de  $\alpha+\beta 1$ , se muestra una tercera curva teórica correspondiente a un canal con la misma dependencia de potencial de  $\alpha$  (1.6). Se puede ver que a  $-40 \text{ mV}$  –potencial de reposo de una célula muscular lisa– y a cualquier potencial menor que el  $V_{0.5}$ , un canal con una menor dependencia de potencial ( $z$ ) tendrá una ma-

yor probabilidad de estado abierto. Tanto esta menor dependencia de potencial como la cinética de desactivación más lenta, deben contribuir a que los eventos de STOCs tengan una mayor duración y un mayor efecto en el potencial de membrana de las células musculares lisas.

En el caso de la subunidad  $\beta_2$ , su presencia se evidencia funcionalmente en células cromafines de la médula adrenal de rata, ya que alrededor de un 75% de éstas presentan corrientes de canales MaxiK que se inactivan, denominadas  $BK_i$  (Solaro y col., 1995). Estas células pueden disparar potenciales de acción de manera repetida cuando son estimuladas con un pulso de corriente sostenido, lo que no sucede en las células cromafines con corrientes de MaxiK que no se inactivan ( $BK_s$ ). Se observó que los po-



**Figura 24. Efecto de la dependencia de potencial ( $z$ ) sobre la activación del canal por calcio.**

Curvas teóricas de  $P(O)/V$  generadas usando los valores experimentales de  $V_{0.5}$  a  $[Ca^{2+}] = 2.8 \mu M$ , para la subunidad  $\alpha$  sola (42 mV) o en presencia de la subunidad  $\beta_1$  (-10 mV). Para  $\alpha$ ,  $z=1.6$ . Para  $\alpha + \beta_1$ , se muestra una curva con  $z=1$  y otra con  $z=1.6$ . Las curvas se generaron usando una función de Boltzmann. Se indica el potencial de reposo aproximado para una célula de musculatura lisa vascular (-40 mV).

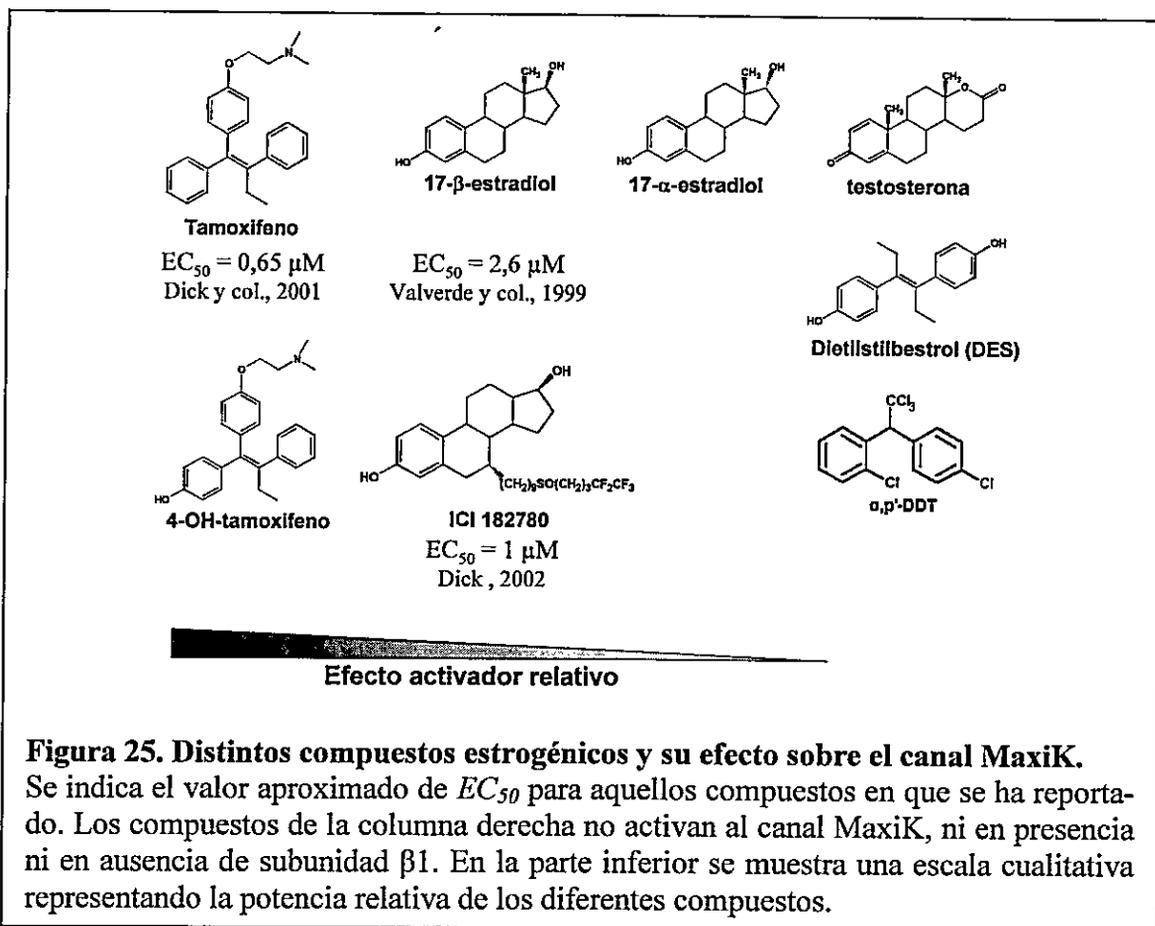
tenciales de acción de las células con corrientes  $BK_i$  tienen una post-hiperpolarización más acentuada, que contribuiría a recuperar más rápidamente los canales de sodio para permitir un nuevo potencial de acción. Solaro y col. (1995) atribuyen esta diferencia a que las corrientes  $BK_i$  se desactivan más lentamente que las  $BK_s$ , al igual que las  $\alpha+\beta 2IR$  respecto a las  $\alpha$ . Curiosamente, no se ha establecido un papel para el proceso de inactivación, la característica más notable de la subunidad  $\beta 2$ .

No hay datos experimentales que nos indiquen el impacto fisiológico del aumento en la sensibilidad a calcio producido por la subunidad  $\beta 2$ . Sin embargo, sí se ha establecido que el bloqueo de los canales MaxiK por CTX impide el disparo repetitivo de las células con corrientes  $BK_i$  (Solaro y col., 1995). Esto indicaría que la activación de este canal durante un potencial de acción es necesaria para posthiperpolarizar la célula rápidamente. Se puede esperar que si los canales MaxiK en las células cromafines no tuvieran la sensibilidad a calcio incrementada por la presencia de la subunidad  $\beta 2$ , se activarían menos durante el potencial de acción. Esto produciría una posthiperpolarización deficiente y no permitiría un disparo repetitivo de potencial de acción.

## **2. El efecto de 17- $\beta$ -estradiol y Tamoxifeno**

### **2.1. Farmacología de la activación por estrógenos**

Los resultados presentados muestran que no sólo el 17- $\beta$ -estradiol, sino también el antiestrógeno tamoxifeno (Tx), activa al canal MaxiK en presencia de su subunidad  $\beta 1$ . Llama la atención que dos moléculas que en un sistema (la activación del receptor nuclear de estrógenos) funcionan como agonista y antagonista, respectivamente, tengan un mismo efecto en el canal MaxiK. La base molecular del antagonismo entre el 17 $\beta$ E y



el Tx (Shiau y col., 1998) ofrece una explicación, ya que este último compuesto se une al receptor nuclear de estrógenos pero impide su dimerización. La dimerización del receptor es un requisito para su transferencia al núcleo, en donde ejerce su papel de regulador de la expresión génica. Es posible que para la activación del canal MaxiK baste la unión del compuesto y por eso tanto 17-β-estradiol como Tx tendrían el mismo efecto.

Al observar el efecto de otros compuestos relacionados a 17-β-estradiol y Tx, podemos tener una idea de los requerimientos del sitio de unión de estrógenos que produce la activación del canal MaxiK. La Figura 25 resume varias de estas observaciones. Se ha mostrado que 17-α-estradiol tiene un efecto parcial, menor al de 17-β-estradiol (Valverde y col., 1999). La pequeña diferencia estereoquímica entre ambas moléculas

evidencia la necesidad de una correcta ubicación del grupo 17-OH para el efecto de la droga. Testosterona, un compuesto relacionado pero con varias diferencias en su estructura química, no tiene efecto sobre el canal MaxiK (datos no publicados del laboratorio). El antagonista esteroidal ICI 182780 (Faslodex™) también activa al canal, con una potencia similar a la de 17- $\beta$ -estradiol (Dick, 2002). Al igual que Tx, este antagonista se une al receptor nuclear pero el voluminoso grupo químico en la posición 7 $\alpha$  impide su dimerización. Nuevamente, esto indica que el único requisito para la activación del canal MaxiK es la unión de un compuesto adecuado.

El 4-OH-tamoxifeno, metabolito activo de Tx, también activa al canal en presencia de la subunidad  $\beta$ 1 y de manera similar al Tx (Dick y Sanders, 2001). El Dietilestilbestrol (DES), un agonista no esteroidal del receptor nuclear que interactúa con el sitio de unión de ligando de este receptor de manera muy parecida al 4-OH-Tx (Shiau y col., 1998), no es capaz de activar al canal MaxiK y, al igual que Tx, tiene un efecto inhibitorio independiente de subunidad  $\beta$  (Yolima Torres, tesis de Magíster; datos no publicados del laboratorio). Ya que DES no activa al canal, la interacción de Tx con el canal MaxiK debe tener importantes diferencias cuando se la compara con la interacción de este compuesto con el receptor nuclear de estrógenos. El o,p'-DDT es un insecticida que, al igual que 17- $\beta$ -estradiol y Faslodex™, provoca una relajación aguda de la musculatura lisa vascular por inhibición de canales de calcio tipo-L (Ruehlmann y col., 1998). Este compuesto tampoco activa al canal (datos no publicados del laboratorio).

Se han estudiado muy pocos compuestos como para elaborar una farmacología completa de la activación del canal MaxiK por estrógenos. Sin embargo, se puede afirmar que existen claras diferencias con la farmacología de los receptores nucleares, sugi-

riendo un sitio de unión completamente diferente. Por otra parte, la especificidad del efecto hacia ciertas moléculas y no otras, habla de una interacción definida, y no de un efecto inespecífico como, por ejemplo, uno debido a la alteración del entorno lipídico del canal.

## 2.2. La inhibición del canal MaxiK por Tamoxifeno

El antiestrógeno Tx mostró un efecto bifásico, dependiente de la concentración, sobre el canal: a concentraciones menores de 1  $\mu\text{M}$  Tx activa el canal de una manera dependiente de la subunidad  $\beta_1$ , y a concentraciones mayores se observa una inhibición del canal que es independiente de la presencia de cualquier subunidad  $\beta$ . Esta inhibición parece no estar relacionada a la sensibilidad del canal al calcio ni al potencial eléctrico, ya que las curvas  $G/V$  no se desplazan y sólo se afecta la  $P_{(0)}$  máxima. El mecanismo de inhibición más simple que da cuenta de esta observación es un bloqueo directo de la vía de conducción, pero esto debe ser confirmado con otras evidencias experimentales tales como registros de canal único.

Los otros reportes de activación del canal por Tx han señalado sólo una pequeña inhibición, de alrededor de un 5%, asociada a una disminución de la conductancia unitaria (Dick y col., 2001). Otras publicaciones mencionan sólo la inhibición, sin que se observe activación (Perez, 2003), o un efecto dependiente de la concentración de calcio (Perez, 2004). Las contradicciones en estas observaciones pueden deberse a diferencias de especie o en las preparaciones de los canales utilizados.

Se ha reportado también que Tx inhibe canales de sodio y potasio en células de la glia (Smitherman y Sontheimer, 2001), así como también algunos canales de cloruro

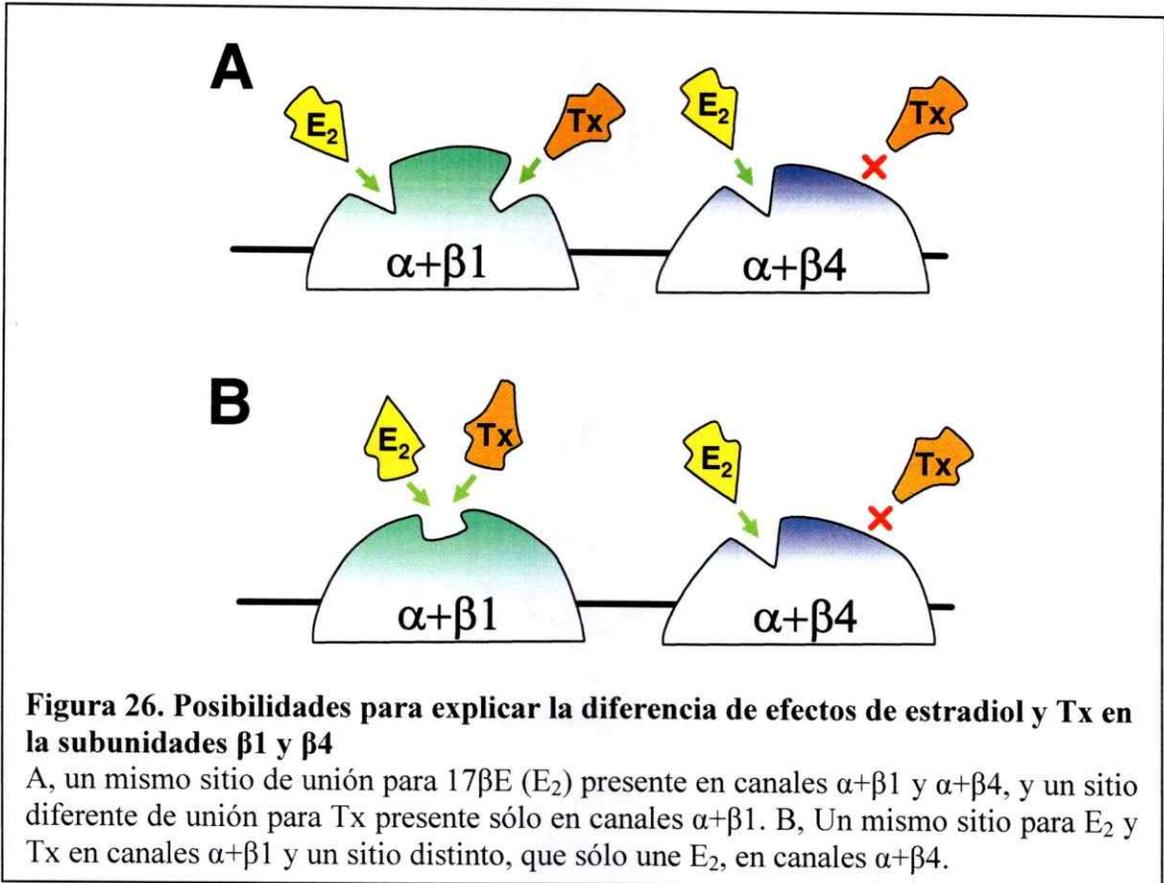


(Zhang y col., 1994). Si bien no hay estudios biofísicos detallados, en todos estos casos se trata aparentemente de un bloqueo de la vía de conducción. Es posible que todos estos canales, junto al canal MaxiK, tengan algún determinante estructural en común que permite la interacción de Tx con el poro o vía de conducción del canal.

### 2.3. La especificidad por las subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$

La activación por  $17\beta E$  se observó en presencia de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 4$  (y no de la  $\beta 2$ ), mientras que la activación del canal por Tx sólo se observó en presencia de la subunidad  $\beta 1$ . Este es también un claro indicio de una interacción específica. Pero por otro lado, el que la subunidad  $\beta 1$  responda a ambas drogas mientras que la subunidad  $\beta 4$  lo haga sólo a  $17\beta E$  es un resultado que tiene dos posibles explicaciones.

La primera posibilidad es que en presencia de la subunidad  $\beta 1$  existan dos sitios distintos para la unión de  $17\beta E$  y Tx, respectivamente, mientras que en presencia de la subunidad  $\beta 4$  exista el sitio de unión para  $17\beta E$  pero no el de Tx. Alternativamente, en la presencia de la subunidad  $\beta 1$  puede existir un solo sitio que une ambas moléculas, mientras que en presencia de la subunidad  $\beta 4$  existiría un sitio distinto, que uniría sólo  $17\beta E$  (ambas interpretaciones se encuentran representadas gráficamente en la Figura 26A). Dada la baja similitud de secuencia entre las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 4$  (la más baja entre todas las subunidades  $\beta$ ), la segunda alternativa parece más probable. Estudios farmacológicos más extensivos entregarán las herramientas para distinguir entre las dos posibles explicaciones.



**2.4. Los segmentos de transmembrana y el efecto de estrógenos**

Los resultados con las subunidades  $\beta$  quiméricas proponen a los dominios intracelulares y/o de transmembrana de la subunidad  $\beta1$  como el requerimiento estructural para la activación del canal por 17- $\beta$ -estradiol. Como ya se mencionó, este resultado no es suficiente para proponer a estos dominios como el sitio de unión para estrógenos. El 17- $\beta$ -estradiol puede unirse a la región extracelular de las subunidades  $\beta$  y los dominios de transmembrana e intracelulares serían un requerimiento para la transducción del efecto. La identificación de estos dominios como responsables del acoplamiento funcional para los efectos de las subunidades  $\beta$  sobre las propiedades de compuerta del canal MaxiK, apoya aún más esta posibilidad.

### 3. Identificación de dominios funcionales.

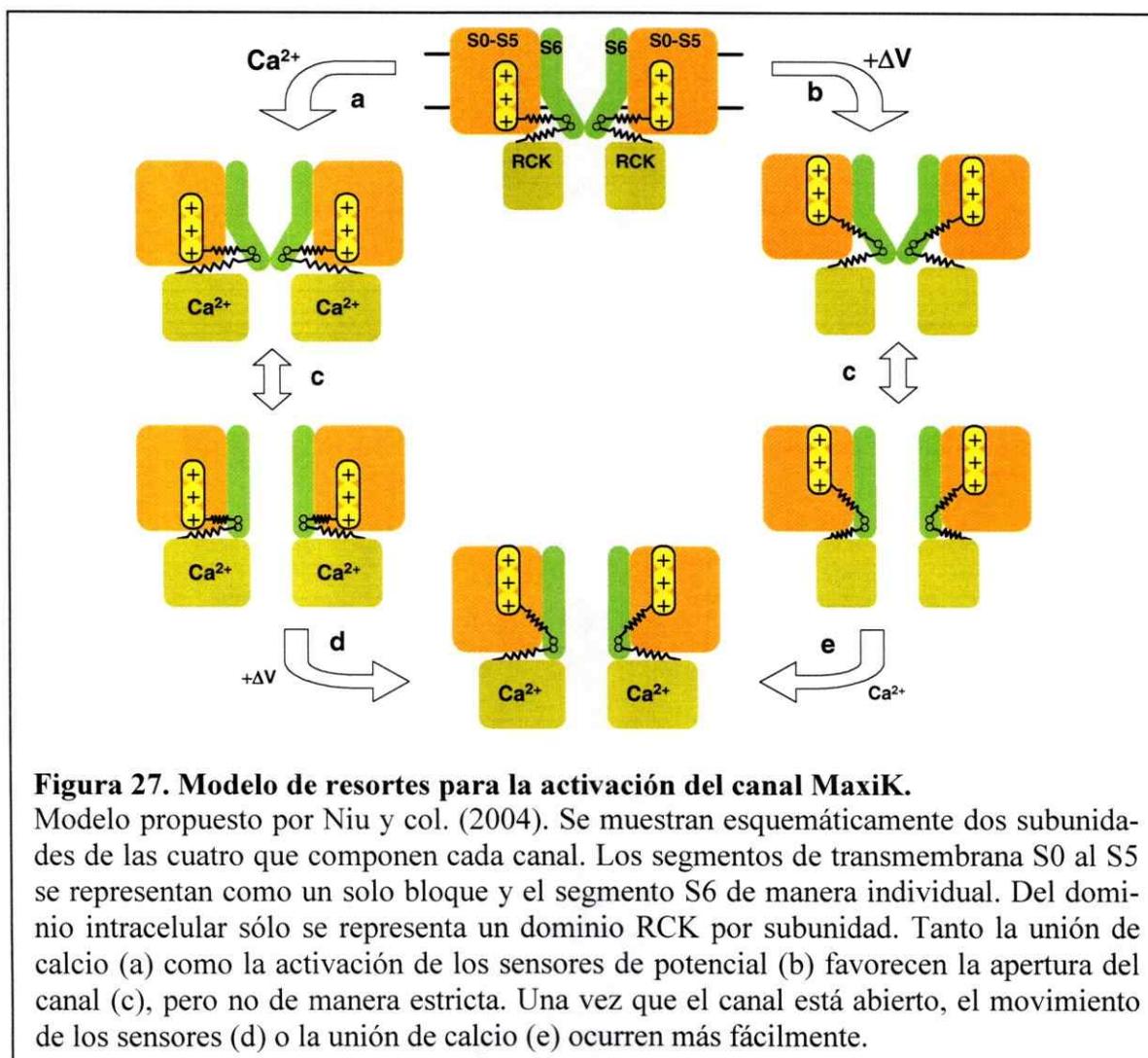
#### 3.1. Las subunidades $\beta$ y el acoplamiento funcional en la activación del canal

Los resultados obtenidos en la primera parte de la tesis indican que las mayores diferencias en los efectos de las subunidades  $\beta$  estudiadas parecen estar relacionadas con efectos sobre el movimiento del sensor de potencial. La interpretación de los datos con el modelo alostérico de activación indica que ambas subunidades  $\beta$  afectan el acoplamiento funcional de la compuerta del canal con los estímulos que lo activan, mientras que sólo la subunidad  $\beta_1$  afecta el movimiento de los sensores de potencial del canal. Por otra parte, los resultados obtenidos con las subunidades  $\beta$  quiméricas establecen que las diferencias en la modulación de las propiedades del canal MaxiK por las subunidades  $\beta_1$  y  $\beta_2$ IR, están asociadas a los dominios de transmembrana y/o intracelulares de éstas. Si juntamos estas dos observaciones, podemos inferir que los segmentos de transmembrana e intracelulares de la subunidad  $\beta_1$  son los que interactúan con los sensores de potencial del canal (Figura 28A). Esto tiene mucho sentido con la localización molecular de los sensores de potencial en la subunidad  $\alpha$ , que estarían formados principalmente por el segmento S4 de transmembrana (Diaz y col., 1998) con alguna posible participación de los segmentos S2 y S3 como en el caso del sensor de potencial del canal *Shaker* (Papazian y col., 1995; Seoh y col., 1996).

Por otra parte, ambas subunidades ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ) alteran el acoplamiento funcional entre los estímulos que activan el canal –el movimiento de los sensores de potencial y la unión de calcio– y la apertura de la compuerta. En el modelo de activación alostérica, este acoplamiento funcional está representado por los factores *C* y *D*. Aunque existen

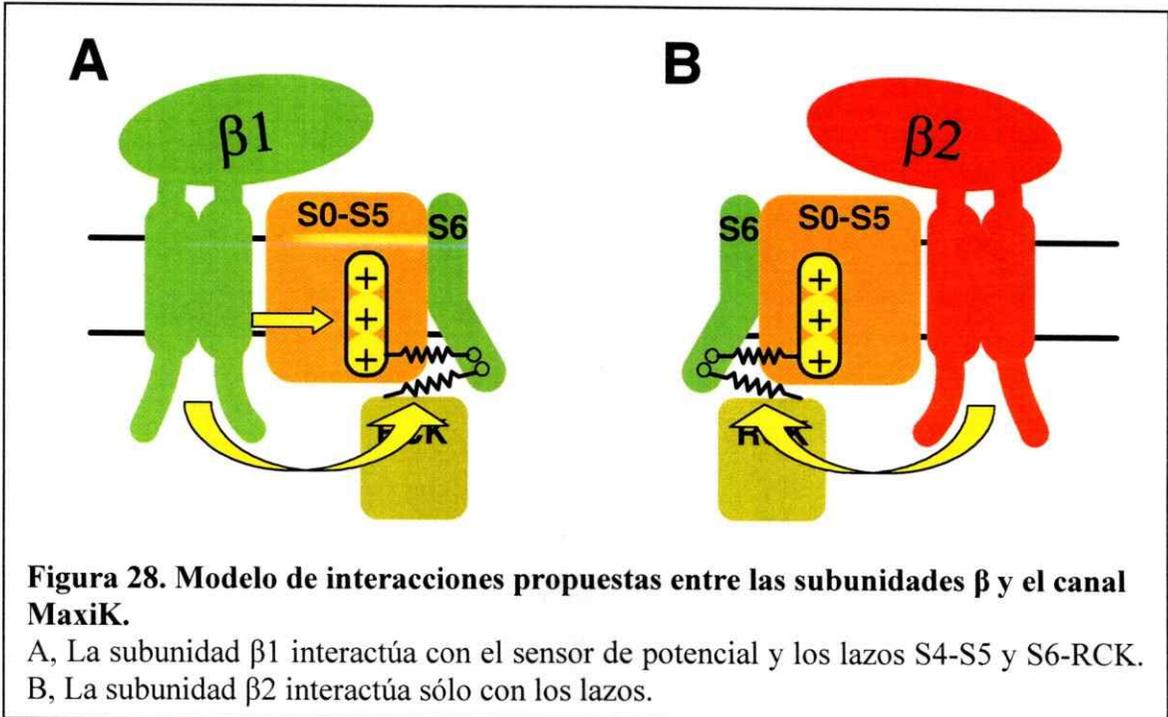
diferencias cuantitativas entre ambas subunidades  $\beta$ , el efecto cualitativo es el mismo. Es por lo tanto difícil establecer qué papel juegan los segmentos de transmembrana e intracelulares en estos efectos, y para poder inferir algo más debemos considerar las estructuras que en la subunidad  $\alpha$  llevan a cabo estos acoplamientos.

El acoplamiento funcional entre el movimiento de los sensores de potencial y la compuerta del canal no ha sido estudiado en el canal MaxiK, pero sí en otros canales dependientes de potencial. Al parecer, el lazo entre los segmentos S4 y S5 cumple gran



**Figura 27. Modelo de resortes para la activación del canal MaxiK.**

Modelo propuesto por Niu y col. (2004). Se muestran esquemáticamente dos subunidades de las cuatro que componen cada canal. Los segmentos de transmembrana S0 al S5 se representan como un solo bloque y el segmento S6 de manera individual. Del dominio intracelular sólo se representa un dominio RCK por subunidad. Tanto la unión de calcio (a) como la activación de los sensores de potencial (b) favorecen la apertura del canal (c), pero no de manera estricta. Una vez que el canal está abierto, el movimiento de los sensores (d) o la unión de calcio (e) ocurren más fácilmente.



parte de esta función, junto con el extremo intracelular del segmento S6 (Chen y col., 2001; Lu y col., 2002; Tristani-Firouzi y col., 2002). Para el acoplamiento funcional entre la unión de calcio y la activación del canal, las evidencias recientes postulan al segmento o lazo que se encuentra entre el segmento S6 y el dominio RCK como responsable de esta función (Niu y col., 2004). En el trabajo de Niu y col. (2004) los resultados muestran que el largo del lazo S6-RCK está inversamente relacionado a la  $P_{(O)}$  del canal, lo que llevó a los autores a proponer un modelo de ‘resortes’ para la activación del canal. Según este modelo, ambos lazos (S4-S5 y S6-RCK) estarían funcionando en el canal MaxiK como ‘resortes’ que estabilizan o favorecen uno de los estados de la compuerta del canal (cerrado o abierto), según la posición de los sensores de potencial y el estado de los dominios RCK (Figura 27).

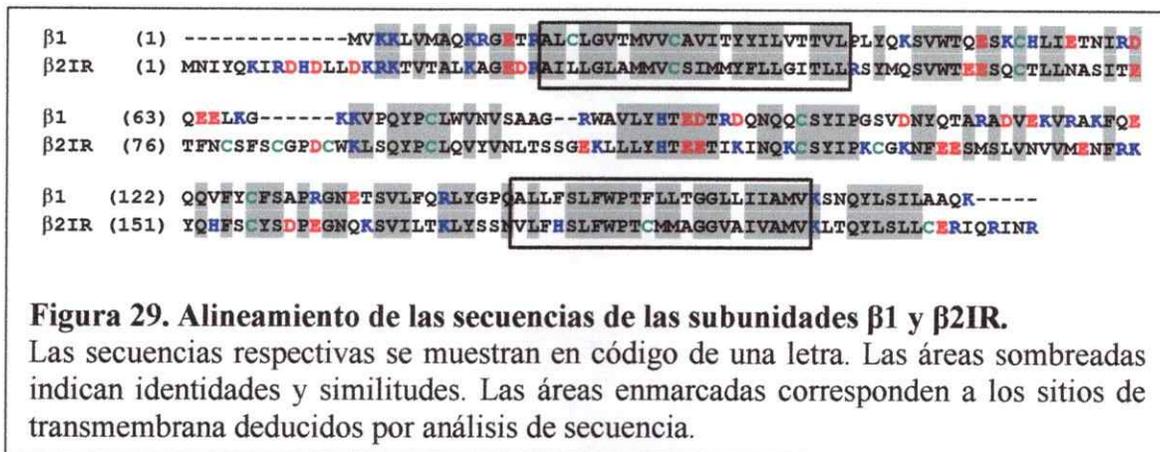
En el contexto del modelo propuesto por Niu y col (2004), los resultados indican que las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  deben estar afectando el funcionamiento de los lazos-



resortes, es decir los lazos S4-S5 y S6-RCK (Figura 28A y B). Al ser éstas estructuras intracelulares, los dominios intracelulares de las subunidades  $\beta$  están en el lugar idóneo para modificar su funcionamiento.

### 3.2. Diferencias en la secuencia de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$

De todas las subunidades  $\beta$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  son las de secuencia más parecida, con un 34.9% de residuos idénticos más un 11.5% de residuos similares. No es extraño, entonces, que los efectos de ambas subunidades sobre el canal sean similares. Pero por otra parte, la similitud de secuencia implica que las diferencias funcionales encontradas deben residir en unos pocos residuos aminoacídicos. Los dominios de transmembrana e intracelulares, responsables de las diferencias entre las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , tienen una similitud de secuencia aún mayor. En la Figura 29 se puede ver que la mayor diferencia es claramente la longitud de los segmentos intracelulares, mientras que los segmentos de transmembrana difieren en sólo unos pocos aminoácidos (alrededor de 50% de residuos idénticos). Entonces, los resultados obtenidos orientan de manera importante la construcción y caracterización de nuevas quimeras y mutaciones puntuales, porque los experimentos futuros deberán restringirse a segmentos bastante pequeños de las subunidades  $\beta$ . De esta manera se definirán los residuos involucrados en la interacción de la subunidad  $\alpha$  con las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ .



### 3.3. Papel del dominio extracelular

Es posible que el dominio extracelular también esté involucrado en el acoplamiento funcional de las subunidades  $\beta$  del canal MaxiK. En una publicación reciente (Fernandez-Fernandez y col., 2004), demostramos que un polimorfismo en un residuo ubicado en el lazo extracelular de la subunidad  $\beta 1$  humana también tiene consecuencias sobre los cambios en sensibilidad a calcio que esta subunidad provoca sobre el canal. Este polimorfismo, presente en aproximadamente un 20% de la población, consiste en el cambio de un ácido aspártico en la posición 65 por una lisina ( $E65K$ ). En presencia de la subunidad  $\beta 1_{E65K}$  el canal tiene una mayor sensibilidad a calcio que en presencia de la subunidad  $\beta 1_{wt}$ , reflejada en una diferencia de hasta 30 mV en el  $V_{0.5}$ . Este polimorfismo, sin embargo, no altera la cinética macroscópica del canal. En el marco del modelo de activación alostérica por potencial y por calcio, este efecto se pudo explicar tan sólo con un leve cambio en los parámetros  $J_0$  y  $K_d$  respecto a la subunidad  $\beta 1_{wt}$  (Fernandez-Fernandez y col., 2004).

Como ya se comentó, algunos de los efectos de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  sobre las propiedades del canal son similares. Por eso, los resultados con las subunidades  $\beta$  qui-

méricas no permiten atribuir completamente estos efectos a los segmentos de transmembrana e intracelulares. Es posible que los dominios extracelulares de ambas subunidades  $\beta$  tengan un efecto importante sobre el canal pero que éste sea el mismo para las dos. El estudio de quimeras con otras subunidades  $\beta$  —especialmente las subunidades  $\beta 3$ , que no tienen efectos aparentes sobre la sensibilidad a calcio y potencial del canal— y también de deleciones o mutaciones en el lazo extracelular, entregará más información sobre el papel de este dominio.

## APÉNDICES

### 1. Derivación de la probabilidad del estado abierto para el modelo de activación alostérica (Ecuación 1).

Para un modelo cinético cualquiera con  $m$  estados cerrados y  $n$  estados abiertos, la probabilidad de encontrar el canal abierto está dada por la expresión

$$P_{(o)} = \frac{\sum_i^n O_i}{\sum_i^m C_i + \sum_i^n O_i} \quad (9)$$

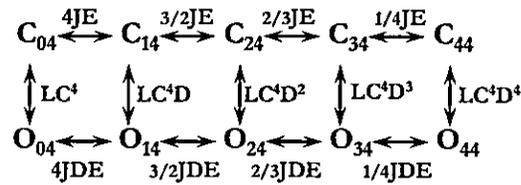
Para el caso del canal MaxiK, definimos  $C_{ij}$  y  $O_{ij}$  como la probabilidad estadística de los estados cerrados y abiertos, respectivamente, con  $i$  sensores de potencial activados y  $j$  sitios de unión de calcio ocupados ( $i=0,1,2,3,4$  y  $j=0,1,2,3,4$ ). Cuando no hay calcio unido, ( $i=0,1,2,3,4$  y  $j=0$ ) el esquema de la Figura 3B (página 8) nos dice que:

$$\begin{aligned} \frac{C_{10}}{C_{00}} &= 4J \\ \frac{C_{20}}{C_{00}} &= \frac{C_{20}}{C_{10}} \times \frac{C_{10}}{C_{00}} = \frac{3}{2} J \times 4J = 6J^2 \\ \frac{C_{30}}{C_{00}} &= \frac{C_{30}}{C_{20}} \times \frac{C_{20}}{C_{00}} = \frac{2}{3} J \times 6J^2 = 4J^3 \\ \frac{C_{40}}{C_{00}} &= \frac{C_{40}}{C_{30}} \times \frac{C_{30}}{C_{00}} = \frac{1}{4} J \times 4J^3 = J^4 \end{aligned}$$

Lo que lleva a

$$\sum_{i=0}^4 \frac{C_{i0}}{C_{00}} = 1 + 4J + 6J^2 + 4J^3 + J^4 = (1 + J)^4 \quad (10).$$

Cuando  $j=4$ , es decir cuando las cuatro subunidades del canal tienen sus sitios de unión de calcio ocupados, el esquema de la Figura 3B se transforma en



A partir de este esquema y de manera similar a la anterior, se puede deducir que

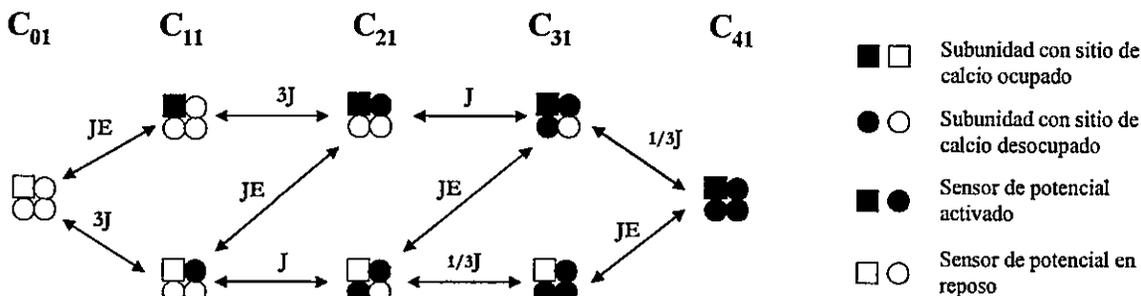
$$\sum_{i=0}^4 \frac{C_{i4}}{C_{04}} = 1 + 4JE + 6(JE)^2 + 4(JE)^3 + (JE)^4 = (1 + JE)^4$$

Como  $\frac{C_{04}}{C_{00}} = K^4$  (ver esquema en Figura 3A),

podemos escribir

$$\sum_{i=0}^4 \frac{C_{i4}}{C_{00}} = (1 + JE)^4 K^4 = (K + JKE)^4 \tag{11}$$

Para  $1 \leq j \leq 3$ , el modelo considera que cuando una subunidad del canal tiene su sitio de unión de calcio ocupado, la constante de equilibrio para su sensor de potencial es igual a  $JE$ , mientras que para los sensores de potencial en subunidades con sitios de calcio no ocupados la constante de equilibrio es  $J$ . Esto implica que existe más de un estado  $C_{ij}$  cuando  $1 \leq i, j \leq 3$ . El esquema para el equilibrio entre los estados cerrados  $C_{i1}$  ( $j=1$  e  $i=0,1,2,3,4$ ) queda de la siguiente manera:



De este esquema se deduce que

$$\sum_{i=0}^4 \frac{C_{i1}}{C_{01}} = 1 + 3J + 3J^2 + J^3 + JE + 3J^2E + 3J^3E + J^4E = (1 + J)^3 (1 + JE)$$

y como  $\frac{C_{01}}{C_{00}} = 4K$ ,

podemos escribir

$$\sum_{i=0}^4 \frac{C_{i1}}{C_{00}} = 4K(1 + J)^3 (1 + JE) = 4(1 + J)^3 (K + JKE) \tag{12}$$

De manera similar se puede demostrar que

$$\sum_{i=0}^4 \frac{C_{i2}}{C_{00}} = 6(1 + J)^2 (K + JKE)^2 \tag{13}$$

y  $\sum_{i=0}^4 \frac{C_{i3}}{C_{00}} = 4(1 + J)(K + JKE)^3 \tag{14}$

Sumando las ecuaciones (10), (11), (12), (13) y (14) y luego factorizando se tiene que:

$$\sum_{j=0}^4 \sum_{i=0}^4 \frac{C_{ij}}{C_{00}} = ((1 + J) + (K + JKE))^4 = (1 + J + K + JKE)^4 \tag{15}$$

En el caso de los estados abiertos, un desarrollo similar muestra que

$$\sum_{j=0}^4 \sum_{i=0}^4 \frac{O_{ij}}{O_{00}} = (1 + JD + KC + JKCDE)^4,$$

y dado que

$$\frac{O_{00}}{C_{00}} = L$$

podemos escribir

$$\sum_{j=0}^4 \sum_{i=0}^4 \frac{O_{ij}}{C_{00}} = L(1 + JD + KC + JKCDE)^4 \quad (16).$$

Finalmente, con las ecuaciones (9), (15) y (16) podemos escribir la expresión de la probabilidad del estado abierto indicada en la ecuación (1).

$$P_{(o)} = \frac{\sum_{i,j}^4 O_{ij}}{\sum_{i,j}^4 C_{ij} + \sum_{i,j}^4 O_{ij}} = \frac{\sum_{i,j}^4 \frac{O_{ij}}{C_{00}}}{\sum_{i,j}^4 \frac{C_{ij}}{C_{00}} + \sum_{i,j}^4 \frac{O_{ij}}{C_{00}}} = \frac{L(1 + JD + KC + JKCDE)^4}{L(1 + JD + KC + JKCDE)^4 + (1 + J + K + JKE)^4}$$

## 2. Significado de los parámetros del modelo de activación alostérica para el canal MaxiK

Parámetro Significado

$K_d$	Constante de disociación de cada sitio de unión de calcio, para el canal cerrado y sin sensores de potencial activados
$L_0$	Constante de equilibrio para la apertura del canal a potencial 0, sin sensores de potencial activados y en ausencia de calcio.
$J_0$	Constante de equilibrio para la activación de cada sensor de potencial a potencial 0, con el canal cerrado y en ausencia de calcio.
$z_L$	Dependencia de potencial de la transición C—O (constante de equilibrio $L$ ).
$z_J$	Dependencia de potencial de la transición R—A (constante de equilibrio $J$ ).
$C$	Factor alostérico entre la unión de calcio y la apertura del canal.
$D$	Factor alostérico entre la activación de un sensor de potencial y la apertura del canal.
$E$	Factor alostérico entre la activación de un sensor de potencial y la unión de calcio.
$V_{0.5}(J)$	$V_{0.5}$ del movimiento de los sensor de potencial o potencial en que $J=1$ .

$J_0$ ,  $z_J$  y  $V_{0.5}(J)$  están relacionados por la expresión

$$J_0 = \exp\left(\frac{-z_J F V_{0.5}(J)}{RT}\right)$$

## REFERENCIAS

Adams, P. R., Constanti, A., Brown, D. A., y Clark, R. B. (1982). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  activates a fast voltage-sensitive  $\text{K}^+$  current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature* 296:746-749.

Adelman, J. P., Shen, K. Z., Kavanaugh, M. P., Warren, R. A., Wu, Y. N., Lagrutta, A., Bond, C. T., y North, R. A. (1992). Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* 9:209-216.

Almers, W. (1978). Gating currents and charge movements in excitable membranes. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 82:96-190.

Alvarez, O., González, C., y Latorre, R. (2002). Counting channels: a tutorial guide on ion channel fluctuation analysis. *Adv.Physiol Educ.* 26:327-341.

Amberg, G. C., Bonev, A. D., Rossow, C. F., Nelson, M. T., y Santana, L. F. (2003). Modulation of the molecular composition of large conductance,  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^+$  channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J.Clin.Invest* 112:717-724.

Amberg, G. C. y Santana, L. F. (2003). Downregulation of the BK channel  $\beta 1$  subunit in genetic hypertension. *Circ.Res.* 93:965-971.

Armstrong, C. M. y Bezanilla, F. (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242:459-461.

Atkinson, N. S., Robertson, G. A., y Ganetzky, B. (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. *Science* 253:551-555.

Bao, L., Rapin, A. M., Holmstrand, E. C., y Cox, D. H. (2002). Elimination of the  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channel's high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. *J.Gen.Physiol* 120:173-189.

- Behrens, R., Nolting, A., Reimann, F., Schwarz, M., Waldschutz, R., y Pongs, O. (2000). hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel  $\beta$  subunit family. *FEBS Lett.* 474:99-106.
- Bezanilla, F. (2000). The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.* 80:555-592.
- Bezanilla, F. y Armstrong, C. M. (1977). Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J.Gen.Physiol* 70:549-566.
- Bian, S., Favre, I., y Moczydlowski, E. (2001).  $\text{Ca}^{2+}$ -binding activity of a COOH-terminal fragment of the *Drosophila* BK channel involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:4776-4781.
- Brenner, R., Jegla, T. J., Wickenden, A., Liu, Y., y Aldrich, R. W. (2000a). Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel  $\beta$  subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *J.Biol.Chem.* 275:6453-6461.
- Brenner, R., Pérez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T., y Aldrich, R. W. (2000b). Vasoregulation by the  $\beta 1$  subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407:870-876.
- Chang, C. P., Dworetzky, S. I., Wang, J., y Goldstein, M. E. (1997). Differential expression of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 45:33-40.
- Chen, J., Mitcheson, J. S., Tristani-Firouzi, M., Lin, M., y Sanguinetti, M. C. (2001). The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:11277-11282.
- Cox, D. H. y Aldrich, R. W. (2000). Role of the  $\beta 1$  subunit in large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel gating energetics. Mechanisms of enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. *J.Gen.Physiol* 116:411-432.
- Cox, D. H., Cui, J., y Aldrich, R. W. (1997). Allosteric gating of a large conductance Ca-activated  $\text{K}^+$  channel. *J.Gen.Physiol* 110:257-281.

- Cui, J. y Aldrich, R. W. (2000). Allosteric linkage between voltage and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of BK-type  $\text{mslo1}$   $\text{K}^+$  channels. *Biochemistry* 39:15612-15619.
- Cui, J., Cox, D. H., y Aldrich, R. W. (1997). Intrinsic voltage dependence and  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of  $\text{mslo}$  large conductance  $\text{Ca}$ -activated  $\text{K}^+$  channels. *J.Gen.Physiol* 109:647-673.
- Díaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L., y Latorre, R. (1998). Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (*hSlo*) channel. *J.Biol.Chem.* 273:32430-32436.
- Dick, G. M. (2002). The pure anti-oestrogen ICI 182,780 (Faslodex(TM)) activates large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 136:961-964.
- Dick, G. M., Hunter, A. C., y Sanders, K. M. (2002). Ethylbromide tamoxifen, a membrane-impermeant antiestrogen, activates smooth muscle calcium-activated large-conductance potassium channels from the extracellular side. *Mol.Pharmacol.* 61:1105-1113.
- Dick, G. M., Rossow, C. F., Smirnov, S., Horowitz, B., y Sanders, K. M. (2001). Tamoxifen activates smooth muscle BK channels through the regulatory  $\beta 1$  subunit. *J.Biol.Chem.* 276:34594-34599.
- Dick, G. M. y Sanders, K. M. (2001). (Xeno)estrogen sensitivity of smooth muscle BK channels conferred by the regulatory  $\beta 1$  subunit: a study of  $\beta 1$  knockout mice. *J.Biol.Chem.* 276:44835-44840.
- Doyle, D. A., Morais, C. J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., y MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of  $\text{K}^+$  conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Dworetzky, S. I., Boissard, C. G., Lum-Ragan, J. T., McKay, M. C., Post-Munson, D. J., Trojnacki, J. T., Chang, C. P., y Gribkoff, V. K. (1996). Phenotypic alteration of a human BK (*hSlo*) channel by *hSlo $\beta$*  subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J.Neurosci.* 16:4543-4550.

Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., y Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones –a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol.Rev.* 52:513-556.

Fernández-Fernández, J. M., Tomas, M., Vazquez, E., Orio, P., Latorre, R., Sentí, M., Marrugat, J., y Valverde, M. A. (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.

Gilligan, D. M., Badar, D. M., Panza, J. A., Quyyumi, A. A., y Cannon, R. O., III (1994). Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 90:786-791.

Hanner, M., Schmalhofer, W. A., Munujos, P., Knaus, H. G., Kaczorowski, G. J., y García, M. L. (1997). The  $\beta$  subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel contributes to the high-affinity receptor for charybdotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:2853-2858.

Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.

Horrigan, F. T. y Aldrich, R. W. (1999). Allosteric voltage gating of potassium channels II. mSlo channel gating charge movement in the absence of  $Ca^{2+}$ . *J.Gen.Physiol* 114:305-336.

Horrigan, F. T. y Aldrich, R. W. (2002). Coupling between voltage sensor activation,  $Ca^{2+}$  binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J.Gen.Physiol* 120:267-305.

Horrigan, F. T., Cui, J., y Aldrich, R. W. (1999). Allosteric voltage gating of potassium channels I. mSlo ionic currents in the absence of  $Ca^{2+}$ . *J.Gen.Physiol* 114:277-304.

Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., y Nelson, M. T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 278:C235-C256.

Jiang, C. W., Sarrel, P. M., Lindsay, D. C., Poole-Wilson, P. A., y Collins, P. (1991). Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by  $17\beta$ -oestradiol in vitro. *Br.J.Pharmacol.* 104:1033-1037.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., y MacKinnon, R. (2002). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-522.

Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B. T., y MacKinnon, R. (2001). Structure of the RCK domain from the *E. coli* K<sup>+</sup> channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* 29:593-601.

Jiang, Z., Wallner, M., Meera, P., y Toro, L. (1999). Human and rodent MaxiK channel  $\beta$ -subunit genes: cloning and characterization. *Genomics* 55:57-67.

Jin, P., Weiger, T. M., Wu, Y., y Levitan, I. B. (2002). Phosphorylation-dependent functional coupling of *hSlo* calcium-dependent potassium channel and its  $h\beta 4$  subunit. *J.Biol.Chem.* 277:10014-10020.

Kitazawa, T., Hamada, E., Kitazawa, K., y Gaznabi, A. K. (1997). Non-genomic mechanism of 17 $\beta$ -oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *J.Physiol* 499 ( Pt 2):497-511.

Knaus, H. G., Eberhart, A., Kaczorowski, G. J., y García, M. L. (1994a). Covalent attachment of charybdotoxin to the  $\beta$ -subunit of the high conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. Identification of the site of incorporation and implications for channel topology. *J.Biol.Chem.* 269:23336-23341.

Knaus, H. G., Folander, K., García-Calvo, M., García, M. L., Kaczorowski, G. J., Smith, M., y Swanson, R. (1994b). Primary sequence and immunological characterization of  $\beta$ -subunit of high conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel from smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 269:17274-17278.

Knaus, H. G., García-Calvo, M., Kaczorowski, G. J., y García, M. L. (1994c). Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the *mSlo* and *slowpoke* family of potassium channels. *J.Biol.Chem.* 269:3921-3924.

Lagrutta, A., Shen, K. Z., North, R. A., y Adelman, J. P. (1994). Functional differences among alternatively spliced variants of *Slowpoke*, a *Drosophila* calcium-activated potassium channel. *J.Biol.Chem.* 269:20347-20351.

- Latorre, R., Vergara, C., Alvarez, O., Stefani, E., y Toro, L. (2000). Voltage-gated calcium-modulated potassium channels of large unitary conductance: structure, diversity, and pharmacology. En *Pharmacology of Ionic Channel Function.*, eds. Endo, M., Kurachi, Y., y Mishina, M., ed. pp. 197-223. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Latorre, R., Vergara, C., y Hidalgo, C. (1982). Reconstitution in planar lipid bilayers of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79:805-809.
- Latorre, R., Vergara, C., y Moczydlowski, E. (1983). Properties of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in a reconstituted system. *Cell Calcium* 4:343-357.
- Losel, R. M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H. C., Rossol-Haseroth, K., y Wehling, M. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev.* 83:965-1016.
- Lu, Z., Klem, A. M., y Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated  $\text{K}^+$  channels. *J.Gen.Physiol* 120:663-676.
- Magleby, K. L. (2003). Gating Mechanism of BK (Slo1) Channels: So Near, Yet So Far. *J.Gen.Physiol* 121:81-96.
- Meera, P., Wallner, M., Jiang, Z., y Toro, L. (1996). A calcium switch for the functional coupling between  $\alpha$  (*hslo*) and  $\beta$  subunits ( $\text{K}_{V,Ca}\beta$ ) of maxi K channels. *FEBS Lett.* 382:84-88.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., y Toro, L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent  $\text{K}^+$  channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:14066-14071.
- Meera, P., Wallner, M., y Toro, L. (2000). A neuronal  $\beta$  subunit (KCNMB4) makes the large conductance, voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:5562-5567.

Nimigean, C. M. y Magleby, K. L. (2000). Functional coupling of the  $\beta 1$  subunit to the large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity from a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent mechanism. *J.Gen.Physiol* 115:719-736.

Niu, X., Qian, X., y Magleby, K. L. (2004). Linker-gating ring complex as passive spring and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent machine for a voltage- and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channel. *Neuron* 42:745-756.

Oberst, C., Weiskirchen, R., Hartl, M., y Bister, K. (1997). Suppression in transformed avian fibroblasts of a gene (CO6) encoding a membrane protein related to mammalian potassium channel regulatory subunits. *Oncogene* 14:1109-1116.

Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., y Latorre, R. (2002). New Disguises for an Old Channel: MaxiK Channel  $\beta$ -Subunits. *News Physiol Sci*. 17:156-161.

Orshal, J. M. y Khalil, R. A. (2004). Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 286:R233-R249.

Pallotta, B. S. (1985). N-bromoacetamide removes a calcium-dependent component of channel opening from calcium-activated potassium channels in rat skeletal muscle. *J.Gen.Physiol* 86:601-611.

Pallotta, B. S., Magleby, K. L., y Barrett, J. N. (1981). Single channel recordings of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  currents in rat muscle cell culture. *Nature* 293:471-474.

Papazian, D. M., Shao, X. M., Seoh, S. A., Mock, A. F., Huang, Y., y Wainstock, D. H. (1995). Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker  $\text{K}^+$  channel. *Neuron* 14:1293-1301.

Pérez, G. J. (2003). Effect of Tamoxifen (Tmx) on single  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels from transgenic mouse arterial myocytes. *Biophys.J.* 84(2 Pt.2): 542a-543a

Pérez, G. J. (2004). Effect of Tamoxifen (Tmx) on arterial  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels is dependent on intracellular calcium. *Biophys.J.* 85(2 Pt.2)

Pham, T. V. y Rosen, M. R. (2002). Sex, hormones, and repolarization. *Cardiovasc.Res.* 53:740-751.

Pluger, S., Faulhaber, J., Furstenau, M., Lohn, M., Waldschutz, R., Gollasch, M., Haller, H., Luft, F. C., Ehmke, H., y Pongs, O. (2000). Mice with disrupted BK channel  $\beta 1$  sub-unit gene feature abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ.Res.* 87:E53-E60.

Riazi, M. A., Brinkman-Mills, P., Johnson, A., Naylor, S. L., Minoshima, S., Shimizu, N., Baldini, A., y McDermid, H. E. (1999). Identification of a putative regulatory sub-unit of a calcium-activated potassium channel in the dup(3q) syndrome region and a related sequence on 22q11.2. *Genomics* 62:90-94.

Rojas, E. y Keynes, R. D. (1975). On the relation between displacement currents and activation of the sodium conductance in the squid giant axon. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 270:459-482.

Rosenfeld, C. R., White, R. E., Roy, T., y Cox, B. E. (2000). Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 279:H319-H328.

Rothberg, B. S. y Magleby, K. L. (1999). Gating kinetics of single large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in high  $\text{Ca}^{2+}$  suggest a two-tiered allosteric gating mechanism. *J.Gen.Physiol* 114:93-124.

Rothberg, B. S. y Magleby, K. L. (2000). Voltage and  $\text{Ca}^{2+}$  activation of single large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels described by a two-tiered allosteric gating mechanism. *J.Gen.Physiol* 116:75-99.

Roux, B. y MacKinnon, R. (1999). The cavity and pore helices in the KcsA  $\text{K}^+$  channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 285:100-102.

Ruehlmann, D. O., Steinert, J. R., Valverde, M. A., Jacob, R., y Mann, G. E. (1998). Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in smooth muscle cells. *FASEB J.* 12:613-619.

Saito, M., Nelson, C., Salkoff, L., y Lingle, C. J. (1997). A cysteine-rich domain defined by a novel exon in a slo variant in rat adrenal chromaffin cells and PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 272:11710-11717.

- Salas, E., López, M. G., Villarroya, M., Sánchez-García, P., De Pascual, R., Dixon, W. R., y García, A. G. (1994). Endothelium-independent relaxation by 17- $\alpha$ -estradiol of pig coronary arteries. *Eur.J.Pharmacol.* 258:47-55.
- Schopperle, W. M., Holmqvist, M. H., Zhou, Y., Wang, J., Wang, Z., Griffith, L. C., Keselman, I., Kusnitz, F., Dagan, D., y Levitan, I. B. (1998). Slob, a novel protein that interacts with the Slowpoke calcium-dependent potassium channel. *Neuron* 20:565-573.
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., y Salkoff, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K<sup>+</sup> channel from mammalian spermatocytes. *J.Biol.Chem.* 273:3509-3516.
- Schreiber, M., Yuan, A., y Salkoff, L. (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat.Neurosci.* 2:416-421.
- Seoh, S. A., Sigg, D., Papazian, D. M., y Bezanilla, F. (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16:1159-1167.
- Shaw, L., Taggart, M. J., y Austin, C. (2000). Mechanisms of 17  $\beta$ -oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. *Br.J.Pharmacol.* 129:555-565.
- Sheldon, J. H. y Argentieri, T. M. (1995). Acute administration of 17  $\beta$ -estradiol inhibits calcium currents in isolated guinea pig detrusor myocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 274:723-729.
- Shi, J. y Cui, J. (2001). Intracellular Mg<sup>2+</sup> Enhances the Function of BK-type Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> Channels. *Journal of General Physiology* 118:589-606.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., y Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95:927-937.
- Sigg, D. y Bezanilla, F. (1997). Total charge movement per channel. The relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity of activation. *J.Gen.Physiol* 109:27-39.
- Smitherman, K. A. y Sontheimer, H. (2001). Inhibition of glial Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents by tamoxifen. *J.Membr.Biol.* 181:125-135.

- Solaro, C. R., Prakriya, M., Ding, J. P., y Lingle, C. J. (1995). Inactivating and noninactivating  $\text{Ca}^{2+}$ - and voltage-dependent  $\text{K}^+$  current in rat adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 15:6110-6123.
- Stefani, E., Ottolia, M., Noceti, F., Olcese, R., Wallner, M., Latorre, R., y Toro, L. (1997). Voltage-controlled gating in a large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$  channel (*hsl*). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:5427-5431.
- Stühmer, W. y Parekh, A. B. (1995). Electrophysiological Recordings from *Xenopus* Oocytes. En *Single Channel Recording*, eds. Sakmann, B. y Neher, E., 2nded. pp. 341-356. Plenum Press, New York London.
- Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus, H. G., y Toro, L. (1997). Molecular constituents of maxi  $\text{KCa}$  channels in human coronary smooth muscle: predominant  $\alpha + \beta$  subunit complexes. *J.Physiol* 502 ( Pt 3):545-557.
- Toro, L., Wallner, M., Meera, P., y Tanaka, Y. (1998). Maxi- $\text{KCa}$ , a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci.* 13:112-117.
- Tristani-Firouzi, M., Chen, J., y Sanguinetti, M. C. (2002). Interactions between S4-S5 linker and S6 transmembrane domain modulate gating of HERG  $\text{K}^+$  channels. *J.Biol.Chem.* 277:18994-19000.
- Tseng-Crank, J., Foster, C. D., Krause, J. D., Mertz, R., Godinot, N., DiChiara, T. J., y Reinhart, P. H. (1994). Cloning, expression, and distribution of functionally distinct  $\text{Ca}^{2+}$ - activated  $\text{K}^+$  channel isoforms from human brain. *Neuron* 13:1315-1330.
- Uebele, V. N., Lagrutta, A., Wade, T., Figueroa, D. J., Liu, Y., McKenna, E., Austin, C. P., Bennett, P. B., y Swanson, R. (2000). Cloning and functional expression of two families of  $\beta$ -subunits of the large conductance calcium-activated  $\text{K}^+$  channel. *J.Biol.Chem.* 275:23211-23218.
- Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M. I., Mann, G. E., Vergara, C., y Latorre, R. (1999). Acute activation of Maxi-K channels (*hSl*) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit. *Science* 285:1929-1931.
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V., y Adelman, J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr.Opin.Neurobiol.* 8:321-329.

- Wallner, M., Meera, P., y Toro, L. (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels: a transmembrane  $\beta$ -subunit homolog. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:4137-4142.
- Wei, A., Jegla, T., y Salkoff, L. (1996). Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* 35:805-829.
- Weiger, T. M., Holmqvist, M. H., Levitan, I. B., Clark, F. T., Sprague, S., Huang, W. J., Ge, P., Wang, C., Lawson, D., Jurman, M. E., Glucksmann, M. A., Silos-Santiago, I., DiStefano, P. S., y Curtis, R. (2000). A novel nervous system  $\beta$  subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. *J.Neurosci.* 20:3563-3570.
- White, R. E., Darkow, D. J., y Lang, J. L. (1995). Estrogen relaxes coronary arteries by opening  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ.Res.* 77:936-942.
- Xia, X., Hirschberg, B., Smolik, S., Forte, M., y Adelman, J. P. (1998). dSLo interacting protein 1, a novel protein that interacts with large-conductance calcium-activated potassium channels. *J.Neurosci.* 18:2360-2369.
- Xia, X. M., Ding, J. P., y Lingle, C. J. (1999). Molecular basis for the inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$ - and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *J.Neurosci.* 19:5255-5264.
- Xia, X. M., Ding, J. P., y Lingle, C. J. (2003). Inactivation of BK channels by the NH2 terminus of the  $\beta 2$  auxiliary subunit: an essential role of a terminal peptide segment of three hydrophobic residues. *J.Gen.Physiol* 121:125-148.
- Xia, X. M., Ding, J. P., Zeng, X. H., Duan, K. L., y Lingle, C. J. (2000). Rectification and rapid activation at low  $\text{Ca}^{2+}$  of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel  $\beta$  subunit. *J.Neurosci.* 20:4890-4903.
- Xia, X. M., Zeng, X., y Lingle, C. J. (2002). Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 418:880-884.
- Xie, J. y McCobb, D. P. (1998). Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science* 280:443-446.

- Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A., y Salkoff, L. (2000). SLO-2, a  $K^+$  channel with an unusual  $Cl^-$  dependence. *Nat.Neurosci.* 3:771-779.
- Zarei, M. M., Zhu, N., Alioua, A., Eghbali, M., Stefani, E., y Toro, L. (2001). A novel MaxiK splice variant exhibits dominant-negative properties for surface expression. *J.Biol.Chem.* 276:16232-16239.
- Zeng, X. H., Ding, J. P., Xia, X. M., y Lingle, C. J. (2001). Gating properties conferred on BK channels by the  $\beta 3b$  auxiliary subunit in the absence of its NH(2)- and COOH termini. *J.Gen.Physiol* 117:607-628.
- Zeng, X. H., Lingle, C. J., y Xia, X. M. (2002). Instantaneous outward current rectification in BK-type channels: the extracellular loop of 2 and 3 auxiliary subunits contributes a gate for permeation. *Biophys.J.* 82:236A.
- Zeng, X. H., Xia, X. M., y Lingle, C. J. (2003). Redox-sensitive extracellular gates formed by auxiliary  $\beta$  subunits of calcium-activated potassium channels. *Nat.Struct.Biol.* 10:448-454.
- Zhang, J. J., Jacob, T. J., Valverde, M. A., Hardy, S. P., Mintenig, G. M., Sepúlveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., Trezise, A. E., y Higgins, C. F. (1994). Tamoxifen blocks chloride channels. A possible mechanism for cataract formation. *J.Clin.Invest* 94:1690-1697.
- Zhang, X., Solaro, C. R., y Lingle, C. J. (2001). Allosteric regulation of BK channel gating by  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  through a nonselective, low affinity divalent cation site. *J.Gen.Physiol* 118:607-636.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., y MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a  $K^+$  channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414:43-48.
- Zhou, Y., Schopperle, W. M., Murrey, H., Jaramillo, A., Dagan, D., Griffith, L. C., y Levitan, I. B. (1999). A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in *Drosophila* presynaptic nerve terminals. *Neuron* 22:809-818.