

UCH - FC
DOC - BMEN,
R638
c. 1

ACOPLAMIENTO FUNCIONAL DE LAS SUBUNIDADES α Y β DEL
CANAL DE POTASIO ACTIVADO POR CALCIO Y VOLTAJE BK

Tesis

Entregada a la

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en

Biología Molecular, Celular y Neurociencia

por

Patricio Alejandro Rojas Montecinos

Director de Tesis: Dr. Ramón Latorre.

Co-Director: 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 ALEJANDRO ROJAS MONTECINOS

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencia, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 del mes de Mayo del año 2005.

Director De Tesis:

Dr. Ramón Latorre

Co-Director de Tesis:

Dr. Osvaldo Alvarez

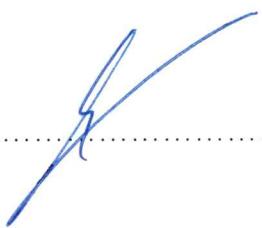
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Cecilia Vergara

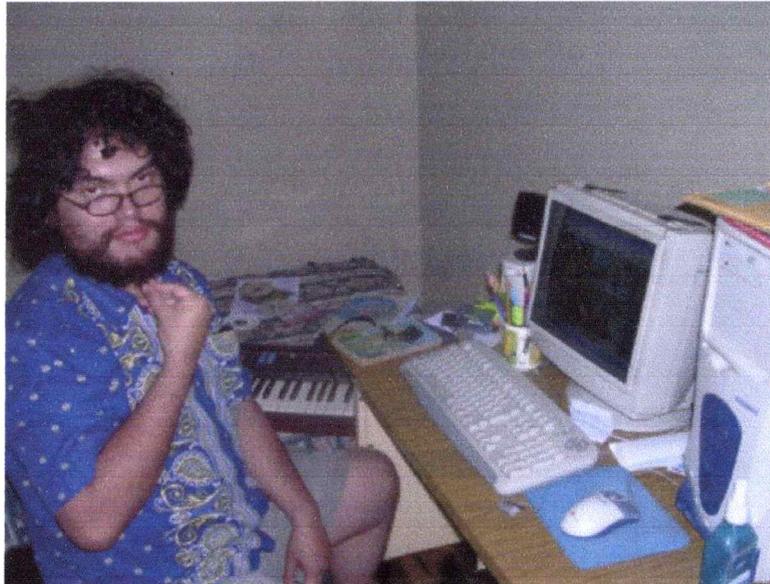
Dra. Cecilia Hidalgo

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Andrés Stutzin

.....

.....
C. Vergara
.....
Cecilia Hidalgo
.....
Octavio Monasterio
.....
Andrés Stutzin
.....

A la memoria de mi madre.



Patricio Alejandro Rojas Montecinos, chileno, nació en Tacna Perú, el 26 de mayo de 1975. A partir de 1992 cursó estudios universitarios en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en Santiago de Chile. En 1996 se graduó como Licenciado en Ciencias, mención Biología. En 1997 trabajó como asistente de investigación junto al Dr. Daniel Wolf, y en 1998 se incorporó al grupo del Dr. Ramón Latorre. En 1999 entró al programa de doctorado de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En 2000 se mudó a Valdivia al Laboratorio de Biofísica, en el Centro de Estudios Científicos (CECS), donde realizó su tesis de doctorado con el Dr. Ramón Latorre.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mis padres que hicieron posible que este sueño se haya hecho realidad. Agradezco también a Natalia y Matías, quienes me dieron fuerza en los momentos de debilidad, alegría en los momentos de tristeza. Así también a Claudia, por todo el cariño y amor que me brindo durante tantos años.

Quiero agradecer de todo corazón a Ramón por su paciencia, su cariño, y sus consejos llenos de experiencia durante todos estos años. Gracias también por “desasarme”, o al menos intentarlo. También agradezco de todo corazón a Osvaldo, que me ayudó con su saber, sus consejos y su apoyo durante todo este tiempo, especialmente durante la culminación de este trabajo.

Agradezco de todo corazón a Isabella y a Pato por darme su apoyo y amistad incondicionales en estos últimos 8 años, tanto en los momentos de alegría como en los de tristeza. Por supuesto agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio (sin orden aparente): Pato, Luisa, Gigi, Maestro Fabián, Yolima, Sebastián, Cristian, Carolina y Charlie, Pancho, Gonzalo, Rodolfo, Laín Felipe, Claudia, Don Julio, Magdalena, Oliver, Javier, Ricardo, Orlando, Gabriel, Pablo F., Claudio, Amarilis, Marcelo, Danny, Diego C.

Agradezco también a todos los miembros del Salkoff's Lab y del Nonet's Lab, especialmente a Larry, Celia y Aguan, quienes me dieron siempre su ayuda y apoyo tanto en lo profesional como en lo humano

Asimismo, agradezco al Centro de Estudios Científicos y todos sus miembros por todo el apoyo que me dieron durante todos estos años

Por último, agradezco a la Facultad de Ciencias, a CONICYT, FONDECYT, y la Iniciativa Científica Milenio a través del Centro de Estudios Científicos por apoyarme económicamente durante la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xix
INTRODUCCIÓN	1
1 <i>Consideraciones generales</i>	1
2 <i>El canal de potasio de alta conductancia activado por calcio y voltaje BK</i>	4
2.1 El gen Slowpoke.....	5
2.2 Activación.....	9
2.3 Modelos cinéticos.....	11
3 <i>Subunidades β</i>	14
3.1 Estructura y localización.....	15
3.2 Modulación de la actividad.....	16
3.3 Efecto de ligandos.....	17
3.4 Efecto de bloqueadores y la vía de conducción.....	18
3.5 Roles fisiológicos.....	18
3.6 Interpretaciones de los modelos cinéticos.....	19
4 <i>Estequiometria α-β</i>	20
5 <i>Estructura del complejo α-β</i>	21
OBJETIVOS	24
1 <i>Objetivo general e hipótesis de trabajo</i>	24
2 <i>Objetivos específicos</i>	25
2.1 Caracterizar biofísicamente el efecto de eliminar las cisteínas de la región extracelular de la subunidad β 1.....	25
2.2 Determinar regiones en la subunidad β 1 relacionadas con los efectos de esta subunidad.....	26
2.3 Determinar dominios funcionales mediante la construcción de quimeras entre subunidades β 1 y β 4.....	26
MÉTODOS	27
1 <i>Biología Molecular</i>	27
1.1 Cepas de Bacterias.....	27
1.2 Cultivo de bacterias.....	27
1.3 Obtención de bacterias competentes.....	28
1.4 Transformación de células competentes.....	28
1.5 Antibióticos.....	29
1.6 Obtención y purificación de DNA plasmidial.....	29
1.7 Geles de agarosa.....	29
1.8 Purificación de ácidos nucleicos.....	30
1.9 Clones.....	31

1.10	Mutantes de delección de la subunidad $\beta 1$	32
1.11	Transcripción in vitro.....	32
1.12	Secuenciación.....	33
2	<i>Expresión heteróloga</i>	34
2.1	Oocitos de rana.....	34
2.1.1	Ranas.....	34
2.1.2	Oocitos	34
2.1.3	Microinyección	35
2.2	Células HEK293	36
2.2.1	Cultivo celular.....	36
2.2.2	Transfección.....	37
3	<i>Registros Electrofisiológicos</i>	38
3.1	Micropipetas.....	38
3.2	Puentes.	38
3.3	Soluciones de registro	39
3.4	Sistema de Registro de las corrientes macroscópicas	39
4	<i>Adquisición y análisis</i>	41
4.1	Curvas de activación	41
4.2	Ajuste a un modelo de activación alostérica.....	43
4.2.1	Ajuste de curvas G-V	43
4.2.2	Ajuste de curvas $V_{0.5}$ - Ca^{2+}	44
4.3	Cinéticas de activación.....	46
4.4	Cinéticas de desactivación.	46
4.5	Conducción de canal abierto.	47
4.6	Inactivación.....	48
5	<i>Análisis Estadístico</i>	49
	RESULTADOS	50
1	<i>Mutantes puntuales en el lazo de $\beta 1$</i>	50
1.1	Activación por calcio y potencial.....	51
1.2	Cinéticas de activación.....	64
1.3	Cinéticas de desactivación.	66
1.4	Conducción.	68
2	<i>Mutante $\beta 1$ CysLess</i>	69
2.1	Cinética de activación	70
2.2	Cinética de desactivación.....	71
2.3	Conducción	73
3	<i>Efecto de DTT sobre la actividad de BK</i>	74
4	<i>Delecciones parciales de $\beta 1$</i>	75
5	<i>El mutante $\beta 1 \Delta Loop$</i>	77
5.1	Activación del canal formado por $\alpha + \beta 1 \Delta Loop$	79
5.2	Inactivación de $\alpha + \beta 1 \Delta Loop$	83
5.3	Conducción	88
5.4	Localización del dominio de inactivación.....	89
6	<i>Regiones de las subunidades β que modulan a la subunidad α</i>	93

DISCUSIÓN	100
<i>1 Diseción molecular de la función de la subunidad reguladora $\beta 1$</i>	100
1.1 Papel de las cisteínas extracelulares de $\beta 1$	100
1.2 Papel de la región extracelular de $\beta 1$	102
1.3 Rol de los segmentos de transmembrana y los extremos N y C terminales....	102
<i>2 Conducción y la región extracelular de las subunidades β</i>	104
<i>3 Eliminación de la región extracelular: $\beta 1 \Delta Loop$</i>	107
3.1 Fenotipo $\alpha + \beta 1 \Delta Loop$	107
3.2 La partícula de inactivación de $\beta 1 \Delta Loop$	109
<i>4 Lecciones acerca del funcionamiento de BK</i>	113
APENDICE 1	115
REFERENCIAS	120

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DEPENDENCIA DE CALCIO Y DE VOLTAJE DEL CANAL BK.....	5
FIGURA 2. TOPOLOGÍAS PROPUESTAS PARA LAS SUBUNIDADES α Y β DEL CANAL BK.....	6
FIGURA 3. ACTIVACIÓN DE BK POR CALCIO Y POTENCIAL.....	10
FIGURA 4. MODELOS ALOSTÉRICOS DE 50 Y 70 ESTADOS.....	12
FIGURA 5. SUBUNIDADES β	14
FIGURA 6. EFECTOS DE $\beta 1$ SOBRE LA ACTIVIDAD DE BK.....	16
FIGURA 7. CORRIENTES MACROSCÓPICAS DE $\alpha + \beta 1$, Y DETERMINACIÓN DE Z Y $V_{0.5}$	53
FIGURA 8. AJUSTE DE LAS CURVAS G-V AL MODELO ALOSTÉRICO DE 70 ESTADOS.....	56
FIGURA 9. SENSIBILIDAD A CALCIO CONFERIDA POR LAS MUTANTES PUNTUALES DE CISTEÍNA.....	60
FIGURA 10. AJUSTE DE CURVAS G-V DE CANALES QUE EXPRESAN LAS MUTANTES PUNTUALES DE CISTEÍNAS.....	61
FIGURA 11. CINÉTICAS DE ACTIVACIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CALCIO DE CANALES FORMADOS POR LAS MUTANTES DE CISTEÍNA.....	65
FIGURA 12. CINÉTICAS DE DESACTIVACIÓN A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CALCIO DE CANALES FORMADOS POR LAS MUTANTES DE CISTEÍNA.....	67
FIGURA 13. MUTANTES DE CISTEÍNA NO ALTERAN LA CONDUCCIÓN.....	68
FIGURA 14. DEPENDENCIA DE CALCIO Y DE VOLTAJE DE LA MUTANTE $\beta 1$ CYSLESS.....	70
FIGURA 15. CINÉTICAS DE ACTIVACIÓN Y DESACTIVACIÓN DE $\alpha + \beta 1$ CYSLESS.....	72
FIGURA 16. EL MUTANTE $\beta 1$ CYSLESS NO CONFIERE RECTIFICACIÓN DE CANAL ABIERTO.	73
FIGURA 17. EFECTO DE DTT SOBRE LAS CORRIENTES DE $\alpha + \beta 1$ CYSLESS.....	74
FIGURA 18. MUTANTES DE DELECCIÓN DE LA REGIÓN EXTRACELULAR DE LA SUBUNIDAD $\beta 1$	76
FIGURA 19. EL MUTANTE $\beta 1$ LOOP PRODUCE INACTIVACIÓN.....	77

FIGURA 20. ACTIVACIÓN DE $\alpha+\beta 1\Delta$ LOOP	78
FIGURA 21. LA INACTIVACIÓN NO AFECTA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LAS CURVAS G-V	82
FIGURA 22. DEPENDENCIA DE POTENCIAL DE LA DESACTIVACIÓN DE $\alpha+\beta 1\Delta$ LOOP	83
FIGURA 23. PARÁMETROS DE INACTIVACIÓN DE $\alpha+\beta 1\Delta$ LOOP.	85
FIGURA 24. DEPENDENCIA DE POTENCIAL DE LA RECUPERACIÓN DE LA INACTIVACIÓN PARA $\alpha+\beta 1\Delta$ LOOP	87
FIGURA 25. CONDUCCIÓN DE $\alpha+\beta 1\Delta$ LOOP.....	88
FIGURA 26. REMOCIÓN DE LA INACTIVACIÓN POR DIGESTIÓN CON TRIPSINA	91
FIGURA 27. REMOCIÓN DE LA INACTIVACIÓN NO ALTERA LAS CINÉTICAS DE APERTURA Y CIERRE DE $\alpha+\beta 1\Delta$ LOOP	92
FIGURA 28. EFECTO DE LA REMOCIÓN DE LA REGIÓN DE INACTIVACIÓN SOBRE LA CONDUCTANCIA.	93
FIGURA 29. LA SUBUNIDAD $\beta 4$ AFECTA LA SENSIBILIDAD POR CALCIO Y LA CINÉTICA DE DESACTIVACIÓN.	94
FIGURA 30. AJUSTE DE CURVAS G-V DE $\alpha+\beta 4$ Y $\alpha+\beta 1\Delta\beta 4$ AL MODELO ALOSTÉRICO.....	96
FIGURA 31. LA QUIMERA $\beta 1\Delta\beta 4$ CONFIERE SENSIBILIDAD A CALCIO SIMILAR A $\beta 4$	99
FIGURA 32. RESUMEN DEL EFECTO DE LAS SUBUNIDADES MUTANTES DE $\beta 1$	106
FIGURA 33. EXTREMOS N-TERMINALES DE DIFERENTES SUBUNIDADES DE CANALES DE POTASIO QUE SUFREN INACTIVACIÓN.	110
FIGURA 34. DISTINTAS CONFIGURACIONES DE $\beta 1\Delta$ LOOP EN LA MEMBRANA.....	112
FIGURA 35. ANÁLISIS DE AMFIPATICIDAD DE TM1 Y TM2	113
FIGURA 36. ESQUEMA DE UN “VOLAGE-CLAMP” IDEAL.	115
FIGURA 37. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DE UN AMPLIFICADOR DE “PATCH-CLAMP”	116
FIGURA 38. CIRCUITO DE COMPENSACIÓN DE CORRIENTES CAPACITIVAS.....	118

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. PARÁMETROS DEL AJUSTE A MODELO ALOSTÉRICO DE 50 ESTADOS PARA LAS MUTANTES PUNTUALES	63
TABLA2. PARÁMETROS DEL AJUSTE AL MODELO ALOSTÉRICO PARA β_4 Y $\beta_{1L}\beta_4$	98

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Amperes, unidad de intensidad de corriente
BK	Canal de potasio de alta conductancia activado por calcio y voltaje
Ca ²⁺	Ion Calcio
CTX	Charibdotoxina
DNA	Ácido desoxi ribonucleico (“deoxiribonucleic acid”)
e	Carga elemental ($1,6022 \times 10^{-19}$ C)
EGTA	ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético
F	Constante de Faraday (96500 Coulomb/mol)
G	Conductancia (Siemens)
HEDTA	ácido N-(2-hidroxietyl)etilendiamino-N,N',N'-triacético
HEPES	ácido N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-2-etanosulfónico
I	Intensidad de corriente eléctrica (Amperes)
IbTX	Iberiotoxina
k	Constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23}$ J/K)
KCNMA	Canal de potasio subfamilia M subunidad alfa (“Potassium channel subfamily M alpha subunit”)
KCNMB	Canal de potasio subfamilia M subunidad beta (“Potassium channel subfamily M beta subunit”)
M	Molar, unidad de concentración
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase chain reaction”)

psi	libra por centímetro cuadrado (“pound per square inch”) unidad de presión.
R	Constante universal de los gases (8.135 Joule/mol*K)
RCK	Región reguladora de la conductancia del canal de potasio (“Regulatory Conductance of K channel”).
RNA	Ácido ribonucleico (“ribonucleic acid”)
RNAm	RNA mensajero
s	Segundos, unidad de tiempo
S	Siemens, unidad de conductancia, Ohm ⁻¹
T	Temperatura absoluta, Kelvin
TEA	Tetraetilamonio
V	Potencial eléctrico, en Volts

RESUMEN

El canal de potasio de alta conductancia activado por calcio y potencial (BK) es un canal de iones presente en las membranas de casi todas las células de mamífero. Su actividad es favorecida tanto por aumento del calcio intracelular como por depolarización de la membrana plasmática. En neuronas este canal se encuentra involucrado en determinar la forma y frecuencia de los potenciales de acción, en músculo liso con la mantención del tono, en linfocitos con la respuesta inmune rápida, por nombrar unos cuantos ejemplos. A nivel molecular el canal se encuentra formado por cuatro subunidades conductoras (subunidades α) que forman canales funcionales. En algunos tejidos éstas se encuentran asociadas a proteínas accesorias (subunidades β) las cuales tienen dos segmentos de transmembrana y una región extracelular de ~120 residuos de aminoácidos. En mamíferos se ha identificado cuatro genes que codifican estas proteínas ($\beta 1$ - $\beta 4$), cuyos efectos sobre la actividad del canal han sido caracterizados tanto en células nativas como en sistemas de expresión heterólogos. Las subunidades β modifican tanto las sensibilidades a calcio como a potencial, modifican las cinéticas de apertura y cierre, y alteran la afinidad del canal por ligandos y bloqueadores.

El objetivo de esta tesis fue determinar regiones de la subunidad $\beta 1$ involucradas en conferir los efectos moduladores de ésta sobre el canal BK. Para cumplir este objetivo se utilizó sistemas de expresión heteróloga en los cuales se estudió las corrientes iónicas causadas por la co-expresión de diversas subunidades $\beta 1$ mutantes junto a la subunidad α .

Previamente se reportó que el reemplazo en la región extracelular de cada una o de todas las cuatro cisteínas por alaninas en la subunidad $\beta 1$ alteran su estructura, reduciendo la afinidad por CTX y produciendo la pérdida de al menos un puente disulfuro (Hanner y col., 1998). En este trabajo se encontró que la eliminación de todas las cisteínas o la reducción de los puentes disulfuro por un agente reductor no alteraron las propiedades moduladoras de $\beta 1$. Mutaciones individuales de cisteínas por alaninas alteran la sensibilidad a calcio, sin alterar las cinéticas ni conducción iónica del canal BK. Estos resultados pueden interpretarse pensando que la eliminación de una sola cisteína (y del puente disulfuro que ella forma) altera el plegamiento y la función moduladora. Pero la eliminación de todas las cisteínas permite el plegamiento correcto de al menos la región relacionada con la función moduladora rescatando el efecto de la subunidad $\beta 1$ sobre la actividad del canal.

Se encontró que mutaciones de delección de cada uno de los segmentos de transmembrana y de distintas longitudes de la región extracelular no se expresaron funcionalmente. Sólo un mutante carente de casi la totalidad de la región extracelular produjo una subunidad que se expresó funcionalmente produciendo inactivación, lo cual sería consistente con una inserción en la membrana diferente a la subunidad *wt*. Los

resultados obtenidos con la quimera $\beta 1L\beta 4$ (región extracelular de $\beta 4$ y el resto de $\beta 1$) muestran que esta se parece a $\beta 1$ en su sensibilidad a calcio y en su cinética de desactivación. Esto sugiere que los segmentos de transmembrana así como los extremos N y C están involucrados en la modulación de la sensibilidad por calcio.

Todos estos resultados en su conjunto pueden interpretarse pensando que los segmentos de transmembrana y los extremos N y C aportan en la función moduladora. La región extracelular cumple una función estructural, permitiendo que otras regiones (como los segmentos de transmembrana o los extremos intracelulares) se encuentren en una posición adecuada para causar el efecto modulador que esta subunidad confiere al canal.

ABSTRACT

The high conductance calcium-activated potassium channel (BK) is an ion channel present in almost all kind of mammal tissues. This channel is gated by increases of the intracellular calcium and by plasma membrane depolarization. In neurons this channel is involved with the shape and frequency of action potentials, in smooth muscle with the maintenance of the vascular tone, in lymphocytes with the fast immune response, to name a few examples. At molecular level the channel is formed by four conductive subunits (α subunits). The tetramers form functional channels. In some tissues, these are associated to accessory proteins (β subunits), which have two transmembrane segments separated by an extracellular region of 120 amino acids residues. In mammals four genes ($\beta 1$ - $\beta 4$) that codify for these proteins have been found, whose effects on the channel activity have been characterized in native and heterologous expression systems. The effects of β subunits is to modify the sensitivities to calcium and voltage, modify the kinetics of opening and closing, or alter the affinity of the channel by different types of ligands.

The main aim of this thesis was to determine the role of regions of the $\beta 1$ subunit in conferring the modulatory effects over the α subunit of BK channel. In order to accomplish this objective I used heterologous expression systems in which it is possible

to study the ionic currents caused by the co-expression of α and several $\beta 1$ subunits mutants.

It has been previously reported that the replacement of each one or all four cysteines of the extracellular region by alanines diminish the CTX affinity and produces the loss of at least one disulfide bridge (Hanner y col., 1998). In this work, it was found that these mutations individually alter sensibility to calcium, altering neither the gating kinetics nor the ionic conduction of the channel. The elimination of all four cysteines or the reduction of the disulfide bridges by a reducing agent did not alter the modulatory properties of $\beta 1$ subunit. Point mutants lacking each of the four cysteine residues alter calcium sensibility, altering neither the gating kinetics nor ion conduction of the channel. These results can be interpreted thinking that the elimination of a single cysteine (and the disulfide bridge that it forms) alters the folding and the modulatory function. But the elimination of all cysteines (and the bridges that forms) allows the proper folding of at least the region related to the modulatory function, rescuing the effect of the $\beta 1$ subunit on the activity of the channel.

Also it was found that deletions of each one of the $\beta 1$ transmembrane segments and different lengths deletions of the extracellular region produce channels with the characteristics of those formed by the α subunit alone. Only one mutant lacking almost all the extracellular region produced a subunit able to modify the BK channel phenotype, conferring inactivation which is consistent with a different insertion than *wt* subunit. The results obtained with the chimera $\beta 1L\beta 4$ show a similarity to $\beta 1$ subunit in its calcium sensitivity and deactivation kinetics. These findings imply that transmembrane segments

as well as N and C ends are involved in the modulation of the channel calcium sensitivity.

All these results in their assembly can be interpreted thinking that the extracellular region and transmembrane segments with their respective N and C ends contributes in the modulatory function. But besides the extracellular region complies a structural function. Permitting that other regions (as the segments of transmembrana or the intracellular ends) be found in an adequate position to cause the modulatory effect that this subunidad confers to the channel.

INTRODUCCIÓN

1 Consideraciones generales

Los canales de iones son proteínas de membrana que poseen un poro acuoso en su interior por el cual se transportan iones desde un lado hacia el otro de la membrana celular. Este flujo de iones es pasivo, por lo que se produce en la dirección del gradiente electroquímico de éstos (Latorre y Alvarez, 1996; Hille B, 2001). Estas proteínas se encuentran en todas las membranas celulares, permitiendo, entre otros procesos, fenómenos tales como la transmisión de señales eléctricas, la regulación de volumen celular, y la transducción de señales (Latorre y col., 1996; Hille B, 2001). A nivel microscópico, se ha visto que fluctúan básicamente entre dos estados: uno conductor (abierto) y uno no conductor (cerrado). Distintos tipos de estímulos cambian la probabilidad de encontrar el canal en uno u otro estado. Estos estímulos pueden ser por ejemplo el cambio del potencial de membrana, la unión de un ligando o un cambio de la tensión de la membrana (Hille B, 2001). Estas proteínas pueden clasificarse por el tipo de ion que transportan, el tipo de estímulo que provoca su apertura, y su farmacología, entre otras características.

Los canales de iones cuya actividad es dependiente de la diferencia de potencial eléctrico establecido a través de la membrana, también llamados dependientes de voltaje,

son los responsables de las respuestas eléctricas que se producen en neuronas y células eléctricamente excitables. Poseen una estructura denominada “sensor de potencial”, que les permite detectar cambios en el potencial eléctrico e inducir de esta forma la apertura del canal (Hille B, 2001). Dentro de este grupo, se encuentran los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv). Ellos están involucrados en procesos tales como la repolarización del potencial de acción, eliminación de la propagación retrógrada y la duración del periodo refractario, entre otros (Johnson y Wu, 1995; Hille B, 2001). Su apertura permite la salida de potasio de la célula lo que genera una hiperpolarización de la membrana plasmática. Estos canales se encuentran como tetrámeros en la membrana (MacKinnon, 1991; Hurst y col., 1992; Liman y col., 1992), en donde cada monómero posee seis segmentos de transmembrana (S1-S6), más una región hidrófoba que forma parte del poro de conducción (Begenisich, 1994; Stuhmer y Latorre, 1996). En el segmento S4 se encuentran aminoácidos cargados positivamente, y en el segmento S2 se encuentra cargas negativas que en su conjunto forman parte del “sensor” de potencial (Jan y Jan, 1997; Hille B, 2001). El movimiento de estas cargas en el campo eléctrico genera las llamadas corrientes de compuerta (“gating currents”), que son consecuencia de movimientos del sensor de potencial que anteceden a la apertura del canal. Estas corrientes fueron predichas por (Hodgkin y Huxley, 1952a) y registradas posteriormente por varios grupos (Armstrong y Bezanilla, 1973; Keynes y Rojas, 1973; Schneider y Chandler, 1973).

Una característica importante de los canales de potasio es su alta selectividad por este ion sobre otros cationes monovalentes como sodio, litio, cesio (Hille B, 2001). Esta propiedad está dada por una región denominada filtro de selectividad, que corresponde a

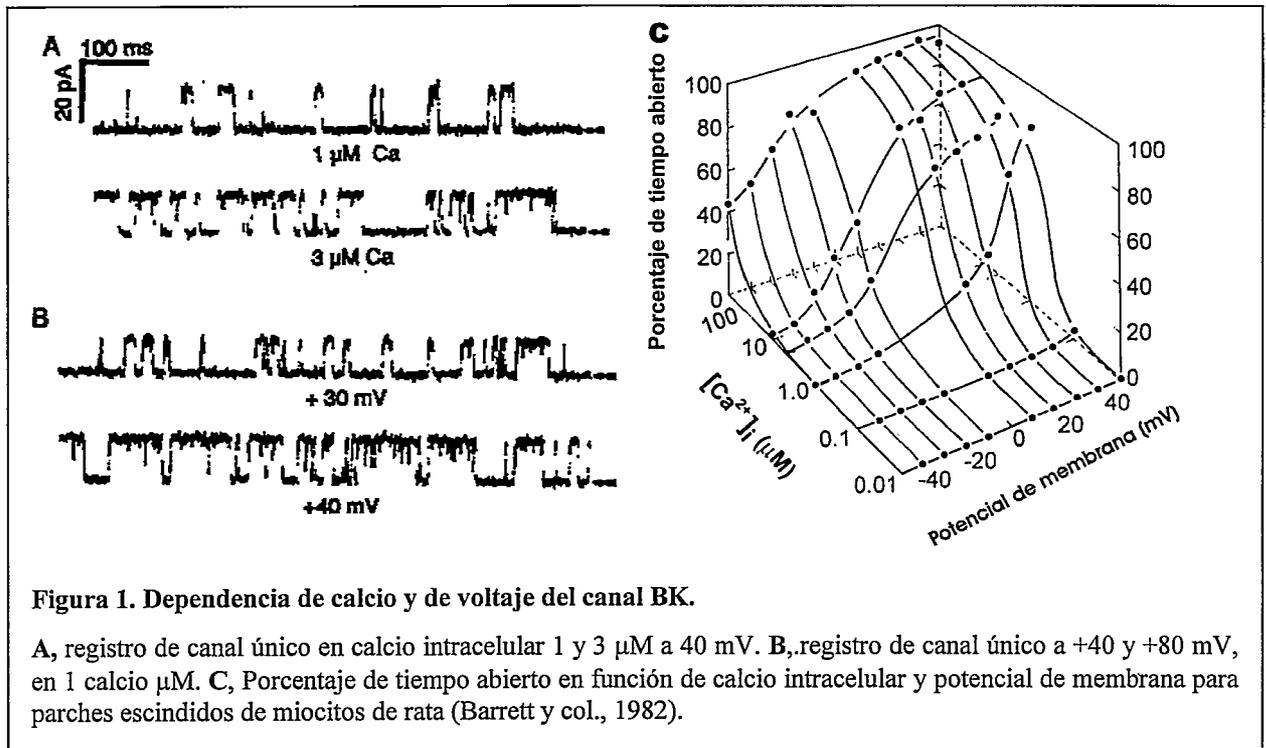
la secuencia característica de residuos de aminoácidos VGYGD, situada entre los segmentos S5 y S6, (Doyle y col., 1998; Yellen, 1999; Zhou y col., 2001b; Morais-Cabral y col., 2001; revisado por Hille B, 2001; Yellen, 2002).

Además de las subunidades conductoras, los canales de iones tienen subunidades reguladoras. Para los canales de potasio existen varios tipos de subunidades reguladoras, ya sea citosólicas, extracelulares o de membrana. Los efectos sobre la actividad son diversos, como aumentar su densidad en la membrana celular, modificar la sensibilidad por efectores o alterar la vía de conducción (Dolphin, 2003; Campbell y col., 2003; Pourrier y col., 2003; Arikath y Campbell, 2003; Orio y col., 2002; Melman y col., 2002; Abbott y Goldstein, 2001; Tinel y col., 2000; Qu y col., 2004; Lewis y col., 2004; McCrossan y col., 2003; Abbott y Goldstein, 1998; Hanlon y Wallace, 2002).

Esta tesis fue realizada con el propósito de **esclarecer las interacciones funcionales entre las subunidades conductoras y reguladoras que forman el canal de potasio de alta conductancia activado por calcio BK** (“Big” de grande, y K de potasio). Como se verá en las secciones siguientes, este canal participa en varios mecanismos relacionados con la excitabilidad celular. Entender la interacción entre las proteínas que forman el canal es importante tanto para explicar fenómenos eléctricos en algunos tipos celulares, como para entender el funcionamiento de los canales de iones como proteínas.

2 El canal de potasio de alta conductancia activado por calcio y voltaje BK

El canal de potasio activado por calcio y potencial MaxiK o BK, denominado así por su alta conductancia unitaria, pertenece a la familia de canales de potasio dependientes de voltaje Kv (Pallotta y col., 1981; Latorre y col., 1982; Adelman y col., 1992; Butler y col., 1993; Coetzee W y col., 1999; Gutman y col., 2003). Su conductancia es de ~ 300 pS en KCl 150 mM simétrico, permitiendo el paso de unos 10^8 iones/s por canal, un valor mayor al reportado para otros canales de potasio (por ejemplo el canal de potasio Shaker tiene una conductancia de 25 pS en las mismas condiciones). Este canal fue descrito por primera vez en músculo esquelético de rata (Pallotta y col., 1981; Latorre y col., 1982). La activación del canal ocurre tanto por aumentos del calcio intracelular como por aumentos del potencial eléctrico de membrana, lo que en registros de canales unitarios se manifiesta como un aumento de la probabilidad de encontrar el canal abierto (P_o , Figura 1). A pesar de su alta conductancia unitaria, el canal es aproximadamente 1000 veces más selectivo a potasio que a sodio, el otro catión monovalente de mayor abundancia fisiológica. Hasta el momento se desconoce la causa de su alta conductancia, pero se ha demostrado que un anillo de 8 cargas negativas en el vestíbulo intracelular del canal tiene una participación importante en la alta conductancia. Estas cargas producen un aumento de la concentración local de iones potasio en la boca intracelular del canal (Brelidze y col., 2003; Nimigeen y col., 2003).



2.1 El gen *Slowpoke*

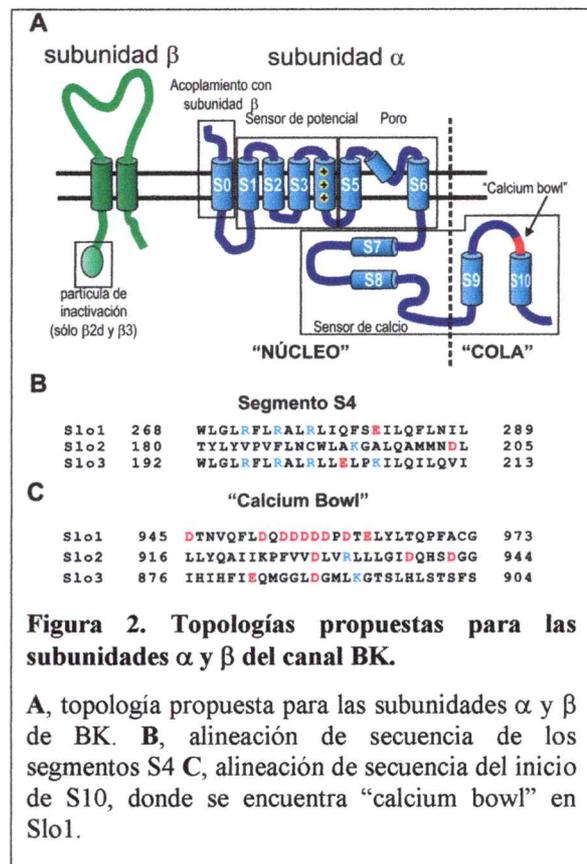
El canal BK se clonó a partir del mutante de *Drosophila melanogaster* llamado *Slowpoke*, en el cual las corrientes de potasio activadas por calcio están ausentes (Elkins y col., 1986). El gen responsable de esta mutación, al cual se llamó *slowpoke* (luego llamado *Slo1*), codifica una proteína con varios segmentos hidrófobos (Atkinson y col., 1991; Adelman y col., 1992). En mamíferos este gen se denominó *kcnma1* (K⁺ channel subfamily M, alpha member 1) (Butler y col., 1993; Gutman y col., 2003; Coetzee W y col., 1999), contiene varios sitios de procesamiento alternativo de intrones habiéndose reportado al menos nueve variantes que difieren tanto en sus cinéticas como en sus sensibilidades a calcio (Adelman y col., 1992; Butler y col., 1993; Lagrutta y col., 1994; Tseng-Crank y col., 1994; McCobb y col., 1995; Saito y col., 1997; Rosenblatt y col.,

1997; Jones y col., 1998; Jones y col., 1999; Li y col., 1999; Zarei y col., 2001; Liu y col., 2002; Langer y col., 2003).

El análisis de secuencia del gen *Slo1*, el que codifica el canal BK, predice la existencia de once segmentos hidrófobos, llamados S0 a S10. Esta denominación tiene su origen en la homología con los canales Kv, en donde los segmentos de transmembrana se denominan S1-S6 (Coetzee W y col., 1999). La existencia del primer segmento de transmembrana (S0) pasó inadvertida por algún tiempo, hasta que experimentos de localización subcelular mostraron su existencia, lo cual implica que el extremo N-terminal se encuentre en el medio extracelular (Figura 2A) (Wallner y col., 1996; Meera y col., 1997). Como en los canales Kv, los segmentos S2 y S4 se encuentran involucrados en la detección de

cambios de potencial de membrana (Figura 2B) (Diaz y col., 1998). Asimismo, los segmentos S5, P y S6 forman parte de la vía de conducción, como ocurre con los demás canales de potasio (Hille B, 2001).

Al comparar las secuencias de *Slo1* de varias especies se distingue dos regiones de alta similitud separadas por una región muy poco conservada. La primera de estas regiones comprende a los segmentos hidrófobos (S0-S8), y se la llamó parte



central o núcleo (“core”, Figura 2A). Mientras que la segunda región que comprende desde S9 hasta el extremo carboxilo se le denominó cola (“tail” Figura 2A) (Wei y col., 1994). Dentro de la región cola, al inicio del segmento S10, se encuentra una secuencia rica en cargas negativas (DQDDDDDPD) que se pensó que era la región responsable de la unión de calcio (“calcium bowl”, Figura 2C) (Schreiber y Salkoff, 1997). Mutaciones de uno o varios residuos cargados en esta región elimina parcialmente la sensibilidad a calcio (Schreiber y Salkoff, 1997; Bian y col., 2001). Los otros sitios responsables de la sensibilidad a calcio se localizan en la región comprendida entre el final de S6 y el extremo C-terminal, lo que fue determinando mediante mutaciones puntuales y quimeras entre Slo1 y Slo3, como se verá más adelante (Schreiber y col., 1999; Moss y Magleby, 2001; Xia y col., 2004).

Macro-parches de membrana que sólo expresan la región del núcleo de BK producen canales no funcionales, los que al introducirse en oocitos que expresan sólo la región cola, producen canales funcionales (Meera y col., 1997). Este resultado muestra que estas dos regiones del canal actúan como dominios independientes

La región C-terminal, que incluye los segmentos hidrófobos S7-S10, corresponde aproximadamente a dos tercios de la secuencia primaria de la proteína (Wallner y col., 1996; Meera y col., 1997). Aquí se encuentran sitios de fosforilación y unión para las quinasas PKA, PKC y Src, además de sitios de unión a otras proteínas como Slip1, Slob y PSD-95 (proteína de andamio), 14-3-3 ζ , (proteína de andamio), entre otras (Schopperle y col., 1998; Wang y col., 1999; Wang y col., 1999; Zhou y col., 1999;

Zhou y col., 2002; Orio y col., 2002; Zhou y col., 2003b; Zhou y col., 2003a; Jaramillo y col., 2004).

Una región intracelular cercana al poro, ubicada al término de S6, y con alrededor de 160 residuos de aminoácidos, es responsable de la tetramerización del canal (Quirk y Reinhart, 2001). Esta región tiene similitud estructural con las regiones reguladoras de otros canales de potasio, por lo que se le denominó RCK (“Regulatory Conductance of K⁺ channel”). A partir de la estructura cristalina del canal de bacteria MthK, se ha propuesto que BK tiene dos de estas regiones contiguas, denominadas RCK1 y RCK2 (Jiang y col., 2002a; Jiang y col., 2002b) que forman un “anillo de activación”. La unión de calcio a los dominios RCK expandiría el diámetro de este anillo, lo que mueve la compuerta de activación, abriendo el canal.

Hasta el momento se ha identificado tres genes miembros de la familia Slo: *Slo1* (BK), *Slo2*, *Slo3*. El gen *Slo2* codifica canales de potasio activados por voltaje sensibles a cloruro y sodio en mamíferos (K_{Na}), o cloruro y calcio en nemátodos (nSlo2) (Lim y col., 1999; Yuan y col., 2000; Bhattacharjee y col., 2003). Los canales Slo2 de nematodo, que son activados por calcio, carecen de la región “calcium bowl” (Figura 2C), lo que implica la presencia de otras regiones que ligan calcio. El gen *Slo3* codifica un canal de potasio activado por voltaje, modulado por pH extracelular, e insensible al calcio intracelular (Schreiber y col., 1998). El canal Slo3 también carece de la región “calcium bowl” (Figura 2C).

2.2 Activación

Ya que BK es un canal dependiente de voltaje, las curvas de activación (P_o en función del voltaje) pueden ser descritas con una función de Boltzmann de la forma

$$P_o = P_o^{\max} / (1 + \exp(-zF(V - V_{0.5})/RT)) \quad \text{Ecuación 1}$$

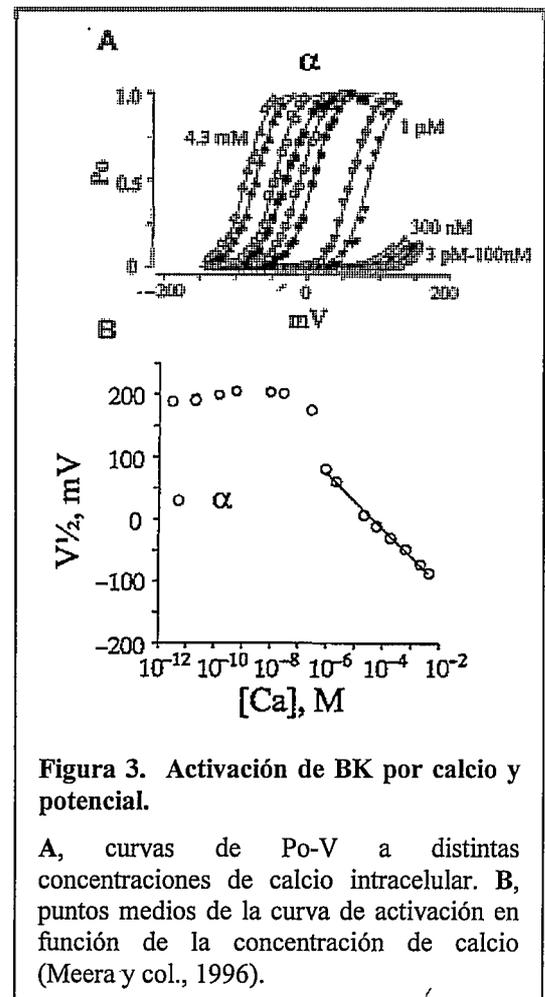
en donde P_o^{\max} es la P_o máxima, z es una medida de la sensibilidad al efecto del potencial, $V_{0.5}$ es el voltaje al cual se alcanza la mitad de la probabilidad máxima de encontrar el canal abierto ($P_o=0,5$), F es la constante de Faraday, R es la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta. Ajustando las curvas de activación a distintas concentraciones de calcio con la ecuación 1, se observa que el efecto de este ion es desplazar los valores de $V_{0.5}$ hacia voltajes más negativos (Figura 3A). Esto significa que al aumentar la concentración de calcio, se necesita menos voltaje para activar los canales. Una forma común de representar el efecto de calcio, consiste en graficar el $V_{0.5}$ en función de la concentración de calcio (Figura 3B). A concentraciones mayores a 300 nM de calcio, el $V_{0.5}$ sigue un comportamiento logarítmico con respecto a la concentración de calcio (Figura 3A-B) (Stefani y col., 1997; Cox y col., 1997a; Meera y col., 1996). A concentraciones bajo 300 nM el $V_{0.5}$ se hace independiente de la concentración de calcio, pero el canal se puede activar completamente con potenciales muy positivos, alcanzando su máxima probabilidad de apertura (Cui y col., 1997).

El canal BK presenta varios residuos de aminoácidos cargados en el segmento S4, de manera similar a los canales Kv. La neutralización de estas cargas positivas reduce la sensibilidad al voltaje del proceso de apertura, indicando que S4 forma parte del sensor de potencial (Diaz y col., 1998). Asimismo, se ha reportado la presencia de

corrientes de desplazamiento asociadas con la apertura del canal en ausencia de calcio (calcio $<50\text{nM}$) lo cual apoya la idea de una dependencia de potencial intrínseca (Stefani y col., 1997; Horrigan y col., 1999). En ausencia de calcio las corrientes de desplazamiento muestran un componente rápido ($<100\mu\text{s}$) y uno lento (del orden de ms) que se correlaciona con la aparición de las corrientes iónicas (Horrigan y Aldrich, 1999; Horrigan y Aldrich, 2002). Esto implica que existe un movimiento de cargas entre estados abiertos.

Como puede verse en la Figura 3 el canal BK responde al calcio en un intervalo de concentración de cuatro órdenes de magnitud, lo cual es un intervalo muy grande para tratarse de un solo sitio de unión.

Mediante el análisis de mutantes puntuales se ha postulado la existencia de por lo menos tres sitios de alta afinidad, que responden a concentraciones de calcio menores que $100\mu\text{M}$. Uno de ellos se encuentra localizado en el comienzo del segmento S10, el “calcium bowl” (Schreiber y Salkoff, 1997). Otro sitio de alta afinidad está localizado en las posiciones D362 y D367 (en la región RCK1), cuya neutralización elimina la respuesta a calcio de alta afinidad (Xia y col., 2002). El mutante M513I elimina alta afinidad a calcio, lo que



sugiere que en esta posición se encuentra el tercer sitio de alta afinidad. (Bao y col., 2002). Las mutaciones en cada uno de estos sitios por separado no eliminan completamente la respuesta a calcio, pero en conjunto con mutaciones en el “calcium bowl”, eliminan la respuesta de alta afinidad (Zhang y col., 2001; Xia y col., 2002; Bao y col., 2002).

El segundo tipo de sitio es el de baja afinidad y se encuentra en la región RCK1 del canal, donde se ha mostrado que el residuo E399 forma parte de este sitio (Shi y col., 2002; Xia y col., 2002). Este sitio no discrimina entre calcio y magnesio, y es sensible a concentraciones de ambos divalentes entre 100 μM y 100 mM. La existencia de sitios de alta y baja afinidad puede explicar que el canal sea sensible a calcio en un intervalo de cuatro órdenes de magnitud.

2.3 *Modelos cinéticos*

En los modelos cinéticos actuales la activación del canal BK involucra tres procesos: la activación de los sensores de potencial, la unión de calcio y la apertura del canal. En estos modelos se considera la activación del canal como un proceso alostérico que comprende estos tres eventos y las interacciones entre ellos. Cada subunidad posee un sensor de potencial (que pueden sufrir transiciones entre los estados desactivados y activados) lo que posibilita la existencia de canales con 0, 1, 2, 3, ó 4 sensores de potencial activados. Los procesos de activación de los sensores de potencial y apertura del canal interactúan a través de un mecanismo alostérico, representado por la constante

alostérica D (Figura 4B). De tal manera que el equilibrio cerrado-abierto incrementa D veces por cada sensor de potencial activado.

El modelo sólo considera un sitio de unión a calcio por subunidad, y debido a que el canal es un tetrámero tendremos canales con 0, 1, 2, 3, y 4 iones calcio unidos (Figura 4A). A pesar de poseer muchos estados, este modelo hace algunas suposiciones para que el número de parámetros ajustables no sea elevado. Se supone que las subunidades son independientes, lo que significa la unión de un calcio no afecta la constante de equilibrio de los sitios de las otras subunidades. Lo mismo se aplica para los sensores de potencial, la activación de uno no afecta a los otros del mismo canal.

Varios indicios sugieren que la interacción entre el movimiento de los sensores de potencial y la unión de calcio existe. La demostración de la existencia de dicha interacción vino recientemente del grupo de Aldrich (Horrigan y Aldrich, 2002). Esta interacción entre la activación de los sensores de potencial y unión de calcio está

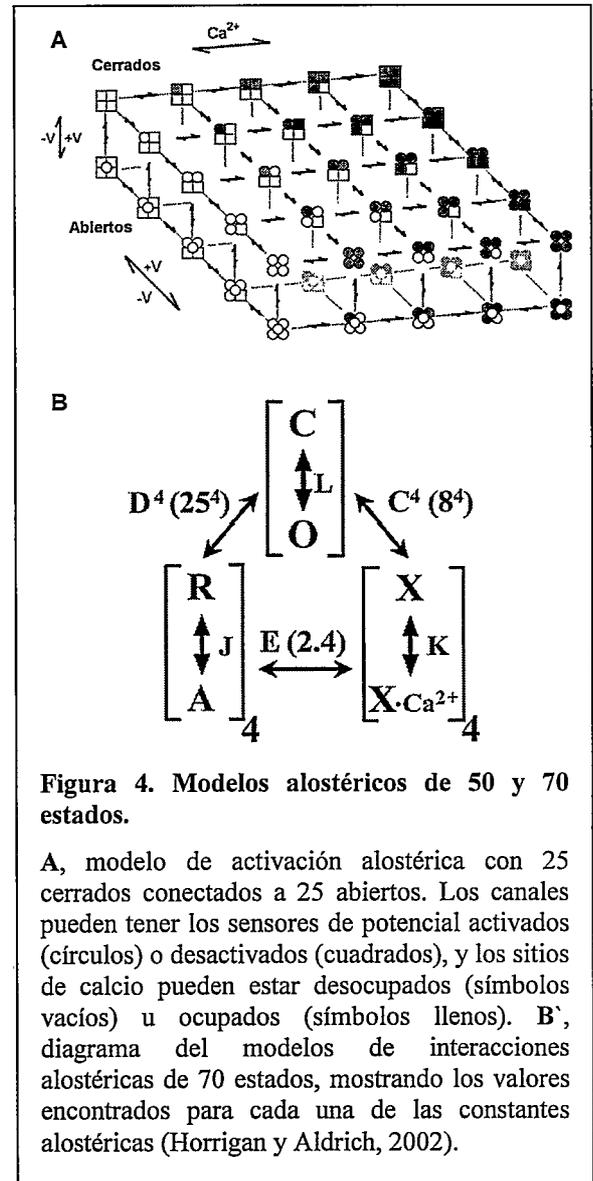


Figura 4. Modelos alostéricos de 50 y 70 estados.

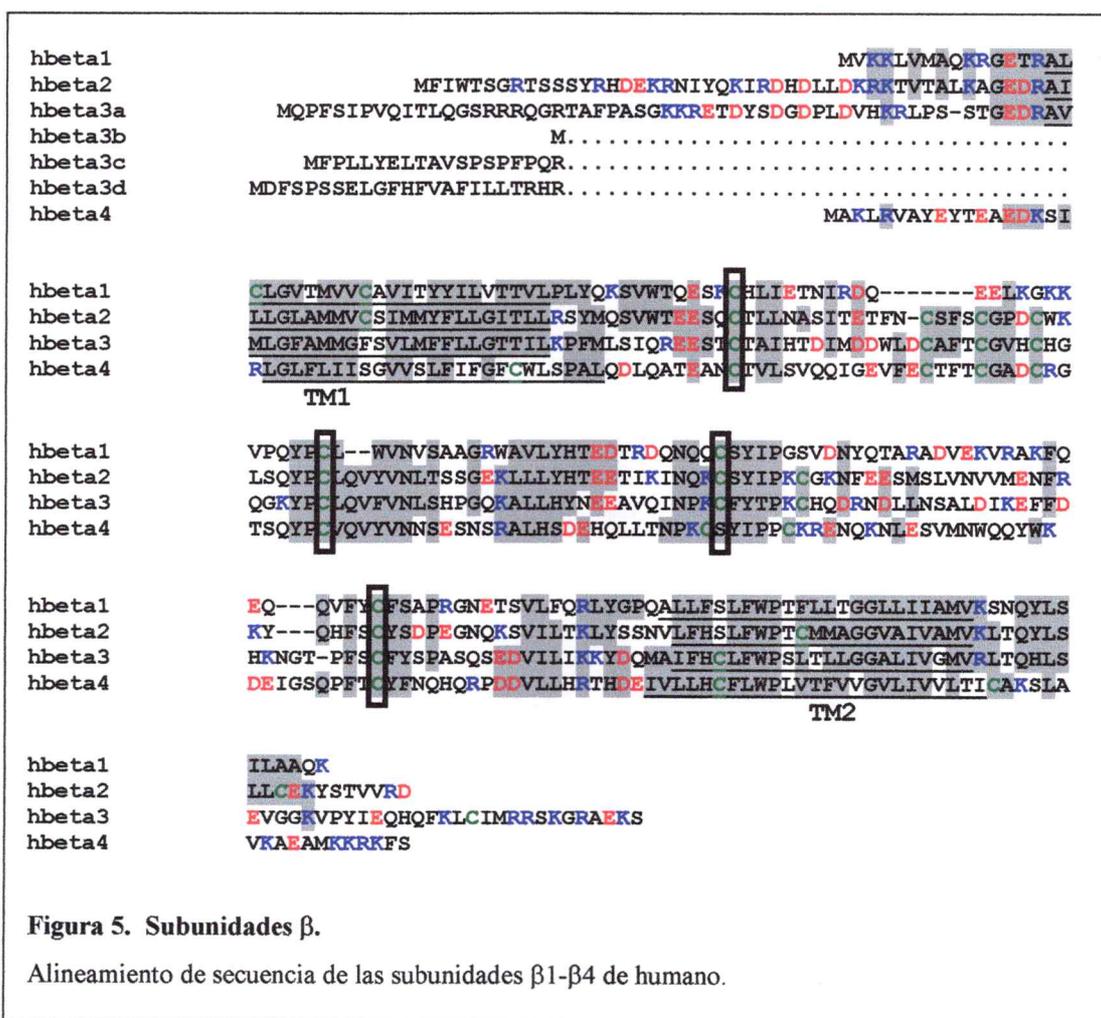
A, modelo de activación alostérica con 25 cerrados conectados a 25 abiertos. Los canales pueden tener los sensores de potencial activados (círculos) o desactivados (cuadrados), y los sitios de calcio pueden estar desocupados (símbolos vacíos) u ocupados (símbolos llenos). B, diagrama del modelos de interacciones alostéricas de 70 estados, mostrando los valores encontrados para cada una de las constantes alostéricas (Horrigan y Aldrich, 2002).

expresada por la constante alostérica E (Figura 4B). Al tomar en cuenta la interacción entre sensores de potencial y unión de calcio, el esquema cinético aumenta a 70 estados. Este modelo se puede representar gráficamente relacionando la apertura del canal, la activación de los sensores, y la unión de calcio mediante constantes alostéricas, como se muestra en la Figura 4B. Cuando no hay interacción entre los sensores de potencial y la unión de calcio, E=1 y el modelo tiene 50 estados (Figura 4A). La activación del canal para este modelo se ajusta a la siguiente ecuación (Horrigan y Aldrich, 2002):

$$P_o = \frac{L(1 + KC + JKCDE)^4}{L(1 + KC + JKCDE)^4 + (1 + J + K + JKE)^4} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{donde } L = L_0 \exp\left(\frac{z_l V}{kT}\right) \quad J = \exp\left(\frac{-z_j(V - V_j)}{kT}\right) \quad K = \frac{[Ca^{2+}]}{K_d}$$

Los parámetros son: L0 la constante de equilibrio de la transición cerrado-abierto con los sensores desactivados y en ausencia de calcio, Kd la constante de equilibrio de la unión de calcio en el canal cerrado, Vj es el V_{0.5} del movimiento de los sensores de potencial, z_j la carga asociada al movimiento de los sensores de potencial, z_l la carga asociada al proceso de apertura, C la constante alostérica que relaciona la unión de calcio con la apertura, D la constante alostérica que relaciona la activación de los sensores de potencial con la apertura, y E la constante alostérica que relaciona la unión de calcio con la activación de los sensores de potencial. Este modelo puede dar cuenta de los desplazamientos de las curvas de activación al aumentar el calcio



3 Subunidades β.

El canal BK se expresa en casi todos los tejidos de mamíferos, con excepción del cardíaco (Jiang y col., 1999). En algunos tejidos se encuentra formado solamente por las subunidades α como en el endotelio vascular o en el músculo esquelético (Papassotiropoulos y col., 2000), mientras que en otros tipos celulares como la células cromafines, se encuentra asociado a uno o varios tipos de subunidades β (revisado por Vergara y col., 1998; Orio y col., 2002).

Las subunidades β (también llamadas KCNMB, K^+ Channel subfamily M Beta subunit) son proteínas de dos segmentos de transmembrana que en algunos tipos celulares modulan la función de la subunidad α . Hasta el momento se ha identificado cuatro subunidades β en mamíferos ($\beta 1$ – $\beta 4$) (revisado por Orio y col., 2002). En la Figura 5 se muestra un alineamiento de secuencia de la subunidades β humanas. A continuación se discuten las características de cada subunidad.

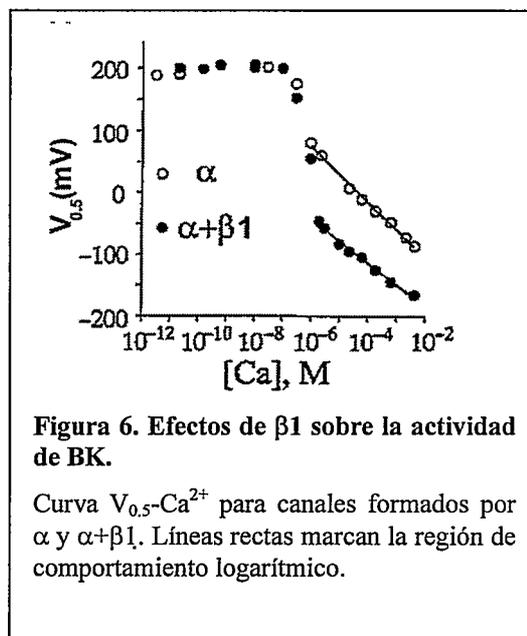
3.1 Estructura y localización

En mamíferos se ha identificado 4 genes que codifican para las subunidades β (*kcnmb1-4*). La subunidad $\beta 3$ presenta cuatro variantes de splicing ($\beta 3a-d$) en su N-terminal, región que confiere inactivación (Uebele y col., 2000; Hu y col., 2003). Las subunidades β tienen dos o tres sitios de glicosilación en la región extracelular, que al menos para $\beta 4$ influye en la unión de la toxina Charybdotoxin (CTX) al canal (Jin y col., 2002a). Mediante identificación de los mRNA de cada una de estas subunidades se ha podido identificar su localización en distintos tejidos, como veremos a continuación. La subunidad α de BK se expresa en casi todos los tejidos de mamíferos con la excepción del corazón (Jiang y col., 1999). La subunidad $\beta 1$ se expresa en músculo liso y cerebro (Eghbali y col., 2003; Tanaka y col., 1997; Meredith y col., 2004; Petkov y col., 2001; Brenner y col., 2000b). La subunidad $\beta 2$ se expresa en células cromafines y cerebro (Xia y col., 2000; Meera y col., 2000; Brenner y col., 2000a). La subunidad $\beta 3$ se expresa en células β del páncreas, riñón y testículos (Brenner y col., 2000a; Behrens y col., 2000;

Meera y col., 2000; Xia y col., 2000; Uebele y col., 2000). La subunidad $\beta 4$ se expresa exclusivamente en cerebro (Meera y col., 2000; Brenner y col., 2000a; Weiger y col., 2000; Behrens y col., 2000). Sin embargo, aun no ha sido posible verificar en todos estos tejidos la expresión de dichas proteínas, ya sea por Western Blot o por mediciones electrofisiológicas.

3.2 Modulación de la actividad

Las subunidades β afectan la sensibilidad por calcio y potencial del canal BK cuando ellas son co-expresadas junto a la subunidad α . Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ aumentan la sensibilidad por calcio, visto como un mayor desplazamiento de los valores de $V_{0.5}$ en función de calcio, comparadas a canales carentes de dichas subunidades (Figura 6 para $\beta 1$) (Wallner y col., 1995; Dworetzky y col., 1996; Meera y col., 1996; Wallner y col., 1999; Xia y col., 1999). Sin embargo, la subunidad $\beta 2$ hace que los valores de $V_{0.5}$ sean mas negativos que los de $\alpha+\beta 1$ bajo calcio 100 nM (Wallner y col., 1999; Orio y Latorre, 2005). La expresión de cualquiera de las variantes de splicing de la subunidad $\beta 3$



no afecta el valor de los $V_{0.5}$ (Uebele y col., 2000; Xia y col., 2000; Hu y col., 2003). Por último, la subunidad β_4 hace que el calcio tenga un comportamiento “mixto” sobre la actividad del canal. A bajas concentraciones de calcio los valores de $V_{0.5}$ son similares e incluso menores a los reportados para canales sólo formados por subunidad α . Pero por sobre el rango micromolar los valores de $V_{0.5}$ se hacen mas negativos de los encontrados para $\alpha+\beta_1$ y $\alpha+\beta_4$, es decir aumenta la sensibilidad aparente por calcio (Meera y col., 2000; Brenner y col., 2000a; Weiger y col., 2000; Behrens y col., 2000; Ha y col., 2004).

3.3 **Efecto de ligandos**

La presencia de las subunidades β afecta la afinidad por ciertos ligandos aplicados por el lado extracelular e intracelular. El compuesto 17β -Estradiol al ser aplicado extracelularmente aumenta la actividad de canales que expresan subunidades β_1 y β_4 , pero no cuando se expresa la subunidad β_2 (Valverde y col., 1999; Behrens y col., 2000). Otros compuestos como los antiestrógenos Tamoxifeno e ICI 181,172 aumentan la actividad de canales con subunidades β_1 , pero no en canales que carecen de dicha subunidad (Dick y Sanders, 2001; Dick y col., 2001; Dick y col., 2002; Dick, 2002). El compuesto Dehidroxisoyasaponina (DHS-I) aplicado por la cara intracelular del canal aumenta la actividad de canales que tienen subunidades β_1 y β_2 con respecto a canales que expresan sólo la subunidad α (McMannus et al., 1993; Tanaka et al., 1997).

3.4 **Efecto de bloqueadores y la vía de conducción**

La presencia de subunidades β también afecta la afinidad por toxinas por el lado extracelular. La subunidad $\beta 1$ de bovino aumenta la afinidad por CTX (a diferencia de la humana que no lo hace). Esta toxina se entrecruza químicamente con $\beta 1$ (Knaus y col., 1994a), lo que sugiere que dicha subunidad se encuentra en la cercanía de la vía de conducción. Por otro lado, las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ disminuyen la afinidad tanto por CTX como por Iberiotoxina (IbTX) (Meera y col., 2000; Xia y col., 1999; Behrens y col., 2000). La construcción de quimeras entre subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$ pudo determinar que la región extracelular de $\beta 4$ es la responsable de la disminución de la afinidad por ambas toxinas (Meera y col., 2000).

La presencia de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ produce una rectificación de canal abierto, visto como una no linealidad de las curvas I-V instantáneas (Xia y col., 2000; Zeng y col., 2003). Esto se ha interpretado como una alteración en la vía de conducción. Mediante la construcción de quimeras entre la subunidad $\beta 3$ y las otras subunidades β se encontró que la totalidad de la región extracelular es responsable de la rectificación (Zeng y col., 2003).

3.5 **Roles fisiológicos**

La subunidad $\beta 1$ participa en la mantención y regulación del tono del músculo liso vascular, y del músculo liso de la vejiga (Jaggar y col., 1998; revisado por Gollasch y col., 2000; Jaggar y col., 2000; Brenner y col., 2000b; Herrera y col., 2001; Meredith y

col., 2004; Pozo y col., 2002). La subunidad β_2 , alter las propiedades de disparo de las células cromafines de la médula adrenal, modulando así la secreción de catecolaminas (Solaro y Lingle, 1992; Solaro y col., 1995). La subunidad β_4 al estar expresada en el cerebro se cree que está implicada en la sensibilidad diferencial del canal BK por CTX, IbTX y etanol. Ya que en sistemas heterólogos y neuronas aisladas se ha reportado que canales BK con la subunidad β_4 alteran la sensibilidad por dichos compuestos (Wang y col., 1992; Wang y Lemos, 1992).

3.6 Interpretaciones de los modelos cinéticos

Al ajustar los resultados de corrientes macroscópicas a modelos cinéticos de activación, se reportó que la subunidad β_1 no afecta los parámetros relacionados con la unión de calcio (Cox y Aldrich, 2000; Orio y Latorre, 2005). Esto sugiere fuertemente que el efecto de β_1 es independiente de este ion. Esta subunidad disminuye el valor de z_j lo que se observa como una disminución de la dependencia de potencial de las curvas de activación (Orio y Latorre, 2005). Resultados provenientes de canal único y corrientes macroscópicas coinciden en mostrar que el efecto de la subunidad β_1 es independiente de la concentración de calcio, y que se debe a algún factor dentro de la maquinaria de apertura y cierre del canal (Nimigean y Magleby, 2000; Orio y Latorre, 2005).

Al igual que β_1 , la subunidad β_2 aumenta la sensibilidad aparente del canal por calcio y hace más lentas tanto la apertura como el cierre del canal (Orio y Latorre, 2005; Wallner y col., 1999; Xia y col., 1999). Sin embargo, los valores de $V_{0.5}$ para

concentraciones menores a calcio $1 \mu\text{M}$ son más negativos que los conferidos por $\beta 1$ (Wallner y col., 1999). Esta subunidad no altera las pendientes (y por consiguiente los valores de z) de las curvas de activación como lo hace $\beta 1$. El ajuste de las curvas G-V muestra que el efecto de $\beta 2$ no es sobre la maquinaria de detección de calcio, sino a través de cambios en las constantes de acoplamiento alostérico (Orio y Latorre, 2005). A nivel molecular esta subunidad podría afectar el movimiento del sensor de potencial (por aumento de D) y estabilizar la conformación activa del canal (por aumento de C).

4 Estequiometría α - β

En células cromafines se ha reportado la existencia de una corriente BK que sufre inactivación, la cual es sensible a tripsina por el lado intracelular (Solaro y col., 1995). Esta inactivación es debida a la presencia de la subunidad $\beta 2$ (Xia y col., 2000; Xia y col., 2003). Ajustando el curso temporal de la remoción de la inactivación por digestión con tripsina, a un modelo de partículas independientes, se obtuvo 3 a 4 partículas por canal (Ding y col., 1998), sugiriendo el mismo número de subunidades.

Un experimento clave para entender la estequiometría de estas subunidades consistió en expresar distintas razones molares de subunidades α y $\beta 2$. Al reducir la razón molar $\beta 2:\alpha$, los valores obtenidos para $V_{0.5}$ se desplazaron desde valores cercanos a los que posee $\alpha+\beta 2$, hacia valores cercanos a los reportados para α (Wang y col., 2002). Estos resultados se ajustaron a un modelo en que cada subunidad produce un incremento idéntico en el desplazamiento de las curvas de activación. Esto significa que puede existir canales formados por 0, 1, 2, 3, ó 4 subunidades. Estos resultados son una

clara indicación de que variando la estequiometría entre estas subunidades, se pueden formar distintos tipos de canales. Esto puede ser muy importante desde el punto de vista fisiológico, ya que corresponde a otra manera de manejar la excitabilidad celular.

5 Estructura del complejo α - β

La información estructural que se tiene de los canales de potasio viene principalmente de registros electrofisiológicos y cristales de canales bacterianos (revisado por MacKinnon, 2003; Cohen y col., 2003). Estos últimos han dado información principalmente acerca de la ubicación espacial de la vía de conducción y de algunos dominios, como RCK1 (Doyle y col., 1998; Jiang y col., 2002a; Nishida y MacKinnon, 2002). A continuación se discutirá la información estructural que se tiene del complejo α - β de BK.

Se sabe que el segmento S0 de la subunidad α es necesario para el acoplamiento funcional entre ambas subunidades (Wallner y col., 1996). Esto quedó en evidencia mediante la construcción de quimeras entre las subunidades α humana y de mosca, hSlo1 y dSlo1. La subunidad α de *Drosophila* no interactúa con la subunidad β 1 humana. Las quimeras dSlo1 con el segmento S0 de hSlo1 fueron sensibles a β 1, mientras que las quimeras hSlo1 con el S0 de dSlo1 no lo fueron. Además de S0, la región N-terminal de hSlo1 es necesaria para la interacción funcional con la subunidad β 1 (Meera y col., 1997; Wallner y col., 1996).

Por parte de las subunidades β , se ha mostrado que ellas se encuentran cercanas al poro, ya que alteran tanto la conducción, como la afinidad por bloqueadores (revisado

por Orio y col., 2002). Se ha mostrado que un residuo cargado de la subunidad $\beta 1$ de bovino (K67) se entrecruza químicamente con CTX (Knaus y col., 1994b). Para que la reacción de entrecruzamiento ocurra, el residuo y la toxina debe encontrarse a una proximidad de alrededor de 7 Å (Knaus y col., 1994b; Munujos y col., 1995). Esta misma subunidad posee cuatro residuos de cisteína en su región extracelular, cuya eliminación puntual o completa provoca una disminución en la afinidad por CTX, y la eliminación de al menos un puente disulfuro (Hanner y col., 1998). Esta evidencia se ha interpretado como una alteración de la estructura terciaria de la región que une los dominios de transmembrana de la subunidad $\beta 1$.

Las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ confieren la propiedad de rectificación al canal abierto, lo que implica una alteración de la vía de conducción. En condiciones simétricas de potasio, esta rectificación se evidencia a potenciales más negativos que -40 mV. Ambas subunidades disminuyen la afinidad por CTX, comparado con canales formados sólo por subunidades α . La rectificación y el cambio de afinidad por la toxina sugieren fuertemente que parte de estas subunidades se encuentran en las cercanías de la vía de conducción. Para $\beta 3$ se mostró que al tratar con el agente reductor DTT por el lado extracelular desaparece la rectificación de canal abierto, y aumenta dramáticamente la sensibilidad por CTX (Zeng y col., 2003). Es decir, la eliminación de puentes disulfuro en esta región alteró parte de la estructura de la región extracelular, devolviéndola a una conformación similar a la de la subunidad α en ausencia de β .

Estos resultados en su conjunto llevan a pensar que una porción de las subunidades β podría estar formando parte del poro del canal, y por consiguiente

se le asigna una ubicación por sobre la subunidad α , hacia el lado extracelular. Se desconoce cómo esto puede afectar la probabilidad de encontrar al canal abierto, ya sea a nivel del sensor de potencial, de la transducción de la señal de unión de calcio o de algún otro fenómeno.

OBJETIVOS

1 **Objetivo general e hipótesis de trabajo**

El objetivo general propuesto en este trabajo de tesis fue **determinar las regiones dentro de la subunidad $\beta 1$ involucradas en conferir los efectos moduladores de ésta sobre el canal BK.**

Este objetivo se desarrollará sobre la hipótesis de la existencia de regiones específicas dentro de las subunidades β que son responsables del acoplamiento funcional con la subunidad α . En otras palabras, este trabajo de tesis buscará determinar regiones específicas en la subunidad $\beta 1$ que sean responsables de cada uno de los efectos que esta subunidad confiere: sensibilidad a calcio, cinéticas de apertura y cierre, sitios de unión a toxinas.

La realización de los objetivos específicos contribuirá a un mejor entendimiento de la relación estructura función para la interacción entre subunidades α y $\beta 1$.

2 **Objetivos específicos**

2.1 ***Caracterizar biofísicamente el efecto de eliminar las cisteínas de la región extracelular de la subunidad $\beta 1$.***

El lazo extracelular de $\beta 1$ comprende 120 residuos, cuatro de los cuales son cisteínas. Como se discutió previamente, la eliminación de cada uno de ellos disminuye drásticamente la afinidad del canal por CTX. Esto último debido probablemente a un cambio de conformación o una pérdida de estructura en esta región, conferido por dichas mutaciones.

Para cumplir este objetivo se estudiarán electrofisiológicamente las mutantes C53A, C76A, C103A, C135A, y C53A/C76A/C103A/C135A, pertenecientes a la región extracelular de $\beta 1$. En los canales modificados por estas subunidades $\beta 1$ se estudió la cinética de apertura y cierre, su sensibilidad al calcio y al potencial eléctrico, así como la conducción, con el objeto de determinar si el cambio en la estructura de la región extracelular de $\beta 1$ afectó el funcionamiento del canal. Esto se cuantificó mediante el uso de un modelo cinético adecuado. Esto permitió determinar la importancia de la estructura de esta región, y la participación de cada uno de los residuos de cisteína.

2.2 Determinar regiones en la subunidad $\beta 1$ relacionadas con los efectos de esta subunidad.

Se realizaron mutantes de supresión de diversas longitudes (10-20 residuos), tanto en los segmentos de transmembrana como en la región extracelular, para determinar su importancia en la función de la proteína. Como en el objetivo específico anterior, se estudiaron las propiedades electrofisiológicas de dichos mutantes. Estas fueron la cinética, dependencia de potencial y de calcio, y conducción. Estos resultados permitieron elaborar una idea de los efectos ejercidos por cada una de las regiones suprimidas.

2.3 Determinar dominios funcionales mediante la construcción de quimeras entre subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$.

Como se mencionó anteriormente, las propiedades que confieren las subunidades $\beta 1$ y $\beta 4$ a la actividad del canal son dramáticamente diferentes. Mientras la subunidad $\beta 1$ aumenta la afinidad aparente por calcio, $\beta 4$ la disminuye. Estas subunidades afectan de manera diferente las cinéticas de apertura y cierre, como se discutió previamente: ambas subunidades hacen más lenta la cinética de apertura, pero el efecto de $\beta 4$ es mucho más intenso. El estudio de quimeras entre ambas subunidades ayudó a definir dominios funcionales relacionados con la modulación que ellas ejercen.

MÉTODOS

1 Biología Molecular

1.1 Cepas de Bacterias

Se usó la cepa de *E. coli* DH5 α para amplificar los vectores de la serie pGEM (Promera Corp., Madison, WI USA), pCDNA3 y pCI-NEO, en los cuales se encuentran clonadas las subunidades α y β utilizadas en este trabajo.

1.2 Cultivo de bacterias

Un inóculo de la cepa transformada con el plasmidio de interés se creció en el volumen deseado en medio líquido con agitación a razón de 225 ciclos/minutos en un agitador orbital y a una temperatura de 37 °C,. Se utilizó medio LB (Luria-Bertani) o Typ (Sambrook y col. 1989). En el caso de cultivos en medio sólido, este se preparó usando el medio líquido suplementado con agar al 15% (Sambrook y col. 1989). Todos los medios se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 125 °C y una presión 15 psi.

1.3 Obtención de bacterias competentes.

Las células competentes se prepararon siguiendo el protocolo con cloruro de rubidio (PROMEGA, Madison). Éste comienza con la toma de una colonia desde una placa de cultivo sólido que se crece por 14 horas en 50 mL de medio líquido. Desde aquí se toma 0.5 mL del cultivo y se crece en 50 mL de LB enriquecido con 20 mM de $MgSO_4$, hasta obtener una absorbancia en el rango de 0.2 a 0.4 a una longitud de onda de 550 nm. Las células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en TFB1 estéril (acetato de potasio 30mM, $CaCl_2$ 10 mM, $RbCl$ 100 mM, glicerol 15 %, pH 5.8 ajustado con ácido acético) y frío, manteniéndolas posteriormente en hielo por 5 minutos. Esta suspensión de bacterias se dividió en porciones de 100 μ L, que se congelaron con N_2 líquido, y se guardaron a $-70^\circ C$

1.4 Transformación de células competentes

Una suspensión de bacterias competentes (50 μ L) se trató con 0.015 volúmenes de DMSO o β -mercapto etanol (22mM final) durante 10 minutos en hielo, agitando suavemente cada 2 minutos. A esta mezcla se añadió 1 ng de DNA plasmidial y se mantuvo en hielo por 30 minutos. Luego se dio un choque térmico de $42^\circ C$ durante 60 segundos, y se puso en hielo por 1 ó 2 minutos. Posteriormente, las bacterias se crecieron por 45 minutos en 5 mL de medio líquido sin antibióticos. Finalmente, las bacterias se crecieron en placas con medio sólido suplementadas con antibiótico, a $37^\circ C$, durante 12 a 16 horas.

1.5 **Antibióticos**

La selección de las bacterias transformadas se realizó de acuerdo a la resistencia al antibiótico impartida por el vector de expresión utilizado en cada caso. El antibiótico se añadió al medio estéril a partir de soluciones concentradas que fueron mantenidas a -20 °C. La ampicilina se usó a una concentración de 100 µg/mL, a partir de un stock de 100 mg/mL en agua; la tetraciclina se usó a una concentración de 10 µg/mL, desde un stock de 10 mg/mL en etanol (Sambrook y Russel, 1989).

1.6 **Obtención y purificación de DNA plasmidial.**

Para obtener pequeñas cantidades de DNA plasmidial (menos de 5 µg), éste se purificó con las columnas MINI según las indicaciones del fabricante (QIAGEN, Chatsworth). Para obtener grandes cantidades de DNA (alrededor de 50 µg) se utilizaron columnas MIDI de (QIAGEN, Chatsworth; o STRATAGENE, La Jolla) según indicaciones del fabricante. El DNA se resuspendió en un volumen adecuado de TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) o en agua libre de RNAasa.

1.7 **Geles de agarosa**

La integridad del ácido nucleico se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa (0.7% a 0.9%) según el patrón de migración con relación a estándares de peso

molecular y concentración conocidas. Los geles se sumergieron en buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y la electroforesis se realizó aplicando el voltaje necesario para alcanzar 10 mA de corriente. El DNA se tiñó con bromuro de etidio 0.66 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (a partir de una solución 10 mg/mL). Una estimación preliminar de la concentración de las muestras se hizo comparando visualmente las intensidades de las bandas de interés con los estándares de concentración conocida. La concentración de los ácidos nucleicos se determinó de una alícuota de DNA en TE o agua, midiendo la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro GenesisTM2 (SPECTRONIC INSTRUMENTS, Rochester). Posteriormente se tomaron fotografías de los geles iluminados con una lámpara UV, usando una cámara digital Nikon (NIKON, USA) con un filtro para detectar luz UV.

1.8 **Purificación de ácidos nucleicos.**

Para eliminar impurezas de las muestras de DNA plasmidial (obtenidas por PCR, o luego del tratamiento con alguna enzima) y RNA (obtenido por transcripción *in vitro*), se efectuaron extracciones en un medio orgánico. La primera extracción se realizó con una mezcla que contenía fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25 : 24 : 1). A continuación se prosiguió con dos extracciones en cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1). El DNA plasmidial fue precipitado con acetato de potasio (0.3 M) y 2.5 volúmenes de etanol. Los ácidos nucleicos se sedimentaron en una centrifuga, y el precipitado se lavó dos veces con etanol 70%. Posteriormente se sometieron a electroforesis en geles

de agarosa para cuantificar su concentración, y determinar la presencia de producto no deseados.

1.9 Clones

Todas las construcciones que se expresaron en *Xenopus laevis* fueron cedidas por la Dra. Ligia Toro (UCLA). Las construcciones para la expresión en células de mamíferos en cultivo fueron cedidas por la Dra. Maria L. García (Merk Research Laboratory). La subunidad α del canal BK (KCNMA1) se encuentra clonada en el vector pGEM zf9- bajo el control del promotor T7. Este promotor permite sintetizar mRNA *in vitro* para su inyección en oocitos de *X. laevis*. Este vector tiene una secuencia poli-A y el extremo 3' no traducido de la β -globina de *X. laevis*. Ambas secuencias aumentan la estabilidad de los productos de la transcripción, lo que incrementa la expresión de la proteína (Shih y col., 1998). Esta subunidad también se encuentra en el vector pCDNA3 (INVITROGEN, Carlsbad), que se utilizó para transfectar células de mamíferos. Este vector tiene el promotor T7 para transcripción de RNA *in vitro* y el promotor CMV para la transcripción en células de mamíferos. La subunidad β 1 (KCNMB1) se encuentra clonada en los vectores pSPORT, pGEMzf9- y pBSTA para la síntesis de RNAm, y pCI-neo para la transfección en células de mamíferos. Las subunidades β 4 (KCNMB4), β 1L β 4 y β 4L β 1 se encuentran en pGEMzf9-. Las mutantes de β 1 de bovino (β 1) C18A, C18A/C53A, C18A/C76A, C18A/C103A, C18A/C135A, C18A/C53A/C76A/C103A/C135A se encuentran clonadas en pCI-neo, el cual tiene la

secuencia de β -globina de ratón, y los promotores T7 y CMV, para su expresión en oocitos de *Xenopus laevis* y en células de mamíferos.

1.10 **Mutantes de delección de la subunidad $\beta 1$.**

Las mutantes de supresión de la región extracelular de $\beta 1$ se construyeron en el vector de expresión pGEM9zf-hKCNMB1. Este vector contiene la secuencia de la subunidad $\beta 1$ humana (KCNMB1) entre los sitios de restricción SacI y NotI. Se diseñaron partidores de aproximadamente 20 residuos de nucleótidos, que flanquearon las regiones a eliminar, y luego se realizó una reacción de PCR con la enzima Pfu Turbo (STRATAGENE, La Jolla) para amplificar el plasmidio completo (descrito en Gonzalez y col., 2000). Los partidores fueron sintetizados comercialmente (IDT-DNA, Coralville). Las condiciones de PCR fueron las recomendadas por el fabricante, sin embargo se variaron las temperaturas de “annealing” en algunas de las construcciones hasta obtener la cantidad de producto deseado. Luego de verificar las mutaciones mediante la lectura de su secuencia, se obtuvo un inserto mediante cortes con enzimas de restricción. Este inserto se sub-clonó dentro de un vector previamente tratado con las mismas enzimas para eliminar la región en donde se hizo la supresión.

1.11 **Transcripción *in vitro*.**

La transcripción se realizó usando como molde el DNA plasmidial previamente linealizado en un sitio único (el que depende de cada plasmidio) ubicado hacia 3' del

ORF (“open reading frame”). La purificación del DNA linealizado y toda su manipulación posterior se hizo en medios libres de RNAsas. La linealización se verificó en un gel de agarosa al 0.7%.

La reacción de transcripción *in vitro* se efectuó empleando el “kit” mMMESSAGE mMACHINE según las indicaciones del fabricante (AMBION, Austin). La síntesis se dirigió desde el promotor T7 y se hizo en presencia de G(5')ppp(5')G, un análogo del nucleótido de modificación en 5' (7-metil guanosina, “cap”). La reacción de transcripción se detuvo retirando el DNA templando con DNAsa I libre de RNAasa, y añadiendo medio volumen de una solución de precipitación de RNA (LiCl 7.5M, EDTA 75 mM). La mezcla se enfrió a -20 °C por una hora, y se sedimentó a máxima velocidad por 20 minutos en una microcentrífuga (EPPENDOFF, Hamburg). El sedimento de RNA se lavó en etanol 70% y se resuspendió en agua libre de RNAasa. La integridad del transcrito se verificó en un gel de agarosa al 0.7% libre de RNAasa, y se cuantificó midiendo la absorbancia.

1.12 **Secuenciación.**

Todas las construcciones realizadas fueron secuenciadas automáticamente para determinar si correspondían al producto deseado (RETROGEN, San Diego). Para determinar las secuencias, los cromatogramas generados por el secuenciador automático se analizaron usando el software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) y se compararon las secuencias usando la suite VECTOR NTI (INVITROGEN, Carlsbad).

2 Expresión heteróloga

2.1 Oocitos de rana.

2.1.1 Ranas

Se utilizó un grupo de 40 ejemplares hembras de la especie *Xenopus laevis* provenientes de USA (XENOPUS ONE, Michigan). Éstas se mantuvieron en grupos de 10 ejemplares en bateas plásticas con 15 a 20 litros de agua potable sin cloro a una temperatura de 18 °C y en oscuridad permanente. El cloro se extrajo del agua almacenándola en toneles de 100 litros y burbujando aire durante dos a tres días. Las ranas fueron alimentadas dos veces por semana con alimento para anfibios (NASCO, Modesto).

2.1.2 Oocitos

Los ejemplares de *X. laevis* se anestesiaron sumergiéndolos en hielo por 45 a 60 minutos. A continuación se procedió a hacer una pequeña incisión abdominal por la cual se extrajeron uno o dos lóbulos ováricos. Estos se transfirieron a una solución OR-2 (NaCl 96mM, KCl 2mM, MgCl 1mM, HEPES 5 mM pH 7,4). La incisión se suturó y el ejemplar se colocó en una mezcla de agua y hielo para su recuperación. Los lóbulos se cortaron en pequeñas secciones mediante el uso de pinzas N°5 (DUMONT & FILS, Suiza). Para obtener oocitos individuales, los lóbulos fueron incubados en medio OR-2 con 1mg/mL de la enzima colagenasa (GIBCO BRL, Gaithersburg), equivalente a 242

U/mg. El procedimiento consistió en: agitar por 20 minutos a 180 ciclos por minuto, separar mediante pinzas y luego un segundo ciclo de agitación de 20 minutos a 30 ciclos por minuto a una temperatura de 18 °C. Los oocitos tratados se lavaron 5 a 8 veces en medio OR-2 sin colagenasa, y 6 a 8 veces con la solución ND96 (NaCl 96mM, KCl 2mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 5mM, pH 7,4). Finalmente, se colocaron en una placa de Petri de 100 mm de diámetro con medio ND96 más el antibiótico gentamicina (50µg/mL). Se realizó una selección de oocitos, eliminando los dañados e inmaduros y luego se mantuvieron a 18 °C por al menos seis horas antes de la microinyección.

2.1.3 Microinyección

Doce a veinticuatro horas después del tratamiento con colagenasa se hizo una segunda selección de oocitos, procedimiento que consistió en retirar la membrana folicular mediante pinzas. La microinyección se realizó usando una lupa binocular (Nikon, USA) con una fuente de luz de fibra óptica (FO-150Z, WPI USA), un microinyector (A2063XVY, WPI USA) y un micromanipulador (M3301R, WPI USA), bajo una lupa binocular (Nikon, USA) con una fuente de luz de fibra óptica (FO-150Z, WPI USA).. Las micropipetas de inyección se hicieron estirando capilares de vidrio (4878 WPI, Sarasota, USA) en un estirador horizontal (Sutter Instrument, Novato). La punta de la pipeta se quebró con una pinza bajo el microscopio para obtener un diámetro aproximado de 20 µm. Un tercio de la micropipeta se llenó con aceite mineral liviano libre de RNAasa (SIGMA, St Louis). La micropipeta se insertó en el

vástago del microinyector y la vaselina líquida se hizo avanzar hasta la punta. Una gota de la solución de mRNA se depositó en un trozo de Parafilm® ubicado sobre una placa de Petri llena con hielo y se succionó 0.75-1.2 μ L de mRNA. Los oocitos se depositaron en una placa plástica que contenía ND-96, a la que se le adhirió una rejilla plástica que permite mantener a los oocitos en una posición fija. Se microinyectó 50 nL de mRNA total, que corresponden a 10 a 50 ng por oocito. Los oocitos microinyectados se mantuvieron a 18 °C en ND-96 con gentamicina, solución que fue cambiada cada 12 horas, retirando cada vez los oocitos en mal estado. Los registros electrofisiológicos se efectuaron 2 a 3 días después de la microinyección.

2.2 Células HEK293

2.2.1 Cultivo celular

Se utilizaron células de embrión fetal humano HEK293, cedidas por el Dr. Pablo Cid, que se mantuvieron a 37 °C y 5 % CO₂ en medio de cultivo DMEM/F-12 (SIGMA, St.Louis) suplementado con 10% suero fetal de bovino (HYCLONE, Logan). Las células se crecieron en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie, con 5 mL de medio de cultivo con suero hasta alcanzar una confluencia de 70-90%. Las células con este grado de confluencia se subcultivaron mediante dos lavados con 5mL de PBS pH 7.4, seguidos de una resuspensión con 1 mL PBS + Tripsina-EDTA 1X (SIGMA, St Louis), para despegar las células hasta que todas ellas se encontraron en suspensión. La tripsina se inactivó agregando 1 mL de medio de cultivo con suero. De ésta última suspensión se

tomaron 500 μL , que fueron agregados a un nuevo frasco de cultivo, al que además se le adicionó 5 mL de medio de cultivo con suero. De esta forma se mantuvo el cultivo celular necesario para transfectar.

2.2.2 Transfección

Para transfectar células se usaron cubreobjetos redondos de 10 mm de diámetro #1, cubiertos con 50 μL de Poly-L-Lisina (SIGMA, St.Louis) estéril, que se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10-30 minutos. La Poly-L-Lisina se eliminó lavando 6 veces con 2 mL de PBS. Los cubreobjetos se colocaron de a 5 en platos de cultivo de 35 mm de diámetro (Orange Scientific, Belgium), con 2 mL de medio de cultivo con suero. En cada plato de cultivo se agregaron 3-4 gotas de la suspensión de células.

Células HK293 al 40-70% de fueron transfectadas con LIPOFECTAMINA-2000 (LPF-2000) según instrucciones del fabricante (INVITROGEN, Carlsbad). Brevemente, 8 μL de LPF-2000 se incubaron en un tubo Eppendorff con 250 μL de medio de cultivo DMEM/F12 (SIGMA, St Louis) sin suero por 5 minutos a temperatura ambiente. En paralelo, DNA plasmidial se puso en 250 μL de medio de cultivo sin suero. Al transcurrir los 5 minutos se mezclaron los contenidos de ambos tubos y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Al término de esta incubación el contenido de esta mezcla se agregó a un plato de cultivo de 35 mm con células crecidas en cubreobjetos. La cantidad de DNA utilizada para transfectar un plato de cultivo de 35 mm con 5 coverslips fue de 1-2 μgr de cDNA de las subunidades α y β en razón molar de 1:2 ó 1:4 respectivamente. Además se utilizó un vector de expresión con la proteína de membrana

CD-8 como marcador de transfección. Esta proteína se utilizó para distinguir las células transfectadas, ya que bolitas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-CD8 (DYNAL, Noruega) se unen a dichas células.

3 Registros Electrofisiológicos

3.1 Micropipetas

Las micropipetas para células se obtuvieron estirando capilares de vidrio con filamento G150F-4 (WPI, Sarasota) mediante un estirador horizontal P80-PC (SUTTER INSTRUMENT, Novato). Los micropipetas tuvieron un diámetro de 5-10 μm y una resistencia de 1-2 $\text{M}\Omega$. Estas se pulieron en una microforja (NARISHIGE, Long island) para redondear los bordes de la punta y disminuir el diámetro de la abertura, cuando fue necesario.

Las micropipetas para oocitos se obtuvieron mediante el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero se usaron los capilares de vidrio sin filamento (Harvard, PG150T-10). La resistencia obtenida después del pulido con calor fue de 0.8-1.2 $\text{M}\Omega$.

3.2 Puentes.

Los puentes de agar se construyeron usando capilares de vidrio de un diámetro interno de 1.2 mm. Estos puentes se modificaron de acuerdo con las dimensiones de la cámara de registro usada. Los capilares se rellenaron con una solución caliente de agar

1% p/p con solución de registro de baja concentración de calcio. Estos puentes se utilizaron en varios experimentos y por lo tanto se guardaron en la solución de registro.

3.3 Soluciones de registro

Las soluciones de registro usadas para células HEK293 contienen (en mM) K-MES 140, KCl 2, EGTA o EDTA 5, HEPES 10, pH 7.4. Para registros en oocitos de *X. laevis* se utilizaron soluciones que contienen (en mM) K-MES 110, KCl 2, EGTA o EDTA 5, 10 HEPES, pH 7.4. Para obtener diferentes concentraciones de calcio, se agregaron pequeños volúmenes de CaCl_2 1 M hasta alcanzar la concentración de calcio libre deseada. La concentración de calcio libre fue medida con un electrodo de calcio, usando estándares de concentraciones conocidas (WARNER INSTRUMENTS, Hamden).

3.4 Sistema de Registro de las corrientes macroscópicas

Para registrar la actividad eléctrica de los canales BK se utilizó la técnica de Patch-Clamp (Apéndice 2) en su modalidad inside-out (Hamill y col., 1981). Esta consiste en obtener sellos de alta resistencia y luego retirarlos de la célula, dejando el lado intracelular del parche orientado hacia el baño. Mediante un micromanipulador de 3 ejes (NEWPORT, Irvine) se ubicó la pipeta sobre la célula blanco, y mediante un micromanipulador motorizado (NEWPORT, Irvine) se movió la micropipeta en el eje vertical hasta tocar la célula. Observando la señal eléctrica, se procedió entonces a

aplicar una leve succión esperando hasta obtener un sello de alta resistencia (>1 G Ω) estable en el tiempo.

Como amplificador se usó un Axopatch 200B (AXON INSTRUMENTS, Foster City), junto a una interfase Digidata 1200B (AXON INSTRUMENTS, Foster City), para la conversión análoga-digital, digital-análoga. Esta interfase se conectó al computador de registro mediante un puerto SCSI. El Software de adquisición fue la Suite pCLAMP6 (AXON INSTRUMENTS, Foster City), mientras que para el análisis de las corrientes se utilizó la suite pCLAMP8 (AXON INSTRUMENTS, Foster City). En la etapa final de este trabajo se ocupó una tarjeta de adquisición NI-1690 (NATIONAL INSTRUMENTS, Austin) conectada a un puerto PCI del computador de registro. Esta tarjeta está unida a una caja adaptadora de cables BNC modelo BNC-2120 (NATIONAL INSTRUMENTS, Austin), la cual es usada para conectar los cables de entrada/salida de señales. Para la adquisición con esta tarjeta se utilizó un programa desarrollado en nuestro laboratorio, utilizando el software de desarrollo gráfico LabView (NATIONAL INSTRUMENTS, Austin).

La corriente fue filtrada en un filtro Bessel pasa-bajos de 8 polos (FREQUENCY DEVICES, Haverhill), a un quinto de la frecuencia de adquisición, según el teorema de Nyquist (Smith, 1997). Se monitoreó la corriente usando un osciloscopio de 20 MHz de frecuencia (HUNG CHANG, Seúl) previamente filtrada por el filtro de 8 polos.

4 Adquisición y análisis

4.1 Curvas de activación

Los canales se mantuvieron a un potencial de -70 mV. Los protocolos de activación consistieron en un pre-pulso de -140 mV durante 100 ms, seguido de pulsos sucesivos en el intervalo ± 200 mV durante 100 ms, con incrementos de 5-10 mV, luego el potencial retorna a -70 mV. La elección y duración del pre-pulso fue hecha para cerrar los canales a todas las concentraciones de calcio usadas. Así al activarse por el pulso de prueba los canales parten desde los estados cerrados, lo que permite calcular las constantes de tiempo de activación como se verá más adelante. El tiempo entre el comienzo de cada pulso fue de 1 s. La elección del potencial de mantención a -70 mV fue debido a que a este potencial los canales se encuentran cerrados en un amplio rango de concentraciones de calcio, y debido a que es un voltaje adecuado para registrar las corrientes de cola. La intensidad de la corriente se registró desde 50 ms antes del pre-pulso, hasta 50 ms después de vuelto al potencial de mantención. En el pulso de cola se libera de manera instantánea el bloqueo que sufre este canal en el estado estacionario (Cox y col., 1997b). Para obtener la curva de activación expresamos la corriente macroscópica (I) como

$$I = gNP_o(V - V_i)$$

donde g es la conductancia unitaria de los canales, N es el número de canales, P_o es la probabilidad de encontrar el canal abierto, V es el potencial y V_i el potencial de inversión de la corriente. Si hacemos la razón I/I_{\max} siendo I_{\max} la corriente máxima, entonces tenemos

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{gNPO(V - V_i)}{gNPO_{\max}(V - V_i)}$$

Ya que los valores de g , N , y V_i se mantienen constantes al cambiar el potencial de membrana y la corriente de cola se registra al mismo potencial, tenemos que:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{PO}{PO_{\max}} \text{ y como } gNPO = G, \text{ tenemos también que } \frac{I}{I_{\max}} = \frac{G}{G_{\max}}$$

Entonces el pico de la corriente de cola es una representación de la conductancia alcanzada por los canales durante el potencial de prueba y nos permite obtener inmediatamente la curva de activación. Se registró la corriente de cola 150 μ s después de terminado el pulso de prueba, y se graficó en función del potencial de pulso de prueba. Estos valores de corriente se ajustaron a una distribución de Boltzmann

$$I(V) = I^{\max} / (1 + \exp(-zF(V - V_{0.5})/RT))$$

donde $I(V)$ es la corriente de cola a los 150 μ s después del cambio de potencial, I_{\max} es la corriente de cola máxima medida a los 150 μ s, F es la constante de Faraday (96500 Coulomb/mol), R la constante universal de los gases (8,314 Joule/ $^{\circ}$ K mol) y T es la temperatura absoluta, V es el potencial de la membrana. Los experimentos se realizaron a 296 $^{\circ}$ K. El ajuste de esta ecuación a los datos experimentales entrega los valores de $V_{0.5}$ que es voltaje al cual se obtiene la mitad de la activación de los canales y z que es una medida de la sensibilidad de la activación por voltaje. Esta función es una buena descripción de los resultados en un intervalo de valores de 0.1 a 1 de I/I_{\max} y se usó porque dio un buen ajuste de los datos para los valores experimentales obtenidos. Se dio igual peso estadístico a todos los puntos de la curva.

4.2 *Ajuste a un modelo de activación alostérica*

4.2.1 *Ajuste de curvas G-V*

En este trabajo se utilizó un modelo cinético en que tanto el calcio como el potencial actúan como efectores alostéricos para la apertura del canal, tal como se describió en la Introducción (Horrigan y Aldrich, 2002). Debido a que la dispersión del punto medio de las curvas G-V para este canal es muy grande (≤ 30 mV), las curvas fueron desplazadas en el eje del potencial lo necesario para que todas coincidan en su $V_{0.5}$ con el fin de preservar la forma de dichas curvas. Para esto se calculó un valor promedio de $V_{0.5}$ ($\langle V_{0.5} \rangle$) y se desplazó cada curva en un $\Delta V = V_{0.5} - \langle V_{0.5} \rangle$. Luego se efectuó una reducción de puntos, dejando un punto cada 4 mV usando la función Smooth de Sigmaplot (SPSS, Chicago). El número de curvas G-V utilizado para cada concentración de calcio fue entre 3 y 10. Las curvas G-V a varias concentraciones de calcio fueron ajustadas simultáneamente a la ecuación 2, con las siguientes restricciones: $z_j < 0.8e$, $0 < L_0 < 1 \times 10^{-3}$, $50 < V_j < 160$ mV, $K_d < 1 \times 10^{-4}$, C y D y E < 35 . Los valores de z_1 y E se hicieron variar en ajustes preliminares, pero luego se mantuvieron constantes en $z_1 = 0.35e$ y $E = 1$. El valor de z_1 fue determinado con mayor precisión en nuestro laboratorio, y es cercano a 0.3 determinado por Horrigan y Aldrich (Horrigan y Aldrich, 2002). Este valor no varió para el ajuste de canales $\alpha + \beta 1$ (Orio y Latorre, 2005), y tampoco se alejó mucho de este valor al dejarlo como parámetro libre en los ajustes de cada una de series de datos. El valor de E para todos los canales estudiados fue muy

cercano a 1, y se vio que al dejarlo como parámetro fijo se disminuía mucho el error en la determinación de parámetros como V_j .

4.2.2 Ajuste de curvas $V_{0.5}-Ca^{2+}$

Ya que no existe una relación explícita de la curva $V_{0.5}-Ca^{2+}$ para este modelo cinético, se utilizó un método numérico basado en los resultados de los ajustes a las curvas G-V. La probabilidad de encontrar el canal abierto en el modelo de activación alostérica puede escribirse en una forma más simplificada según la siguiente ecuación (Cui y Aldrich, 2000):

$$P_o = \frac{1}{1 + \exp(\Delta G_{V,Ca} / kT)} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde $\Delta G_{V,Ca}$ es la diferencia de la energía libre del estado cerrado-abierto y es dependiente de la concentración de calcio intracelular y del potencial eléctrico, k es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. Estos autores mostraron experimentalmente que $\Delta G_{V,Ca}$ se puede dividir en dos energías aditivas

$$\Delta G_{V,Ca} = \Delta G_V + \Delta G_{Ca} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde ΔG_V es el cambio de energía libre asociado al movimiento de los sensores de potencial entre los estados abierto y cerrado, y ΔG_{Ca} es el cambio de energía libre resultante de la unión de iones calcio sobre la apertura del canal. Que esta relación sea aditiva implica que $E=1$, o sea no hay interacción entre la unión de calcio y la activación de los sensores de potencial (Horrigan y Aldrich, 2002). Escribiendo explícitamente

ambos términos para la condición de no interacción de los sensores con la unión de calcio ($E=1$) tenemos:

$$\Delta G_V = kT \ln \left\{ \frac{1}{L(V)} \left(\frac{1+J(V)}{1+DJ(V)} \right)^4 \right\} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\Delta G_{Ca} = 4kT \ln \left\{ \frac{1 + \frac{[Ca^{2+}]}{Kd}}{1 + \frac{C[Ca^{2+}]}{Kd}} \right\} \quad \text{Ecuación 6}$$

en que

$$J(V) = \exp(z_j(V - V_j) / kT) \quad \text{y} \quad L(V) = L(0) \exp(z_l V / kT)$$

donde z_j son las cargas elementales asociadas al movimiento de los sensores de potencial, V_j es el voltaje al cual se han movido la mitad de los sensores de potencial, L_0 es la constante de equilibrio del proceso de apertura en ausencia de calcio y con los sensores de potencial no activados, z_l son las cargas electrónicas asociadas a la apertura del canal. El ajuste numérico se llevó a cabo igualando a cero la ecuación 4, lo cual ocurre cuando $G/G_{\max}=0.5$. Se tomaron valores de $V_{0.5}$ y de calcio que cubrieran el rango de calcio entre 10^{-9} y 10^{-4} M y se calcularon los valores de ΔG_V y ΔG_{Ca} para cada concentración a partir de los valores de z_j , z_l , V_j , L_0 , Kd , C y D obtenidos del ajuste de las curvas $G-V$. Este cálculo se hizo buscando el valor de voltaje para cada concentración de calcio tal que satisfaga la condición $\Delta G_V + \Delta G_{Ca} = 0$. Se utilizó la rutina Solver de Microsoft Excell (Microsoft, Redmond).

4.3 **Cinéticas de activación**

Para obtener las cinéticas de activación se usaron los mismos protocolos de pulso descritos en la sección anterior. La frecuencia de adquisición fue 40 KHz, y la frecuencia de corte del filtro fue de 8 KHz. El curso temporal de la corriente fue ajustado a un crecimiento exponencial simple, usando la siguiente ecuación:

$$I = I_{\max} (1 - \exp(-t/\tau_{act})) \quad \text{Ecuación 7}$$

donde I_{\max} corresponde a la corriente en el estado estacionario y τ_{act} es la constante de tiempo de activación. Los valores de τ_{act} fueron graficados en función del potencial, y se hizo un ajuste a la ecuación

$$\tau_{act} = A_0 \exp(-z_{act} FV / RT) \quad \text{Ecuación 8}$$

donde A_0 corresponde a la constante de activación a cero potencial, z_{act} es una medida de la dependencia de potencial de la activación, R , T y F tienen sus significados habituales.

4.4 **Cinéticas de desactivación.**

A partir de un potencial de mantención de -70 mV, los parches se despolarizaron a 150 mV durante 100 ms, para activar a los canales presentes. A este voltaje los canales tienen una P_o alta a las concentraciones de sobre calcio 1 μ M. Luego el voltaje se cambio a un nuevo valor entre -200 a 0 mV en pasos de 10 mV durante 50 ms, para volver al potencial de mantención. Como en el caso anterior, el tiempo entre pulsos fue de 1 s. La frecuencia de adquisición para canales que contiene subunidades β fue 20

KHz, y la frecuencia de corte del filtro fue de 4 KHz. Para canales que tienen sólo subunidades α , la frecuencia de adquisición fue 40 KHz, y la de corte fue 8 kHz. El curso temporal de la corriente fue ajustado a un decaimiento exponencial simple, usando la ecuación 9:

$$I = I_{\max} (\exp(-t / \tau_{des})) \quad \text{Ecuación 9}$$

donde I_{\max} es la corriente a tiempo cero, y τ_{des} , es la constante de tiempo de desactivación. Los valores de τ_{des} fueron graficados en función del potencial, y se hizo un ajuste a la ecuación

$$\tau_{des} = B_0 \exp(z_{des} FV / RT) \quad \text{Ecuación 10}$$

donde B_0 corresponde a la constante de desactivación a cero potencial, z_{des} es una medida de la dependencia de potencial de la desactivación, R, T y F tienen sus significados habituales.

4.5 **Conducción de canal abierto.**

Para determinar las propiedades de conducción del canal abierto se usó protocolos de pulsos similares a los utilizados para la desactivación. Desde el potencial de mantención de -70 mV, se dio un pulso de +150 mV durante 100 ms. Luego se dieron pulsos entre -200 a +150 mV, por 50 ms, para posteriormente retornar al potencial de mantención. El tiempo entre el comienzo de cada pulso fue de 1 s. Se graficó la corriente isócrona 100 μ s después del cambio de potencial, que llamaremos corriente instantánea, en función del voltaje aplicado. La magnitud de la corriente isócrona instantánea es

representativa de la conducción a través del canal abierto a cada voltaje. Así, si existe una rectificación intrínseca del canal, esta se debería reflejar como un comportamiento no lineal al graficar la corriente instantánea en función del voltaje del pulso de prueba..

4.6 *Inactivación*

Para obtener las curvas de activación e inactivación de estado estacionario de canales con la subunidad $\beta 1\Delta\text{Loop}$ se aplicaron protocolos de doble pulso (Hodgkin y Huxley, 1952a). Desde un potencial de -70 mV se dieron pulsos de -100 mV durante 100 ms para cerrar los canales, seguido por potenciales en el intervalo de ± 200 mV por 100 ms. Este tiempo es suficiente para activar e inactivar los canales. Luego se aplicó un pulso de +150 mV durante 50 ms, con el objetivo de activar los canales no inactivados en el pulso anterior. La corriente del primer pico es proporcional a la activación de los canales, mientras la del segundo pico es un reflejo del número de canales no inactivados durante el pulso anterior.

A partir del valor de la corriente del primer pico a cada potencial, se calculó la conductancia a cada voltaje según la ecuación 6:

$$G = I_{\text{pico}} / (V - V_i) \quad \text{Ecuación 11}$$

donde I_{pico} es el valor de la corriente de pico, V es el potencial aplicado, y V_i es el potencial de reversión de la corriente, que siempre fue muy cercano a 0 mV debido a que se usaron soluciones simétricas de potasio. La conductancia se ajustó a una distribución de Boltzmann

$$G_{pico} = \frac{G_{max,pico}}{1 + e^{-zF(V-V_{0.5})/RT}} \quad \text{Ecuación 12}$$

donde G_{max} es la conductancia máxima, z son las cargas electrónicas elementales asociadas al proceso de activación, $V_{0.5}$ es el voltaje al cual ocurre la mitad de la G_{pico} , R , T y F tiene sus valores habituales.

Para obtener la curva de inactivación del estado estacionario, se ajustaron los datos de corriente del segundo pico en función del voltaje, usando una distribución de Boltzmann (ecuación 7):

$$I = \left(\frac{I_{max}}{1 + e^{-z_{ina}F(V-V_{0.5,ina})/RT}} \right) \quad \text{Ecuación 13}$$

en la cual I_{max} es la corriente máxima, es decir cuando los canales no están inactivados, z_{ina} es una medida del efecto del potencial sobre el proceso de inactivación, $V_{0.5,ina}$ es el voltaje al cual ocurre la mitad de la $G_{max,pico}$, R , T y F tienen sus valores habituales.

5 Análisis Estadístico.

Para determinar si los valores de $V_{0.5}$ y z para cada una de los tipos de canales estudiados eran diferentes al wt, se realizó un test de Student no paramétrico de dos colas. Este test nos permite conocer si la varianza y la media de dos poblaciones de distinto tamaño son diferentes. El intervalo de confianza fue del 95%, es decir, con un error del 5% ($p < 0.05$). Se utilizó el programa GraphPad Prism4 (GraphPad Software Inc., San Diego).

RESULTADOS

En las primeras tres secciones de este trabajo se mostrará que cambios en la estructura de la región extracelular de la subunidad $\beta 1$ afectan la modulación que esta subunidad confiere al canal. En la cuarta sección se muestra que la expresión funcional de $\beta 1$ es dependiente de la integridad de la región extracelular. Posteriormente se muestra el dramático efecto sobre la actividad del canal al eliminar la región extracelular. En la última sección se explora la existencia de regiones relacionadas con los efectos moduladores de las subunidades β sobre la actividad del canal BK.

1 Mutantes puntuales en el lazo de $\beta 1$.

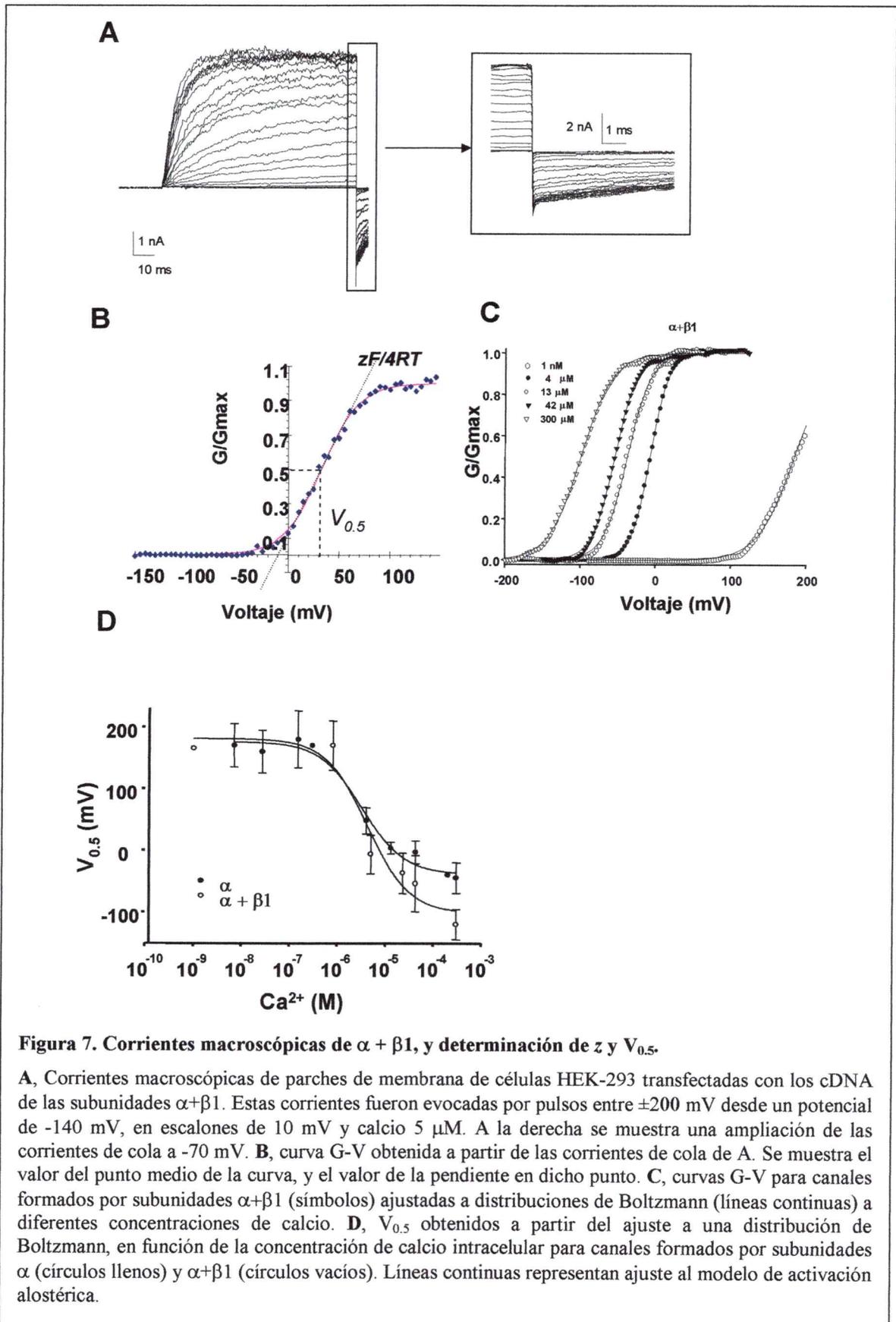
Al mutar cada una de las cisteínas por alanina en la región extracelular de la subunidad $\beta 1$ se pierde al menos un puente disulfuro y se disminuye la afinidad por CTX, lo que se ha interpretado como un cambio en la estructura de la región extracelular cercana a la vía de conducción (Hanner y col., 1998). Para evaluar cómo este supuesto cambio de la estructura de la subunidad $\beta 1$ afecta el comportamiento del canal, se co-expresaron mutantes de cisteína por alanina junto a la subunidad α en células HEK293.

Los mutantes puntuales de $\beta 1$ de bovino C53A, C76A, C103A y C135A (Figura 9A) están contruidos sobre la mutación C18A, una cisteína del primer segmento de transmembrana (TM1). Esta mutación se realizó con el propósito de eliminar la posible participación del residuo C18, y sólo estudiar la contribución de las cisteínas localizadas en la región extracelular. El mutante C18A confiere propiedades indistinguibles de las otorgadas por $\beta 1$ *wt*, por lo que de aquí en adelante se usó esta mutante como referencia.

1.1 **Activación por calcio y potencial.**

Los cDNAs de las subunidades $\beta 1$ mutantes fueron co-transfectados junto a la subunidad conductora (α) de manera transitoria en la línea celular HEK 293, en las que se realizaron registros de patch-clamp en modalidad "inside-out" (ver Métodos). La aplicación de pulsos de voltaje entre ± 200 mV resultó en la aparición de corrientes dependientes de tiempo y voltaje (Figura 8A). Este canal sufre un bloqueo durante el estado estacionario (Diaz y col., 1996), el cual afecta la medición de la conductancia. Para eliminar este efecto se registraron corrientes de cola a -70 mV (Cox y col., 1997b). Estas corrientes fueron ajustadas a una ecuación de Boltzmann (ecuación 1), de la que se obtuvo los parámetros $V_{0.5}$ (punto medio de la curva) y z (medida de la dependencia de potencial) (Figura 8B). La pendiente de la curva en el punto medio ($V_{0.5}$) es $\frac{zF}{4RT}$ como puede verse en la Figura 8B.

Como se dijo anteriormente, una forma de representar la dependencia de calcio de BK consiste en graficar los valores de $V_{0.5}$ en función de la concentración de calcio intracelular. Con el fin de analizar más detenidamente el efecto de los mutantes sobre la sensibilidad aparente por calcio, se analizaron valores de $V_{0.5}$ y z a varias concentraciones intracelulares de calcio (Figura 8C).



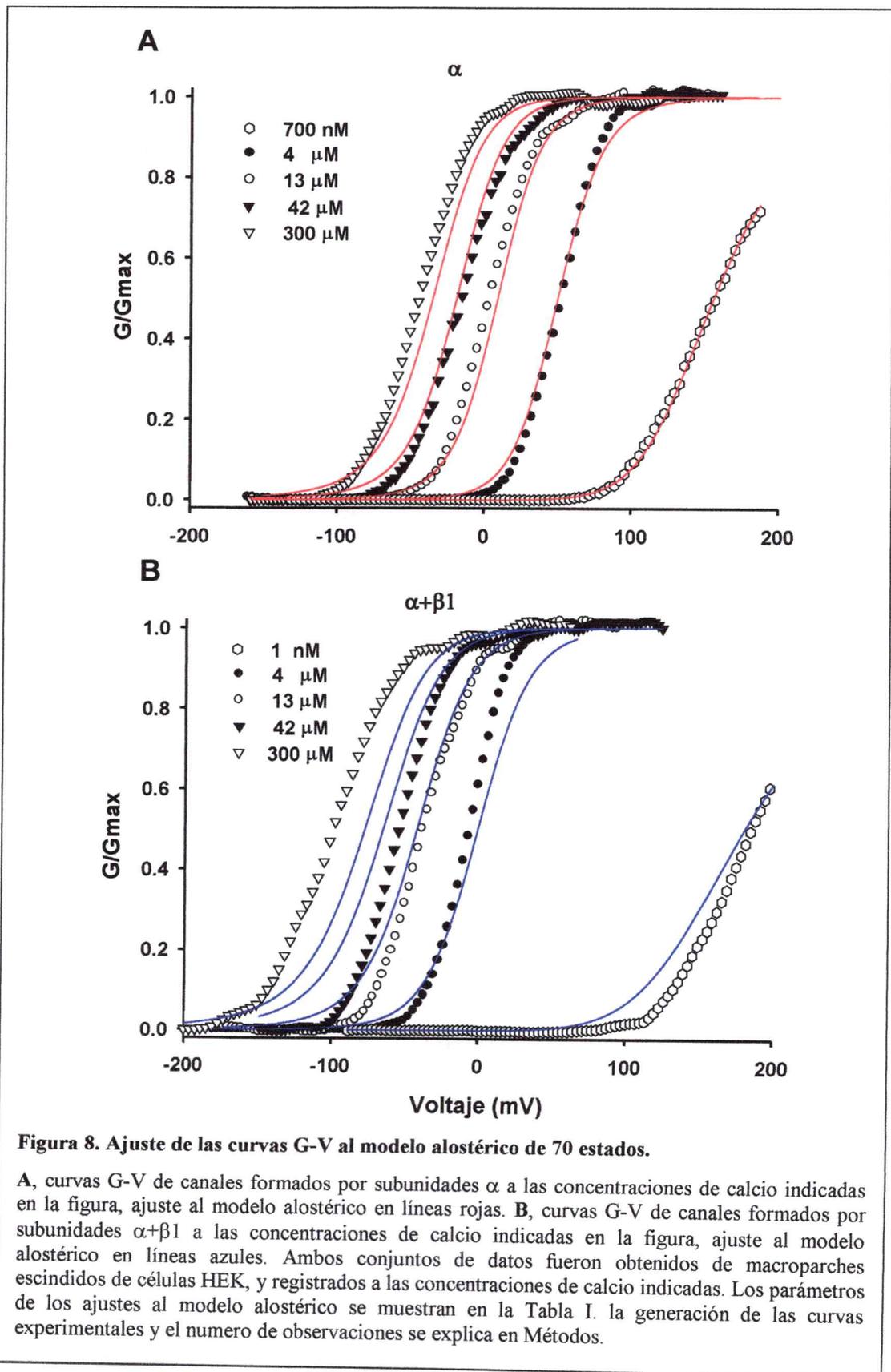
Activación de canales α y $\alpha+\beta 1$

El efecto de la subunidad $\beta 1$ sobre la activación del canal BK consiste en desplazar las curvas de activación hacia potenciales más negativos (Figura 8A-B). Esto se refleja en un mayor desplazamiento de los $V_{0.5}$ en función de la concentración de calcio (Figura 8C). Este mayor desplazamiento ha sido interpretado como un aumento de la afinidad aparente del canal por calcio.

Las curvas G-V a varias concentraciones de calcio fueron ajustadas a la ecuación 2, que da cuenta de la probabilidad de encontrar al canal abierto en función del calcio y de potencial. Debido a la variabilidad intrínseca en los $V_{0.5}$ para este canal, se procedió a desplazar las curvas en el eje del potencial para que coincidan en el promedio ($\langle V_{0.5} \rangle$), como descrito en Métodos. De esta manera se preserva la forma de las curvas, lo cual es importante para el ajuste a la ecuación 2. En los primeros ajustes se dejaron todos los parámetros libres, pero se consiguieron menores valores de R^2 al dejar constante ciertos parámetros. Un parámetro que se dejó constante fue z_1 a 0,35e debido a que fue previamente determinado con mayor precisión (Orio y Latorre, 2005). Al dejar libre este parámetro siempre se llegaba a valores cercanos a éste, lo que implica que la decisión de dejarlo fijo es correcta. Además se puso la restricción $E=1$, lo que implica que no se consideran las interacciones entre el sensor de potencial y la unión de calcio, simplificando el modelo a 50 estados. Esto disminuyó el error en la determinación de otros parámetros como V_j . Al dejar libre el parámetro E, este varió entre 0,99 y 1,1; por

lo que se justifica la decisión de dejarlo fijo. Las curvas G-V y los valores de los parámetros se muestran en la Figura 8 y la Tabla I.

Como descrito anteriormente el efecto de $\beta 1$ con respecto a canales sólo formados por subunidad α es disminuir el valor de V_j y L_0 , y aumentar el valor de la constante alostérica C (Orio y Latorre, 2005). En mi caso las disminuciones fueron de 35 mV para V_j , la mitad para L_0 y un aumento casi al doble en C . El valor de K_d no se modificó, lo que es concordante con la idea de que $\beta 1$ no actúa afectando la afinidad por calcio (Nimigean y Magleby, 2000; Orio y Latorre, 2005).



Activación de canales con subunidades $\beta 1$ mutantes

Para exponer gráficamente como estas mutaciones afectan la sensibilidad aparente del canal por calcio, se graficaron los $V_{0.5}$ en función de la concentración de este divalente (Figura 9). Las líneas sólidas corresponden a curvas teóricas construidas a partir de los valores obtenidos del ajuste al modelo alostérico, como fue explicado en Métodos. Como se dijo en la Introducción, uno de los efectos de la subunidad $\beta 1$ es aumentar el desplazamiento de las curvas de activación hacia potenciales más negativos para cada concentración de calcio sobre 100 nM (Figura 9B). En todos los casos se muestra como línea sólida los ajustes al modelo de 70 estados con las restricciones $E=1$ y $z_1=0,35$ como explicado en Métodos. Una inspección rápida de la Figura 9 muestra que todas las subunidades mutantes permiten al canal ser dependiente de calcio, pero no de la misma manera. Los mutantes C53A, C76A y C103A muestran a bajas concentraciones de calcio ($<10^{-7}$ M) valores de $V_{0.5}$ negativos con respecto a canales formados por subunidades α y $\alpha+\beta 1$ (Figura 9C-E). El mutante C53A presenta valores de $V_{0.5}$ similares a α en el rango micromolar (1-10 μ M) pero luego estos se hacen más negativos y similares a $\alpha+\beta 1$, entre 20-100 μ M (Figura 9C). En el caso de C76A la sensibilidad por calcio es similar a α solo en el intervalo de calcio estudiado (Figura 9D). Para C103A los $V_{0.5}$ a calcio menor que 10^{-7} M son menores a $\alpha+\beta 1$, pero en el rango micromolar se hace similar a α solo (Figura 9E).

El caso de C135A es diferente a los demás ya que las curvas G-V en el rango micromolar se superponen entre si (Figura 10D) así como sus $V_{0.5}$ (Figura 9F). Esto

puede significar que a concentraciones micromolares de calcio ya se alcanzó la saturación del efecto de calcio sobre el sitio de alta afinidad, lo que implicaría un aumento drástico de la afinidad por calcio. El hecho de no tener puntos experimentales a bajas concentraciones de calcio no hace posible tener una visión completa del comportamiento de este mutante. Según el modelo alostérico los valores de $V_{0.5}$ a bajo calcio ($<10^{-8}$ M) estarían cercanos a los 400 mV.

Las curvas G-V de canales que expresan las subunidades $\beta 1$ mutantes también fueron ajustadas al modelo alostérico, usando las mismas restricciones que para el caso de α y $\alpha+\beta 1$. Las curvas se muestran en la Figura 10 y los parámetros están en la Tabla 1. A continuación se discutirán los efectos de los mutantes C53A, C76A y C103A. Estas subunidades aumentaron el valor de V_j casi al doble con respecto a $\beta 1$ *wt*. Los valores de K_d variaron muy poco con respecto a $\alpha+\beta 1$, lo cual implica que no se afectó la sensibilidad por calcio. En el caso de L0 los mutantes mostraron valores cercanos a los conferidos por α , sin embargo estos valores son solo el doble que lo encontrado para $\alpha+\beta 1$ *wt*, lo cual es un cambio menor. La constante alostérica C fue menor que el *wt* para todos los mutantes ($\beta 1$ *wt*=28,7; C53A=21; C76A=8; C103A=3,5) y menor incluso que α (16,3) para C103A. Para la constante alostérica D, cuyo valor fue muy similar para α y $\alpha+\beta 1$ (~18) su aumentó casi al doble (~35) con la expresión de estos mutantes. Para una correcta determinación de los valores de z_j y z_l , deben hacerse determinaciones independientes de ellos, de otra manera dichos valores no son representativos (Horrigan y Aldrich, 2002; Orio y Latorre, 2005). Estos resultados pueden interpretarse pensando

que los mutantes afectaron las constantes alostéricas de la activación (C y D), sin afectar profundamente K_d y L_0 .

El hecho que las curvas G-V de C135A en el rango micromolar se superpongan entre si hace que el ajuste no sea satisfactorio (Figura 10D) y los valores de los parámetros obtenidos del ajuste sean muy diferentes y difíciles de comparar a los determinados para los otros mutantes (Tabla 1). El modelo alostérico no puede dar cuenta de los efectos del mutante C135A, por lo que los valores obtenidos del ajuste no son comparables con los otros mutantes.

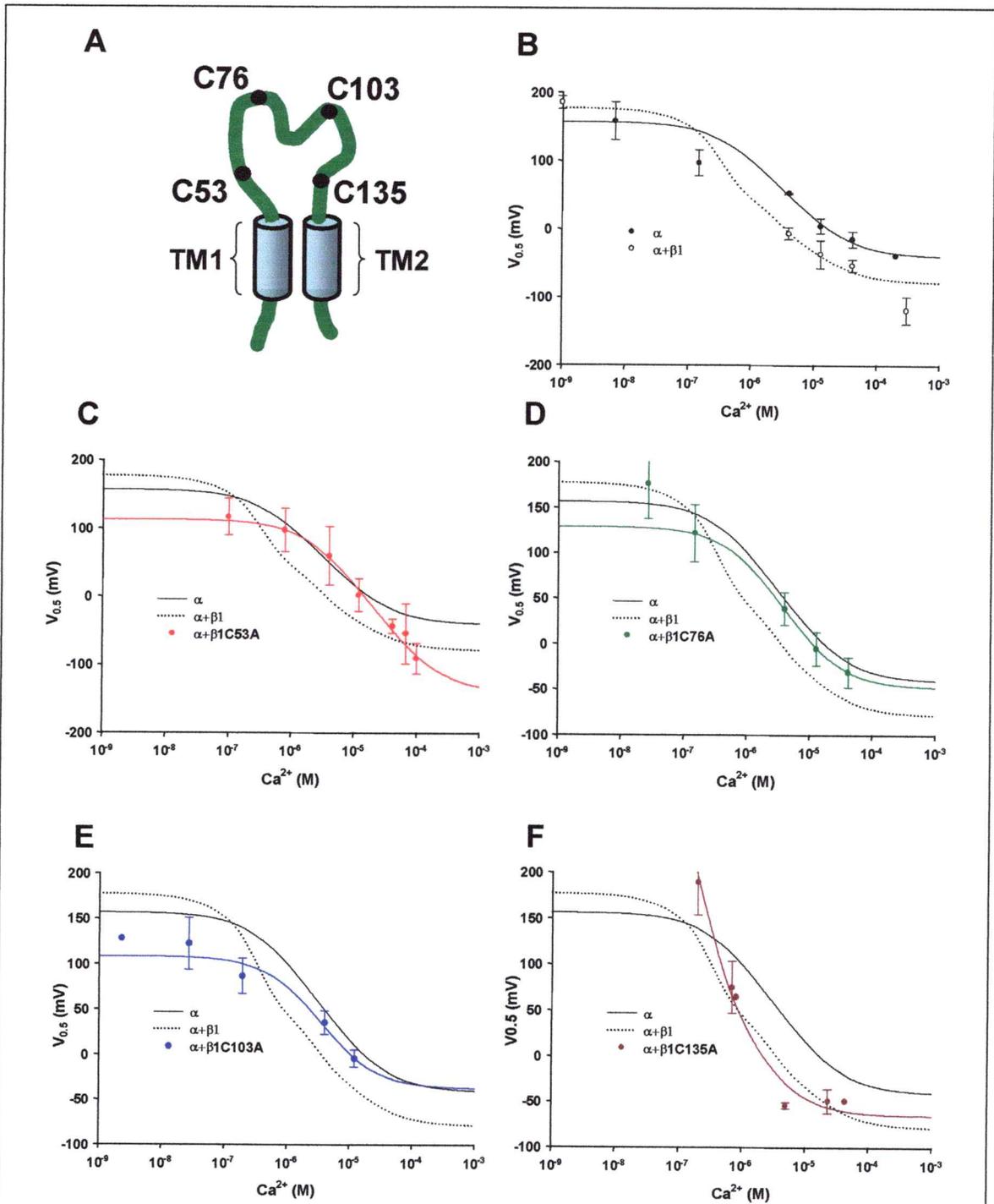


Figura 9. Sensibilidad a calcio conferida por las mutantes puntuales de cisteína.

A, diagrama de la subunidad $\beta 1$ con la posición de las cisteínas extracelulares. **B**, $V_{0.5}$ en función del calcio intracelular para canales formados por α (círculos llenos) y $\alpha + \beta 1$ (círculos vacíos). **C-F**, $V_{0.5}$ en función de calcio para canales formados por $\alpha + \beta 1C53A$ (**C**), $\alpha + \beta 1C76A$ (**D**), $\alpha + \beta 1C103A$ (**E**), y $\alpha + \beta 1C135A$ (**F**). Las líneas corresponden a la tendencia de los datos para canales formados por subunidad α (línea continua) y $\alpha + \beta 1$ (línea discontinua). Las líneas contiguas de color corresponden a ajustes según el modelo alostérico, como explicado en Métodos. Los experimentos se realizaron en células HEK-293, y los puntos experimentales así como sus N se explican en métodos.

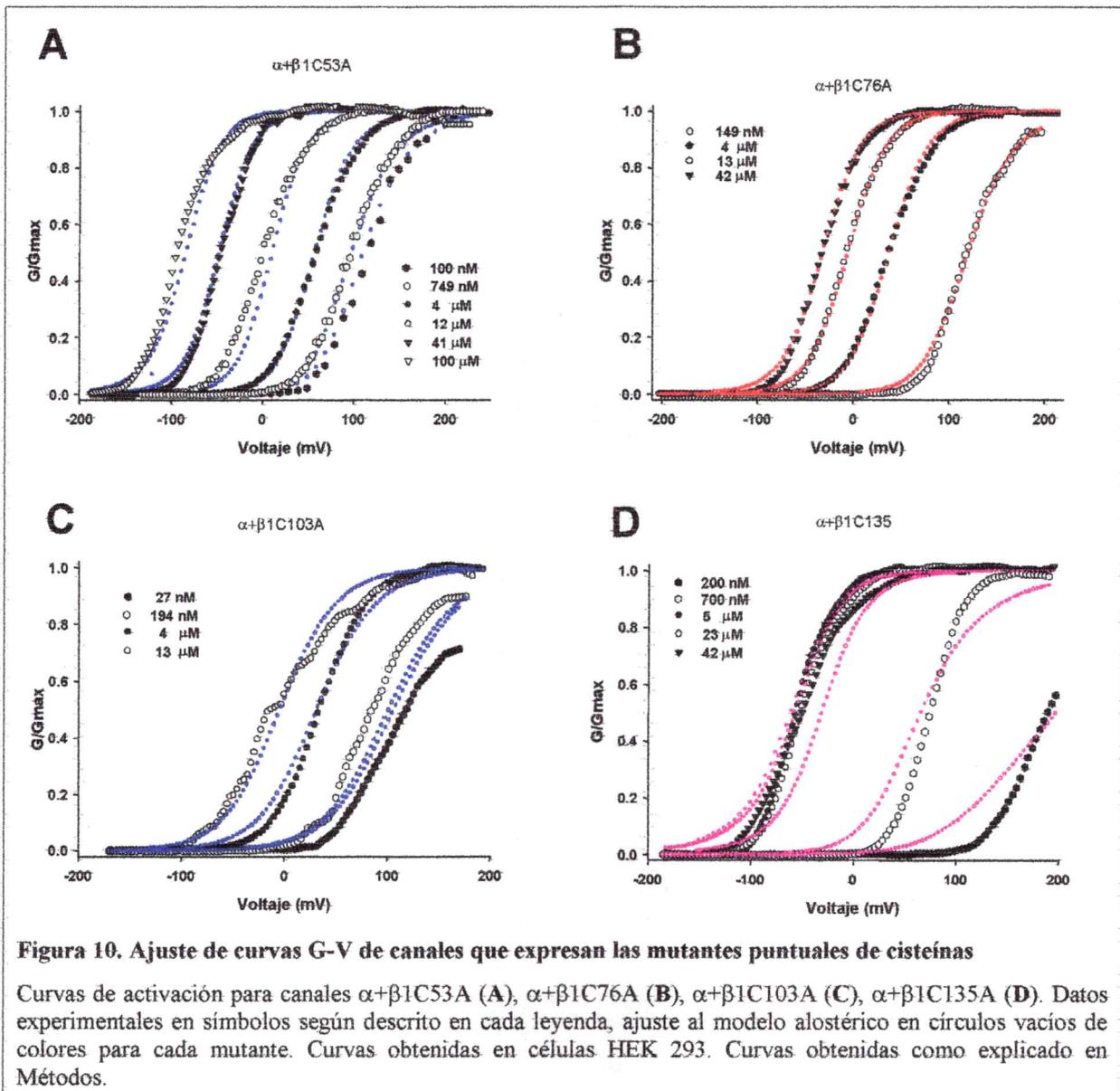


Figura 10. Ajuste de curvas G-V de canales que expresan las mutantes puntuales de cisteínas

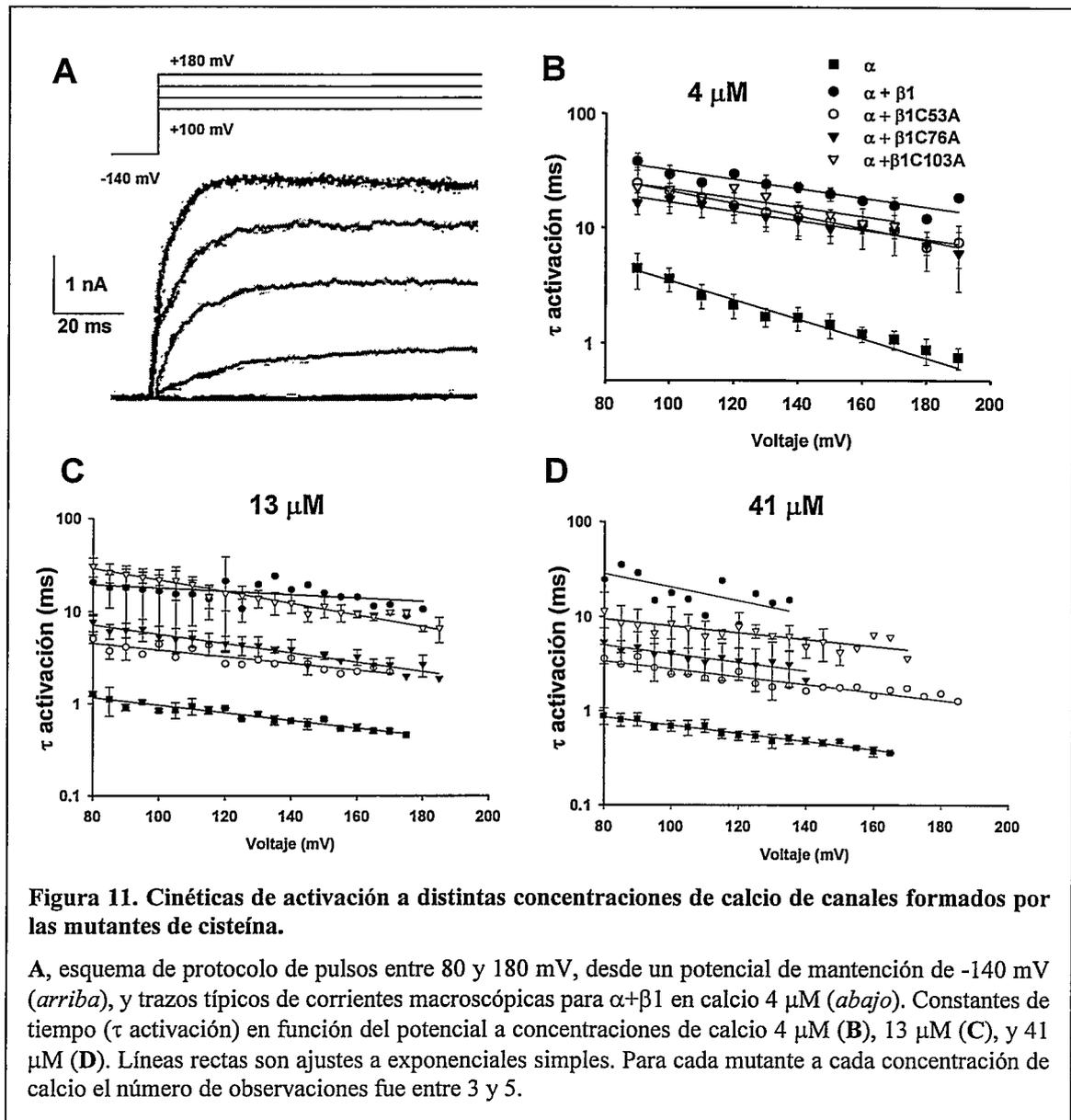
Curvas de activación para canales $\alpha+\beta 1C53A$ (A), $\alpha+\beta 1C76A$ (B), $\alpha+\beta 1C103A$ (C), $\alpha+\beta 1C135A$ (D). Datos experimentales en símbolos según descrito en cada leyenda, ajuste al modelo alostérico en círculos vacíos de colores para cada mutante. Curvas obtenidas en células HEK 293. Curvas obtenidas como explicado en Métodos.

Una alternativa a hacer los ajustes dejando todos los parámetros libres, fue buscar el mínimo número de parámetros que cambiar para cada tipo de canales, que permita reproducir las curvas de activación. Esto fue posible sólo en el caso de C53A, en el que variando V_j , K_d y L_0 se pudo reconstruir las curvas de activación. En los otros casos sólo se obtuvieron buenos ajustes con todos los parámetros libres (bajo las restricciones $z_i=0,35$ y $E=1$). Esto significa que los mutantes puntuales no alteran uno o un conjunto acotado de parámetros, sino alteran todos los parámetros. Esto hace que la interpretación de los resultados del ajuste sea complicada.

1.2 *Cinéticas de activación.*

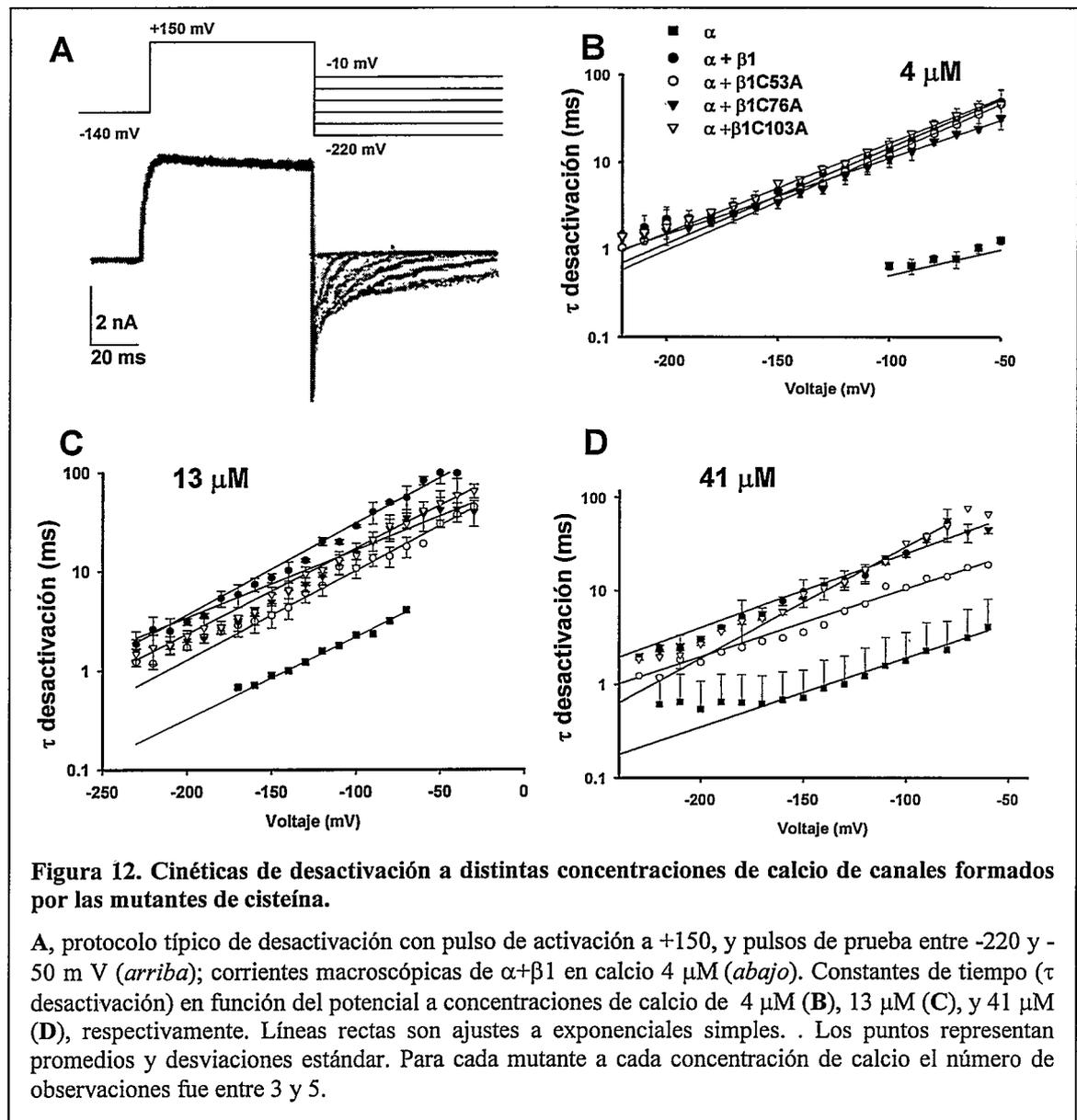
Para estudiar la cinética de activación se aplicó un protocolo de pulsos como el que se muestra en la Figura 12A y se procedió a ajustar el curso temporal de la corriente a una exponencial simple, como se describió en Métodos. Las constantes de tiempo (τ_{act}) que se obtuvieron de esta manera se graficaron en función del potencial (Figura 12B-D). La subunidad $\beta 1$ *wt* hace más lenta la apertura con respecto a canales formados sólo por subunidades α , es decir aumenta en el valor de τ_{act} . El efecto de las subunidades mutantes en calcio 4 μM visto en la curva τ_{act} -V fue similar al de la subunidad *wt* (Figura 12B). En calcio 13 μM existe una dispersión en las curvas τ_{act} -V por parte de las subunidades mutantes, sin embargo aún son distintas a la curva de la subunidad α (Figura 12C). Para calcio 41 μM también ocurre una dispersión, sin embargo las curvas τ_{act} -V son claramente diferentes de a α sola (Figura 12D).

En resumen, las mutaciones efectuadas en la región extracelular de la subunidad $\beta 1$ no suprimen el efecto de $\beta 1$ de aumentar los valores de τ_{act} .



1.3 **Cinéticas de desactivación.**

Para analizar la desactivación de los canales se utilizó protocolos como el de la Figura 13 y explicado en Métodos. Como en el caso anterior, la relajación de la corriente fue ajustada a una exponencial simple cuya constante de tiempo (τ_{des}) se graficó en función del potencial. La Figura 13B-D muestra que el cierre de los canales se hace más rápido a medida que el potencial se hace más negativo. Esto se traduce en una disminución en el valor de τ_{des} al hacer más negativo el potencial. En calcio 4 μM las subunidades mutantes ejercen un efecto similar a la subunidad *wt*, haciendo más lento el cierre con respecto a canales α (Figura 13B). A 13 μM de calcio los mutantes hacen más lento el cierre, de forma similar a la subunidad *wt*, (Figura 13C). Al aumentar la concentración de calcio a 41 μM , las subunidades mutantes mostraron valores de τ_{des} similares al *wt*. (Figura 13D). En las tres concentraciones de calcio probadas, las pendientes de las curvas τ_{des} -V son similares, lo que significa que las mutantes puntuales no afectan la dependencia de potencial del proceso de cierre.



En resumen, mutaciones puntuales de cisteína por alanina en la región extracelular no suprimen el efecto de $\beta 1$ sobre el proceso de desactivación.

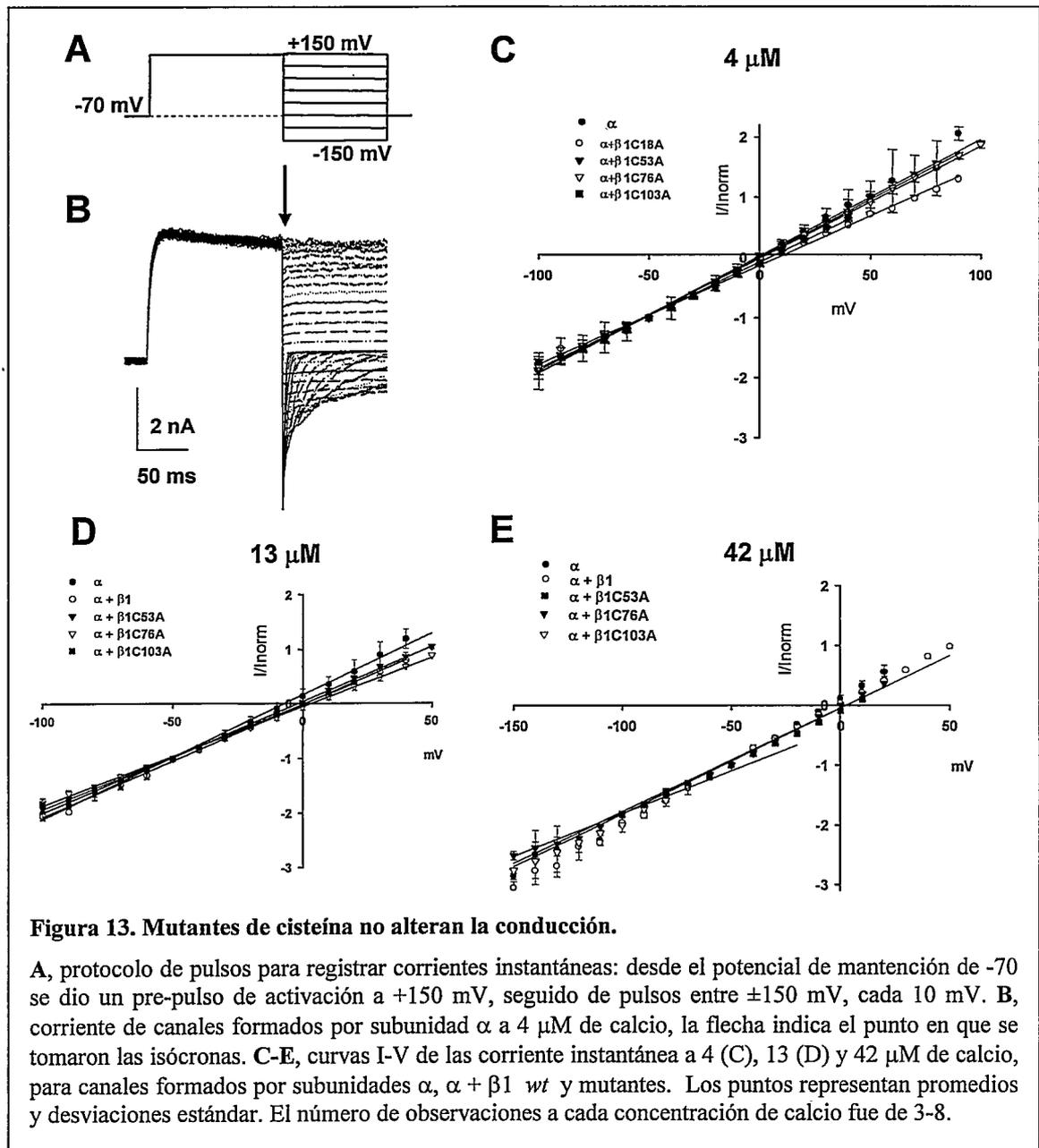


Figura 13. Mutantes de cisteína no alteran la conducción.

A, protocolo de pulsos para registrar corrientes instantáneas: desde el potencial de mantención de -70 se dio un pre-pulso de activación a +150 mV, seguido de pulsos entre ± 150 mV, cada 10 mV. B, corriente de canales formados por subunidad α a 4 μM de calcio, la flecha indica el punto en que se tomaron las isócronas. C-E, curvas I-V de la corriente instantánea a 4 (C), 13 (D) y 42 μM de calcio, para canales formados por subunidades α , $\alpha + \beta 1$ *wt* y mutantes. Los puntos representan promedios y desviaciones estándar. El número de observaciones a cada concentración de calcio fue de 3-8.

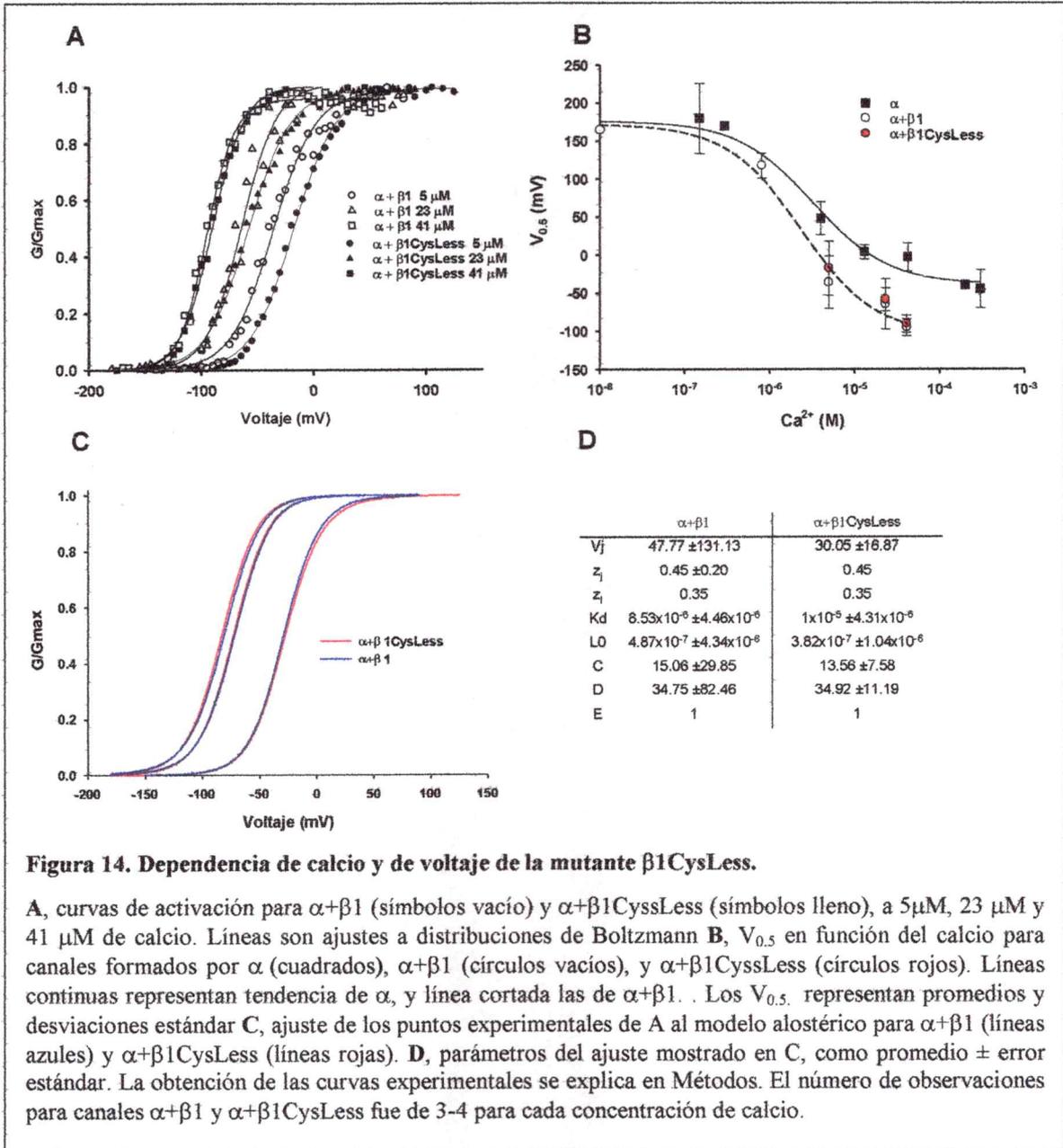
1.4 Conducción.

Ya que algunas subunidades β ($\beta 2$ y $\beta 3$) confieren al canal una rectificación del canal abierto, se quiso saber si estos mutantes alteran la vía de conducción a nivel macroscópico.

Para esto se aplicó protocolos similares a los aplicados para estudiar la desactivación (Figura 13A). Se graficó la corriente isócrona 50 μ s después del cambio de potencial, en función del voltaje aplicado (Figura 13B). Las curvas I-V instantáneas en calcio 4 μ M no muestran rectificación para canales α y $\alpha+\beta 1$, así como tampoco para los mutantes (Figura 13C). A concentraciones de calcio de 13 y 41 μ M tampoco se observó rectificación (Figura 13D-E). Estos resultados implican que la conducción a través del canal no se altera si se modifica la estructura de la región extracelular de la subunidad $\beta 1$.

2 Mutante $\beta 1$ CysLess.

Para continuar investigando el papel de las cisteínas extracelulares, se utilizó una mutante, cuyas cisteínas en la región extracelular han sido reemplazadas por alaninas (C53A/C76A/C103A/C135A, también llamada $\beta 1$ CysLess). Este mutante también está construido sobre la mutación C18A. La co-expresión de este mutante junto a la subunidad α produjo canales con sensibilidades a calcio y voltaje similares a $\beta 1$ *wt*, como se puede ver en la Figura 14A. Al graficar los $V_{0.5}$ a diferentes concentraciones de calcio intracelular, no existen diferencias significativas con la subunidad $\beta 1$ *wt* en la sensibilidad a calcio (Figura 14B). El ajuste de las curvas G-V de $\alpha+\beta 1$ CysLess al modelo alostérico (Figura 14C) arrojó parámetros similares a las obtenidas para $\beta 1$ *wt*. (Figura 14D). El error en la determinación de estos parámetros es bastante grande, especialmente para $\alpha+\beta 1$ *wt*, posiblemente porque se usó un pequeño grupo de curvas G-V.



2.1 Cinética de activación

Para estudiar la cinética de activación de canales $\alpha + \beta 1\text{CysLess}$ se aplicó protocolos de voltaje similares a los descritos anteriormente. A la concentración de 4

μM de calcio las curvas $\tau_{\text{act}}-V$ de $\beta 1\text{CysLess}$ son muy similares a las de $\beta 1 \text{ wt}$ (Figura 15A). A concentraciones de 13 y 42 μM de calcio, a pesar de una dispersión en los datos y una leve tendencia a un aumento, los valores de $\beta 1\text{CysLess}$ no mostraron diferencias con $\beta 1 \text{ wt}$ (Figura 15B-C).

Esto significa que la eliminación de las cisteínas extracelulares no suprimió el efecto de $\beta 1$ sobre el proceso de activación.

2.2 **Cinética de desactivación.**

A las concentraciones de calcio 4 μM , 13 y 41 μM (Figura 15A,B y C) las constantes de tiempo de desactivación fueron similares a $\alpha+\beta 1$, y diferentes a las encontradas para canales formados sólo por la subunidad α . Estos resultados indican que la eliminación de las cisteínas extracelulares no afecta el efecto de $\beta 1$ sobre el proceso de cierre de los canales.

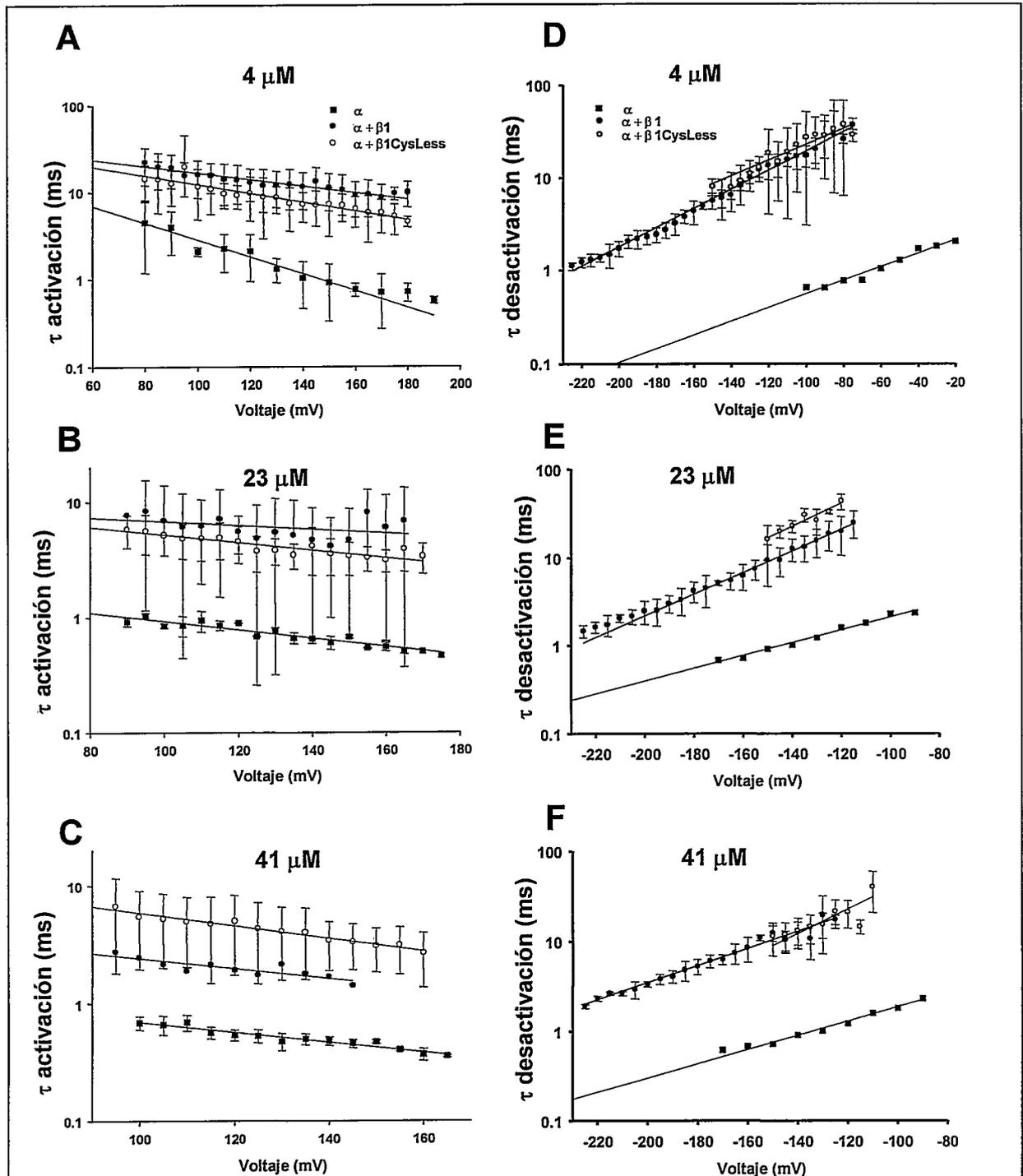
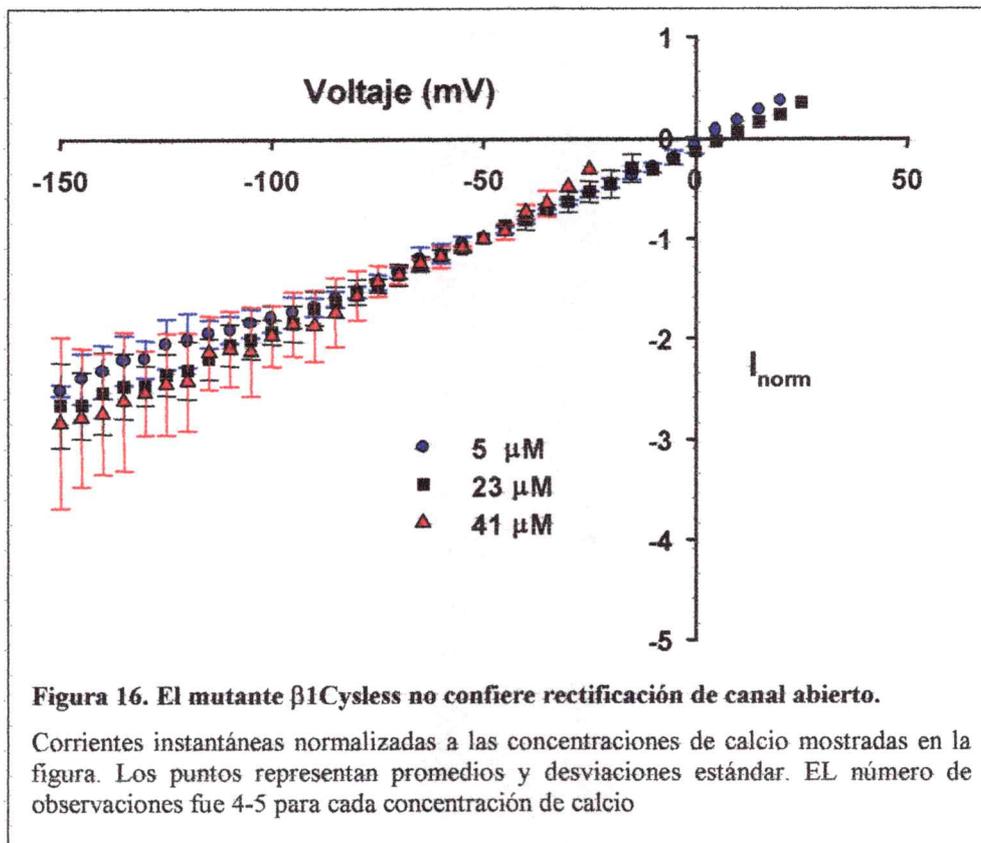


Figura 15. Cinéticas de activación y desactivación de $\alpha + \beta 1\text{CysLess}$.

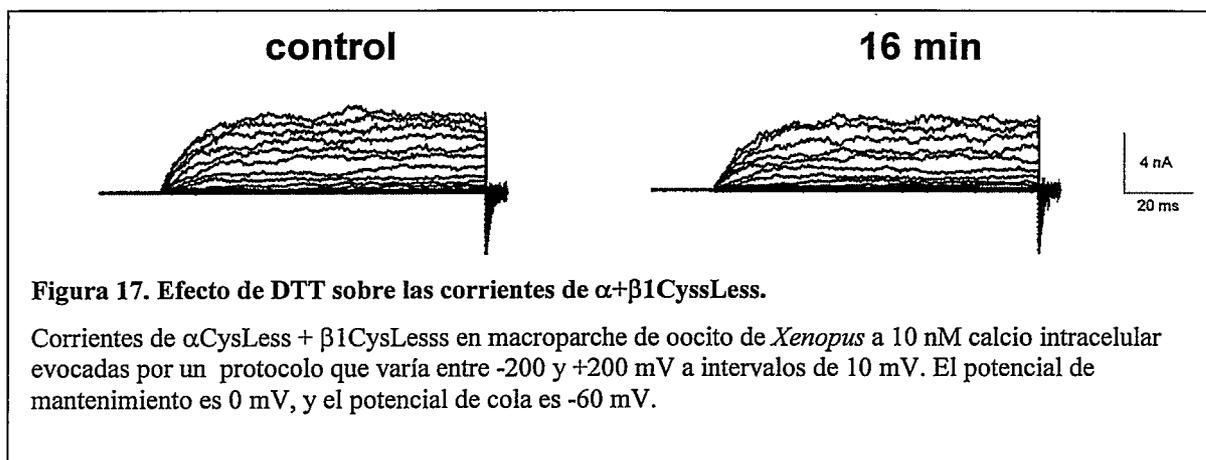
Constantes de tiempo activación a concentraciones de calcio $4 \mu\text{M}$ (A), $23 \mu\text{M}$ (B), y $41 \mu\text{M}$ (C). Constantes de tiempo de desactivación a concentraciones de calcio $4 \mu\text{M}$ (A), $23 \mu\text{M}$ (B), y $41 \mu\text{M}$ (C). Líneas continuas representan el ajuste de los datos a exponenciales simples. Las constantes de tiempo se expresan como promedio con su desviación estándar. Los puntos representan promedios y desviaciones estándar. El número de observaciones para cada concentración de calcio fue de 4-5 para ambos tipos de canales.

2.3 Conductión

Para estudiar si el mutante $\beta 1\text{CysLess}$ confiere rectificación de canal abierto se midieron las corrientes instantáneas de cola, como descrito previamente. La



coexpresión de esta subunidad mutante no produjo rectificación de canal abierto, como puede verse en la linealidad de las curvas de las curvas I-V a varias concentraciones de calcio (Figura 16).

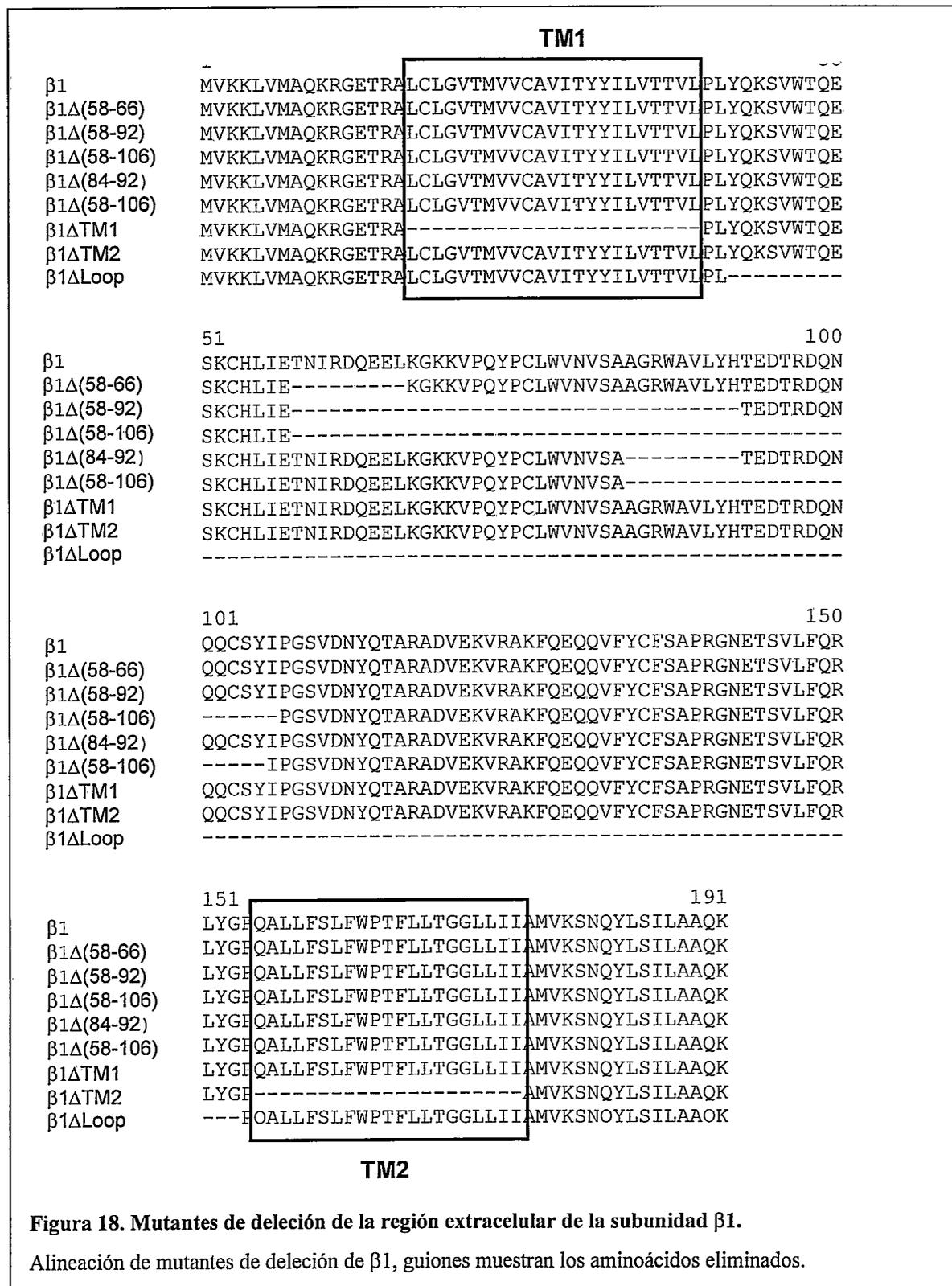


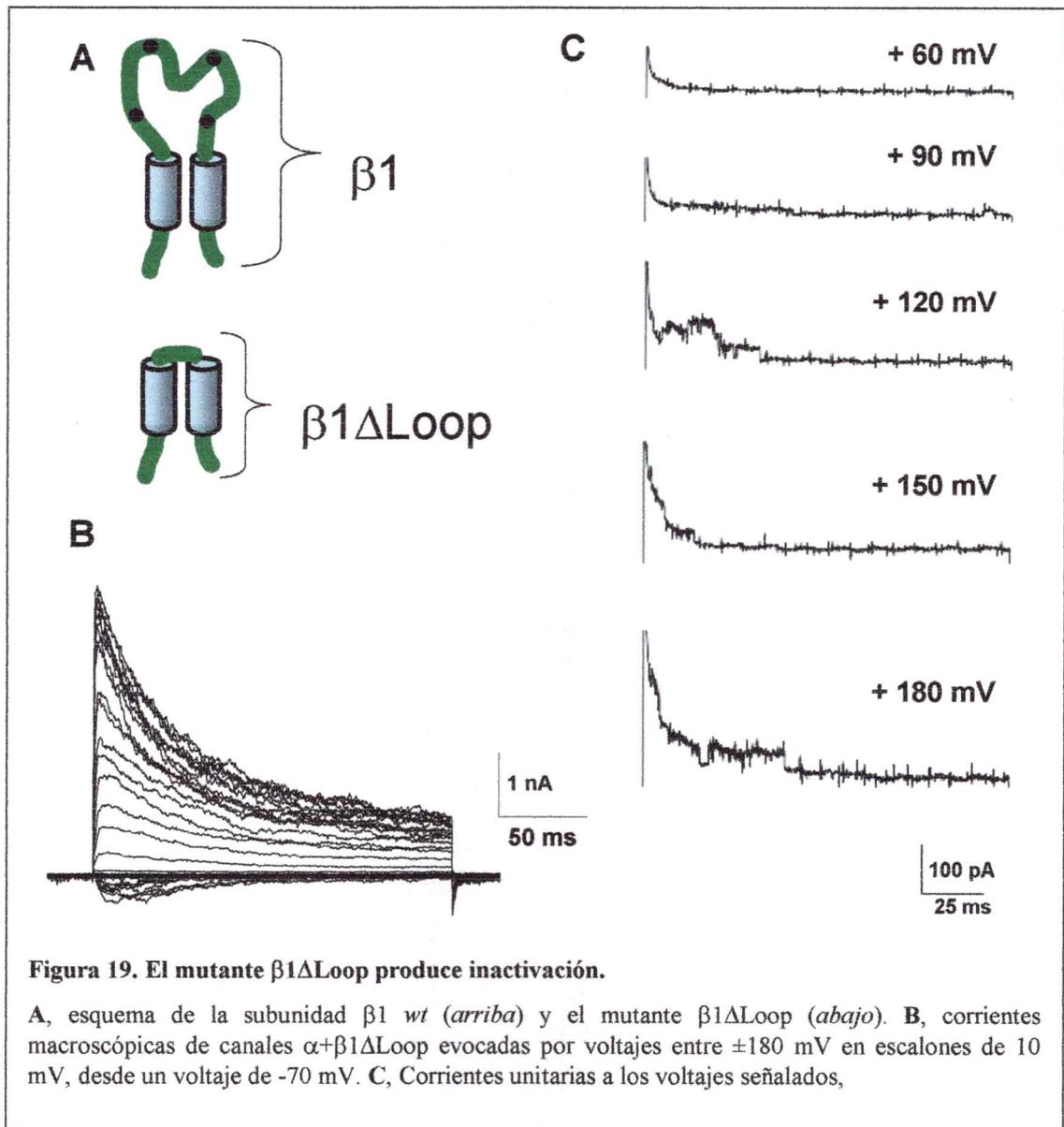
3 Efecto de DTT sobre la actividad de BK.

Se analizó el efecto de la eliminación química de los puentes disulfuro, usando el agente reductor DTT (ditiotreitól). Este reactivo rompe los enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteínas. Se ha reportado previamente que la aplicación de DTT por el medio extracelular a canales formados sólo por la subunidad α no altera su actividad (Tang y col., 2001; Soto y col., 2002). En mis experimentos se utilizó una subunidad α cuyas cisteínas externas fueron reemplazadas por serinas (C14S/C141S/C277S), a la que se llamó α CysLess para tener la certeza de que el DTT no actúe con la subunidad α . El efecto del DTT se registró en parches escindidos en modalidad “outside-out” que expresaron α CysLess+ β 1. Estos parches fueron expuestos a DTT 2 mM por el lado extracelular. Dicho tratamiento no produjo cambios en la cinética ni en la magnitud de la corriente medida 16 minutos de la adición del DTT (Figura 17).

4 Deleciones parciales de $\beta 1$.

Para seguir estudiando el papel de la región extracelular de la subunidad $\beta 1$, se construyeron diferentes mutantes a las cuales se les suprimió segmentos de membrana o partes del lazo extracelular (Figura 18). Estos mutantes fueron construidos mediante PCR, usando partidores que flanquearon las regiones a eliminar (uno a cada lado), amplificando el plasmido completo (descrito en Gonzalez y col., 2000). La expresión de las mutantes de supresión junto a la subunidad α produjo corrientes macroscópicas similares a las observadas para canales compuestos sólo por subunidades α , con la única excepción del mutante $\beta 1\Delta(42-153)$ (llamado $\beta 1\Delta\text{Loop}$), que se discutirá en la siguiente sección. Esto puede deberse a que estos mutantes no interactúan física o funcionalmente con la subunidad α , o que estas mutantes no se expresan. Esto implica que la integridad de la región extracelular es fundamental para el efecto modulador de esta subunidad.





5 El mutante $\beta 1\Delta\text{Loop}$.

El mutante $\beta 1\Delta\text{Loop}$ (Figura 19A) posee sólo cuatro residuos entre los segmentos de membrana. Estos residuos son prolina y leucina contiguos a TM1, y prolina y glutamina contiguos a TM2, respectivamente. Al expresar esta mutante junto a

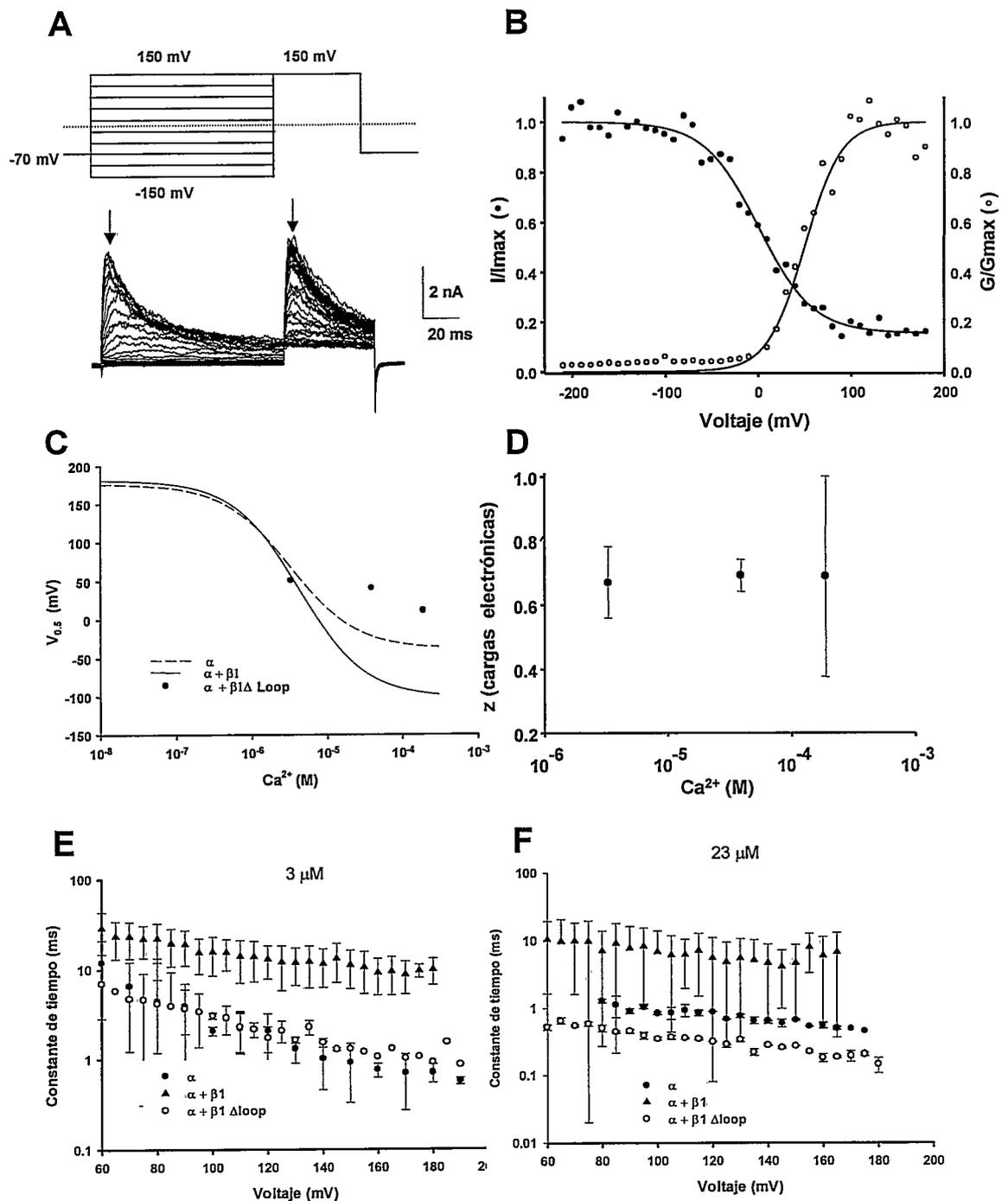


Figura 20. Activación de $\alpha + \beta 1 \Delta Loop$

A, protocolo de dos pulsos (*arriba*) que evoca corrientes macroscópicas (*abajo*) para canales $\alpha + \beta 1 \Delta Loop$. Las flechas indican el tiempo en que se determinó las isócronas para la activación e inactivación, respectivamente B, curvas de conductancia normalizada (círculos vacíos) y de inactivación (círculos llenos), obtenidas a partir de las corrientes que se muestran en A. C, Valores de $V_{0.5}$ de activación en función de calcio, expresados como promedios y desviación estándar. D, valores de z de activación en función del calcio. E, constantes de tiempo de activación a 3 μM de calcio. F, constantes de tiempo de activación a 23 μM de calcio intracelular. Los valores de C-E se muestran como promedio y desviación estándar, el número de observaciones a cada concentración de calcio fue de 3-6.

la subunidad α , se observó una corriente de potasio que presenta inactivación, tanto a nivel de corrientes macroscópicas como de canal único (Figura 19B-C).

5.1 **Activación del canal formado por $\alpha+\beta 1\Delta$ Loop.**

Para estudiar la dependencia de potencial de la activación y la inactivación de los canales $\alpha+\beta 1\Delta$ Loop se aplicó protocolos de dos pulsos (Hodgkin y Huxley, 1952a), de los cuales se extrajo las curvas de activación e inactivación (Figura 20A-B). Estos protocolos consisten de pulsos entre ± 150 mV en escalones 10 mV lo suficientemente largos para activar y luego inactivar a los canales. Finalmente se aplicó un pulso de prueba a +150 mV para activar los canales que no sufrieron inactivación luego del primer pulso (Figura 20A). A partir de los picos de las corrientes evocadas por el primer pulso (flecha de la izquierda en Figura 20A) se calculó la conductancia pico a cada potencial. Las curvas de activación se construyeron graficando la conductancia pico normalizada a su valor máximo (G/G_{max}) en función del voltaje. La obtención de las curvas de inactivación se discutirá en la siguiente sección.

Al aumentar la concentración de calcio intracelular, se observó un desplazamiento de los valores de $V_{0.5}$ de activación hacia potenciales negativos (Figura 20C). Sin embargo, esta dependencia por calcio es mucho menor que la observada para canales formadas por las subunidades α o $\alpha+\beta 1$. Entre calcio 4 y 188 μ M el desplazamiento en el $V_{0.5}$ es de aproximadamente 40 mV para $\alpha+\beta 1\Delta$ Loop, mientras que para α y $\alpha+\beta 1$ estos valores son 100 y 200 mV, respectivamente (Figura 20C y

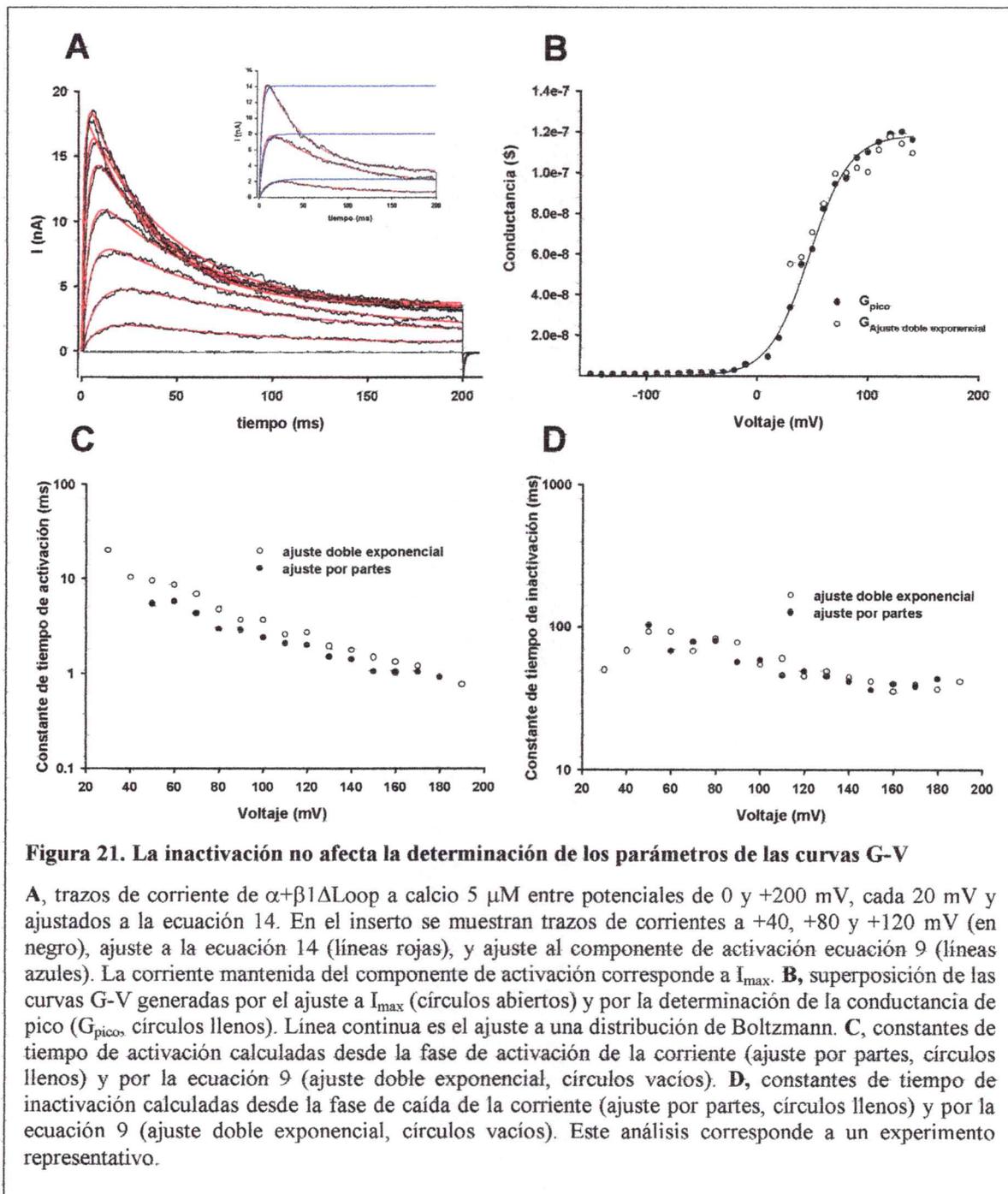
Figura 9B). La dependencia de voltaje de la activación representada por el valor de z obtenido del ajuste a una distribución de Boltzmann, no es afectada por la concentración de calcio ($\sim 0,6$ cargas electrónicas), sin embargo es menor a la reportada para canales α y $\alpha+\beta 1$ (cercaos a 2 y 1,8 cargas electrónicas respectivamente) (Figura 20D). Esto significa que la expresión de este mutante redujo notablemente la sensibilidad a calcio y a potencial.

La conductancia obtenida del pico de las corrientes no es comparable directamente con la conductancia obtenida en las colas, porque debido al proceso de inactivación no se obtiene un estado estacionario. Por esta razón se uso una estrategia alternativa que consistió en ajustar cada curso temporal de las corrientes macroscópicas a una ecuación que predice una activación y una inactivación no completa de la corriente,:

$$I(t) = I_{\max} (1 - \exp(-t / \tau_{act})) (\exp(-t / \tau_{ina}) + I_{\min}) \quad \text{Ecuación 14}$$

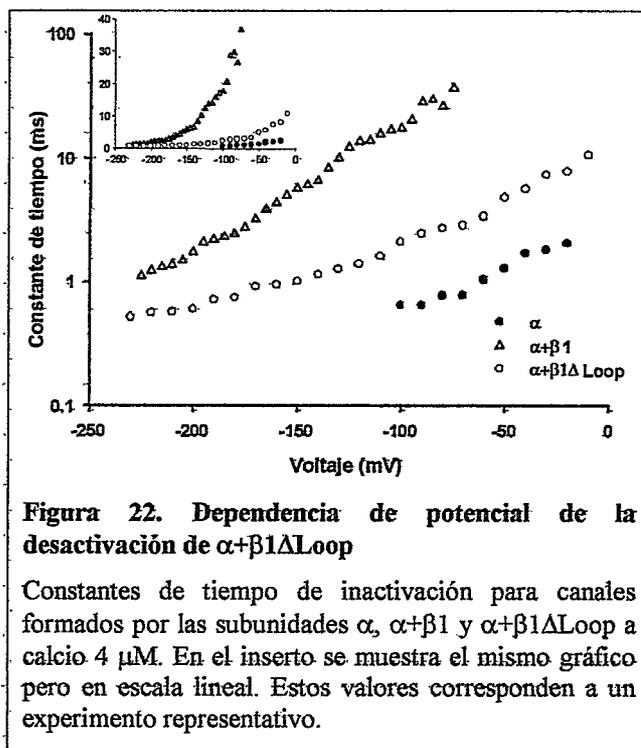
donde t es el tiempo e $I(t)$ es la corriente. Del ajuste de esta ecuación al curso temporal de la corriente se obtuvieron los valores de I_{\max} que es la corriente máxima de la fase de activación, τ_{act} la constante de tiempo de activación, τ_{ina} la constante de tiempo de inactivación, I_{\min} la corriente remanente que no sufre inactivación. En la Figura 21A se muestra un registro de corrientes macroscópicas ajustado a la ecuación 14, y en el inserto se muestran tres trazos de corriente con el ajuste a dicha ecuación y con el ajuste sólo a la fase de activación (ecuación 7, Métodos). Esto último muestra que los valores de corriente obtenidos en los picos no son muy diferentes a los obtenidos del ajuste a una exponencial creciente. Las curvas G-V obtenidas a partir de los valores de I_{\max}

(corriente en el estado estacionario que no sufre inactivación) no tenían la resolución suficiente para calcular de una manera precisa los valores de $V_{0.5}$ y z . Al superponer la curva G-V obtenida de los ajustes de I_{\max} con la G-V obtenida en de la conductancia pico, estas dos curvas se sobreponen (Figura 21B). Esto valida el hecho de calcular las curvas de activación mediante la conductancia de pico. Las constantes de tiempo de activación e inactivación obtenidas tanto por separado (ajuste independiente de la activación y la inactivación) como con la ecuación 9 fueron muy similares (Figura 21C-D), lo que nuevamente valida el análisis de τ_{act} y τ_{ina} por separado.



La τ_{act} de canales en presencia de $\beta 1\Delta\text{Loop}$ fue similar a la de canales formados sólo por subunidades α a concentraciones de calcio de 3 y 23 μM (Figura 20E-F). Cabe

recordar que la presencia de $\beta 1$ hace más lento el proceso de apertura. Esto significa que el mutante $\beta 1\Delta\text{Loop}$ elimina la modulación de la cinética dada por $\beta 1$. Al comparar las τ_{act} a dos concentraciones de calcio, se observa que la apertura se hace más rápida al aumentar la concentración de calcio (Figura 20E-F), lo que significa que ésta subunidad mutante no le quita al canal la capacidad de acelerar su apertura al aumentar el calcio intracelular.



Con respecto a la desactivación, la presencia del mutante $\beta 1\Delta\text{Loop}$ hace que la cinética de apertura del canal sea mas lenta que α solo, pero mucho más rápida que $\alpha+\beta 1$ a calcio $4 \mu\text{M}$ (Figura 22). Esto significa que el mutante $\beta 1\Delta\text{Loop}$ disminuye dramáticamente el efecto de la subunidad $\beta 1$ sobre la desactivación.

5.2 Inactivación de $\alpha+\beta 1\Delta\text{Loop}$

Para estudiar la dependencia de potencial del proceso de inactivación se utilizó el protocolo de doble pulso descrito anteriormente (Figura 20A). El primer pulso puebla el estado inactivado, y se mide la corriente evocada por el segundo pulso. Las curvas de

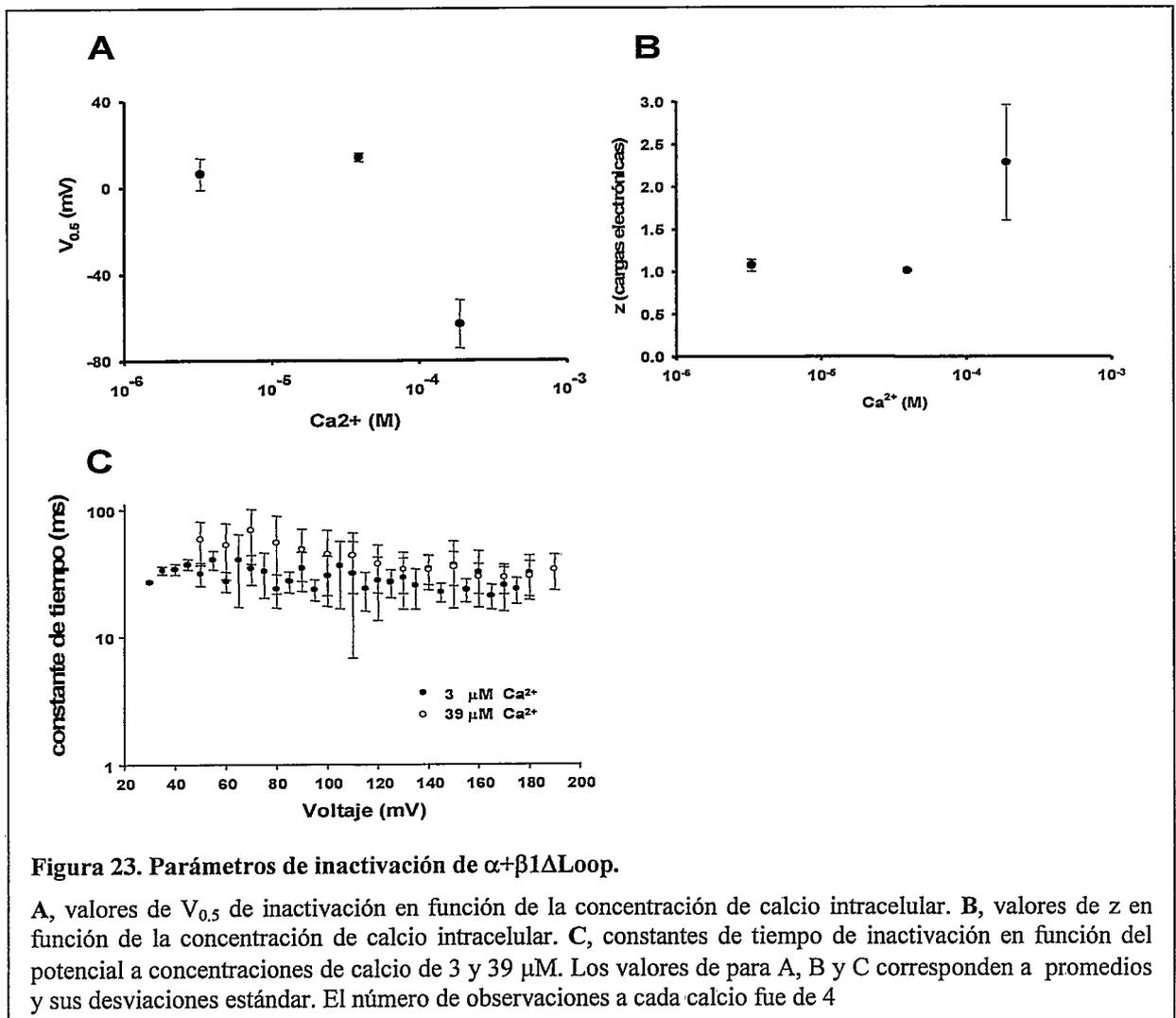
inactivación se obtuvieron graficando la corriente de pico del segundo pulso normalizada a su valor máximo (I/I_{max}) en función del voltaje del primer pulso (Figura 20B).

Los valores de $V_{0.5}$ de inactivación en función del calcio intracelular, se desplazaron hacia potenciales negativos al aumentar la concentración de calcio (Figura 23A). Esto significa que el proceso de inactivación está acoplado al de activación, como ha sido propuesto para otros canales (revisado por Hille B, 2001). En términos de un modelo cinético simple esto sugiere que para llegar al estado inactivado se debe pasar necesariamente por el estado abierto. Si existieran transiciones entre cerrado e inactivado, las curvas de inactivación no se podrían desplazar junto a las de activación.

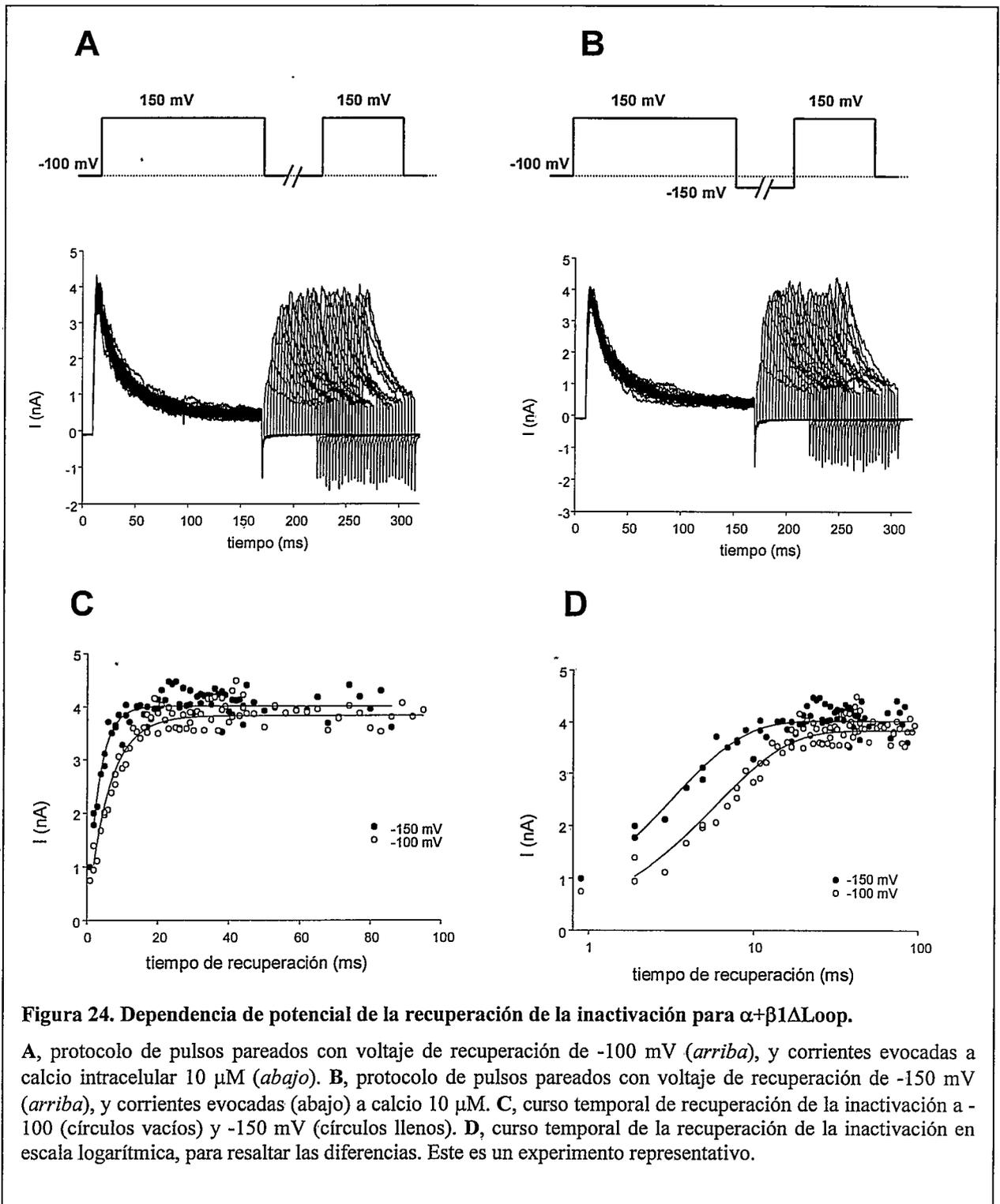
La dependencia de potencial del proceso de inactivación cambió al aumentar el calcio intracelular (Figura 23B). Desde valores de z cercanos a 1 para calcio 3 y 39 μM , aumentó a 2,5 para calcio 188 μM . Esto fue un resultado inesperado, y no se tiene una explicación para este fenómeno.

Los cursos temporales de la inactivación pudieron ajustarse a un decaimiento exponencial simple, de cuyo ajuste se extrajo la constante de tiempo de inactivación (τ_{ina}). La presencia de calcio no produjo un desplazamiento de estas curvas (Figura 23C). Este fue un resultado inesperado, ya que para corrientes BK_i se ha reportado que este ion desplaza dichas curvas (Solaro y col., 1997; Solaro y col., 1995; Xia y col., 1999).

Para estudiar la recuperación de la inactivación, se aplicó un protocolo de pulsos pareados (Hodgkin y Huxley, 1952b; Solaro y col., 1995), que consistió en aplicar dos pulsos de activación separados por un de interpulso de duración variable. Al graficar el pico de la corriente de recuperación en función de la duración del interpulso, se obtuvo el curso temporal de la recuperación de la inactivación (Figura 24A). Al usar dos potenciales de recuperación (-100 y -150, Figura 24A-B) esta ocurrió más rápidamente

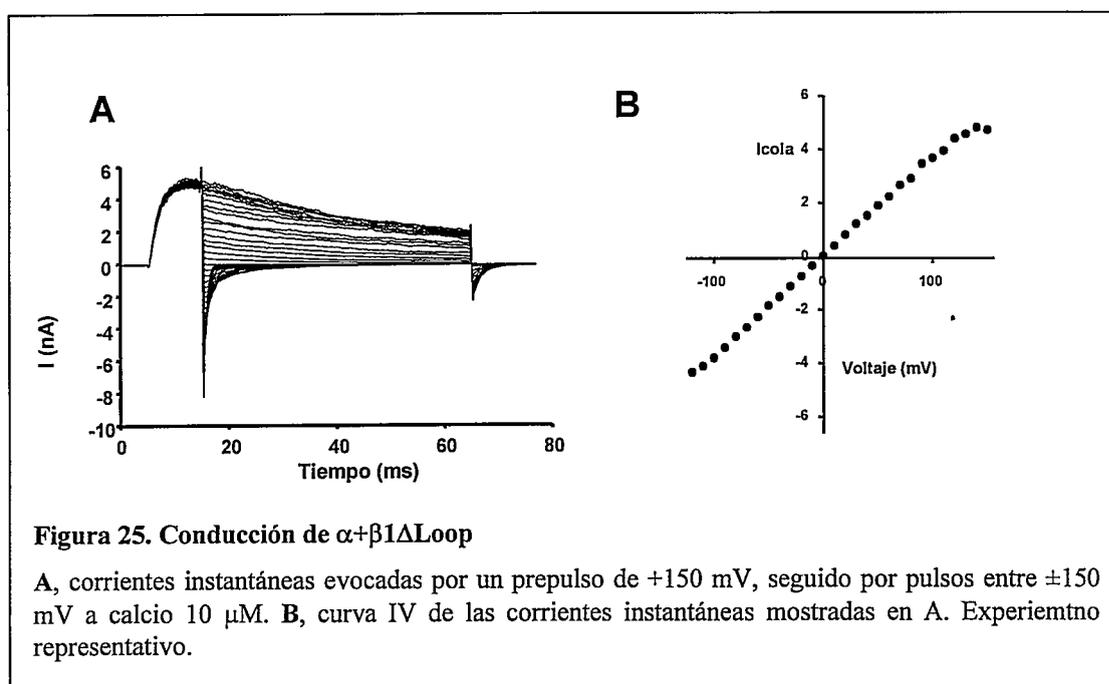


al potencial más negativo (Figura 24C). Esta diferencia se puede apreciar al graficar la corriente del pulso de prueba versus el tiempo del pulso de recuperación en escala logarítmica (Figura 24D). Esto implica que existe una dependencia de potencial en este proceso.



5.3 Conducción

Ya que algunas subunidades β confieren al canal una rectificación del canal abierto, se quiso saber si este mutante altera la vía de conducción. Se aplicaron protocolos de pulsos de corrientes instantáneas, como descritos anteriormente (Figura 25A). En los registros no se advierte rectificación, ya que la magnitud de la corriente a



potenciales positivos y negativos es similar (A). La curva I-V de corriente instantánea es lineal entre -150 a +150, lo que descarta una rectificación (Figura 25B). Sobre +130 mV se aprecia una no linealidad, producto de un bloqueo inespecífico, como se ha reportado previamente. Estos resultados muestran que la subunidad mutante $\beta1\Delta$ Loop no produce rectificación del canal abierto.

5.4 Localización del dominio de inactivación

Para determinar la localización de la región que confiere inactivación, los parches fueron tratados con 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tripsina por el lado intracelular. Esto resultó en la eliminación gradual de la inactivación. Aplicando pulsos de prueba de 100 mV desde un potencial de mantención de -70 cada 5 segundos, se evidenció una desaparición paulatina de la inactivación (Figura 26A). Esto también se manifestó como un aumento en la magnitud de las corrientes de pico y de estado estacionario (Figura 26B). Este aumento en la corriente se debió a una disminución en el número de dominios de inactivación por canal. La aparición de la corriente de cola es una consecuencia directa de la remoción de la inactivación (Figura 26B).

Para apreciar el curso temporal de la remoción de la inactivación, se graficó la fracción de corriente remanente (corriente sostenida/corriente de pico) en función del tiempo (Figura 26C). Se observa que ésta alcanzó un estado estacionario en aproximadamente 150 segundos después de la aplicación de tripsina. Pero incluso a éste tiempo se observa un pequeño porcentaje de inactivación (la fracción de corriente remanente nunca llega a 1, Figura 26B). Esto se debe a un fenómeno de bloqueo que ocurre a potenciales sobre 150 mV y no es parte del fenómeno que estamos estudiando, por lo que el estado estacionario correspondería a la remoción completa de la inactivación. Otra forma de expresar la eliminación de la inactivación consiste en graficar la τ_{ina} en función del tiempo, la cual va aumentando durante el periodo de exposición (Figura 26D). Los valores de τ_{ina} son dispersos debido a que aún después de varios minutos de aplicación de tripsina existe una caída de la corriente debida al

bloqueo antes mencionado, lo que hace que los ajustes a cada trazo no sean buenos. La rapidez del proceso de activación no es afectada por la remoción de la inactivación (Figura 26E).

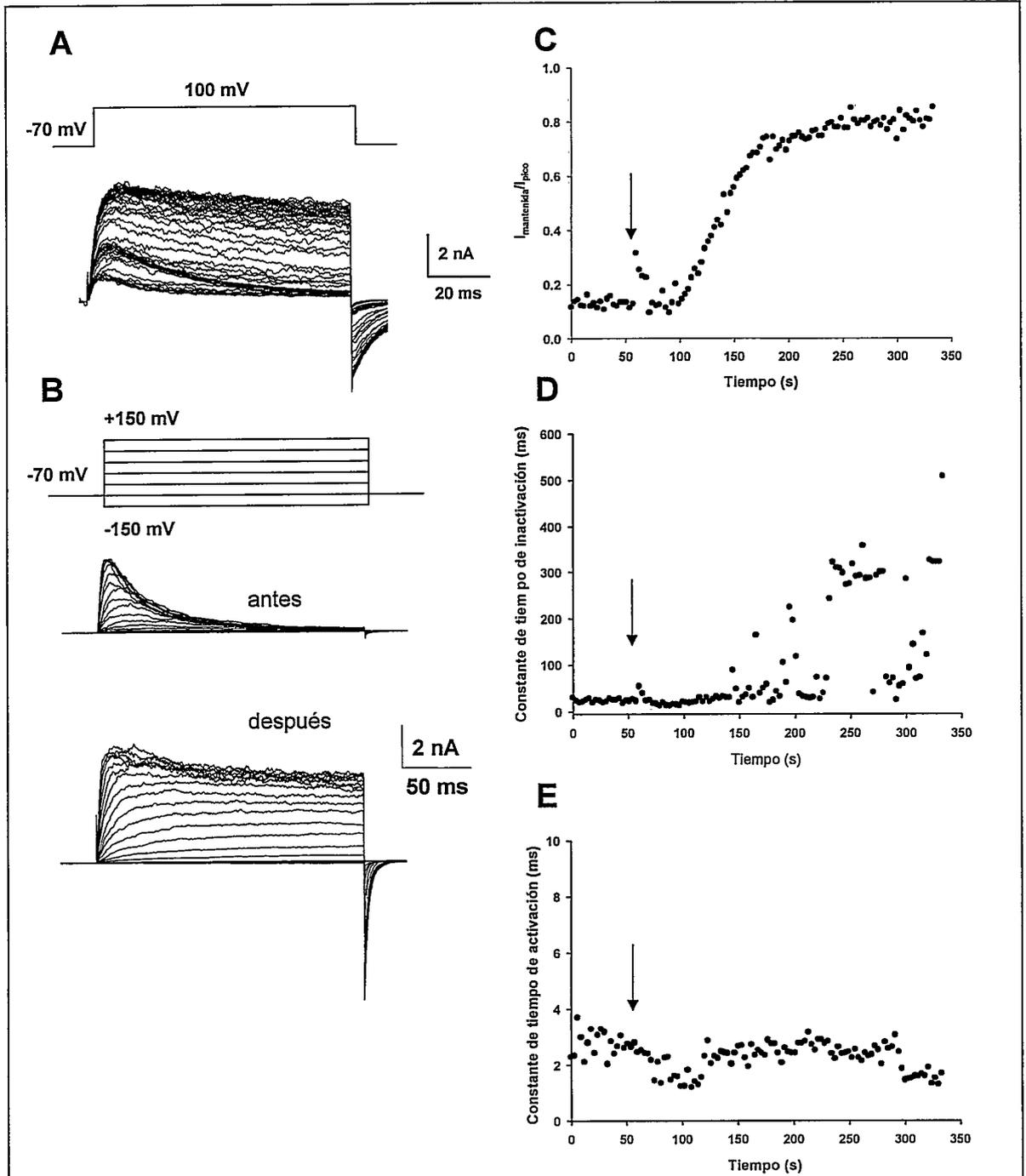
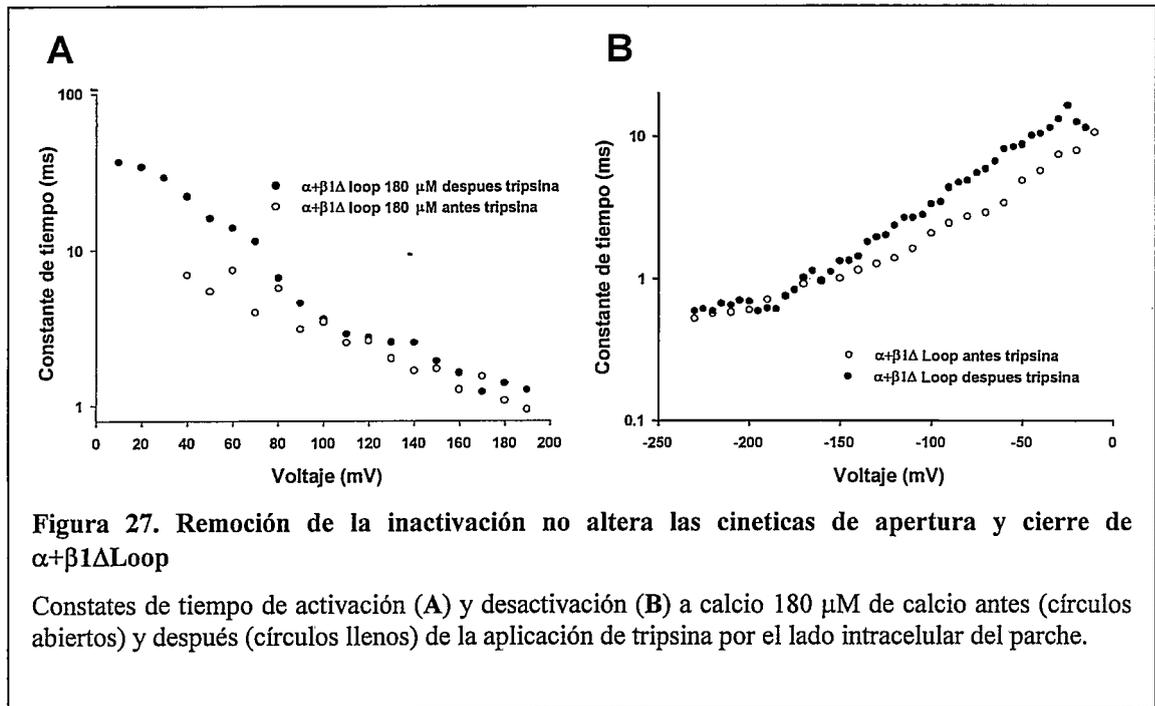


Figura 26. Remoción de la inactivación por digestión con tripsina

A, protocolo de pulsos, desde -70 mV se da un pulso a 100 mV cada 5 segundos (arriba); corrientes evocadas a 180 μ M de calcio (abajo) durante la digestión con tripsina. B, protocolo de potenciales (arriba) y corrientes a 10 μ M de calcio (abajo), antes y después de la aplicación de tripsina 10 μ g/ μ L. C, corriente remanente en función del tiempo. D, constantes de tiempo de inactivación en función del tiempo E, constantes de activación. La flecha indica el momento de la aplicación de tripsina.

La aplicación de tripsina no alteró la velocidad de apertura ni de cierre de los canales $\alpha+\beta1\Delta$ Loop, lo que significa que la eliminación de la inactivación no afecta ambos

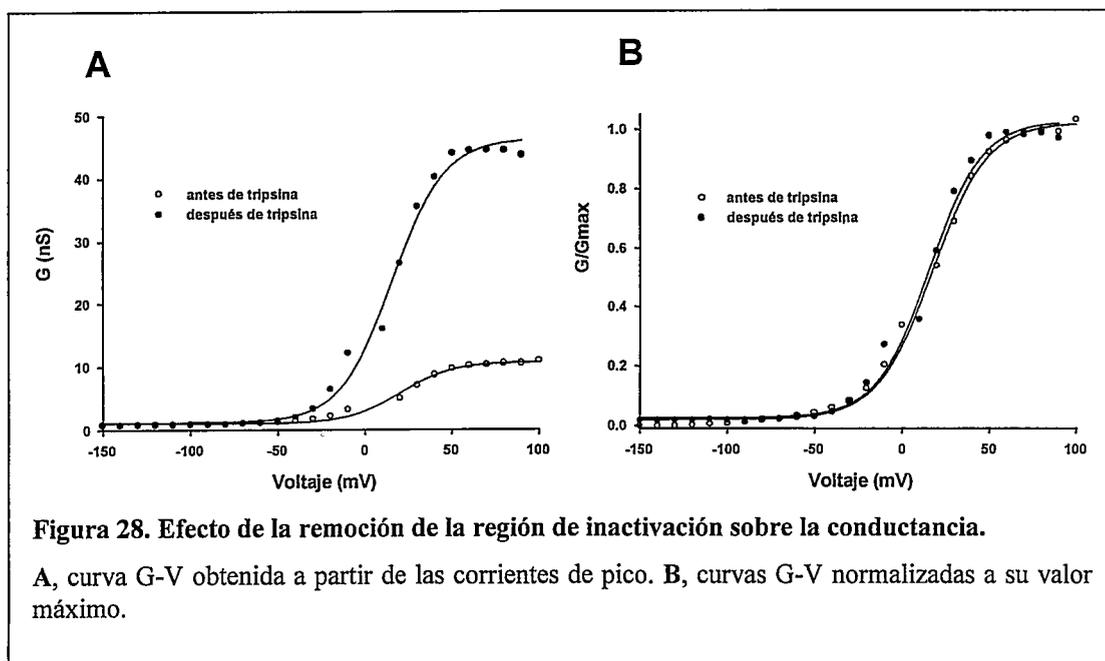


procesos

Comparando las curvas G-V antes y después de la aplicación de tripsina, se evidencia un aumento de aproximadamente cuatro veces en la conductancia máxima (Figura 28A). Sin embargo, al graficar las curvas normalizadas por su valor máximo, no se producen cambios en los valores de $V_{0.5}$ ni en el de z de activación (Figura 28B). Este resultado muestra que la aplicación de tripsina no alteró la dependencia de potencial del proceso de activación de $\alpha+\beta 1\Delta$ Loop.

6 Regiones de las subunidades β que modulan a la subunidad α

Para determinar las regiones en las subunidades β que son responsables de los efectos sobre la actividad del canal se utilizó la subunidad $\beta 4$ para construir quimeras entre ambas subunidades que confiere propiedades distintas a las de β . Mientras que $\beta 1$ aumenta la sensibilidad aparente por calcio, $\beta 4$ la disminuye con respecto a la subunidad α . Esta subunidad hace más lentas las cinéticas tanto de activación como de



desactivación, comparado con la subunidad α (revisado por Orio y col., 2002).

Efecto de la subunidad $\beta 4$

La presencia de la subunidad $\beta 4$ produjo canales que mostraron valores de $V_{0.5}$ mas positivos que los encontrados para canales $\alpha+\beta 1$ e incluso por α (Figura 29A). Esto implica una menor sensibilidad aparente por calcio. La cinética de activación a calcio $4 \mu\text{M}$ resultó ser más lenta que para canales formados por subunidad α , y similar a canales $\alpha+\beta 1$ (Figura 29B). La cinética de desactivación a la misma concentración de calcio fue más lenta que para canales α , pero más rápida que la observada para canales $\alpha+\beta 1$ (Figura 29C).

Las curvas G-V fueron ajustadas al modelo alostérico con la única restricción de $E=1$, es decir sin interacción entre la unión de calcio y la activación de los

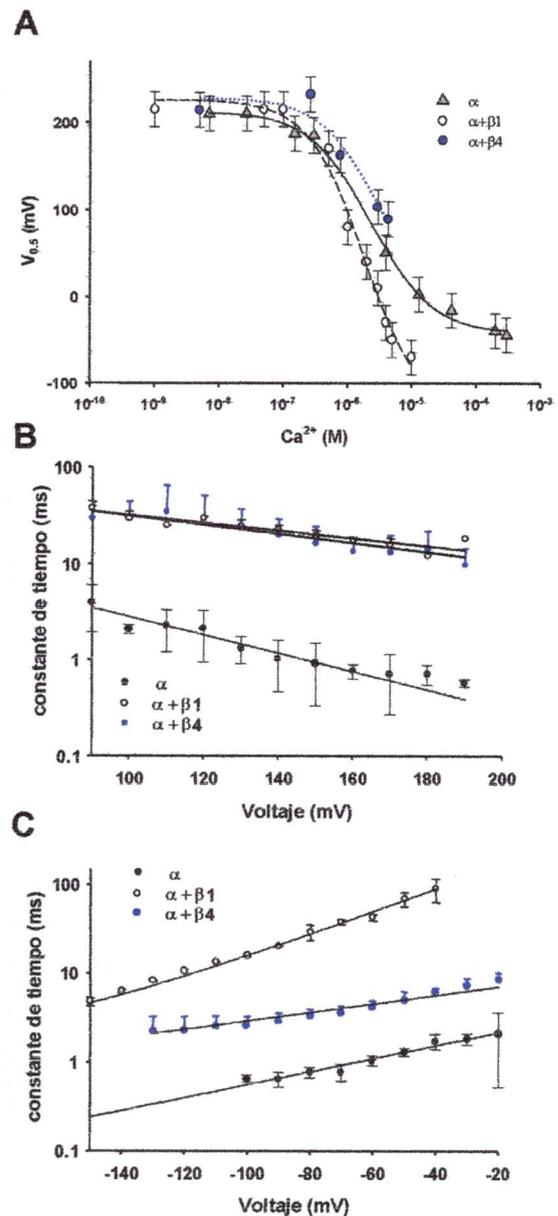


Figura 29. La subunidad $\beta 4$ afecta la sensibilidad por calcio y la cinética de desactivación.

A, $V_{0.5}$ en función de la concentración de calcio para canales formado por subunidades α , $\alpha+\beta 1$, y $\alpha+\beta 4$. Valores de $\alpha+\beta 4$ corresponden a promedio y su desviación estándar, con 3-7 observaciones a cada concentración de calcio. Valores para α y $\alpha+\beta 1$ fueron extraídos de (Valverde y col., 1999). B, constantes de tiempo de activación a calcio $4 \mu\text{M}$, para canales α , $\alpha+\beta 1$, y $\alpha+\beta 4$. C, constantes de tiempo de desactivación a calcio $4 \mu\text{M}$, para canales α , $\alpha+\beta 1$, y $\alpha+\beta 4$. para B y C los valores corresponden a promedios con sus desviaciones estándar y el número de observaciones fue de 3-6 para cada tipo de canal.

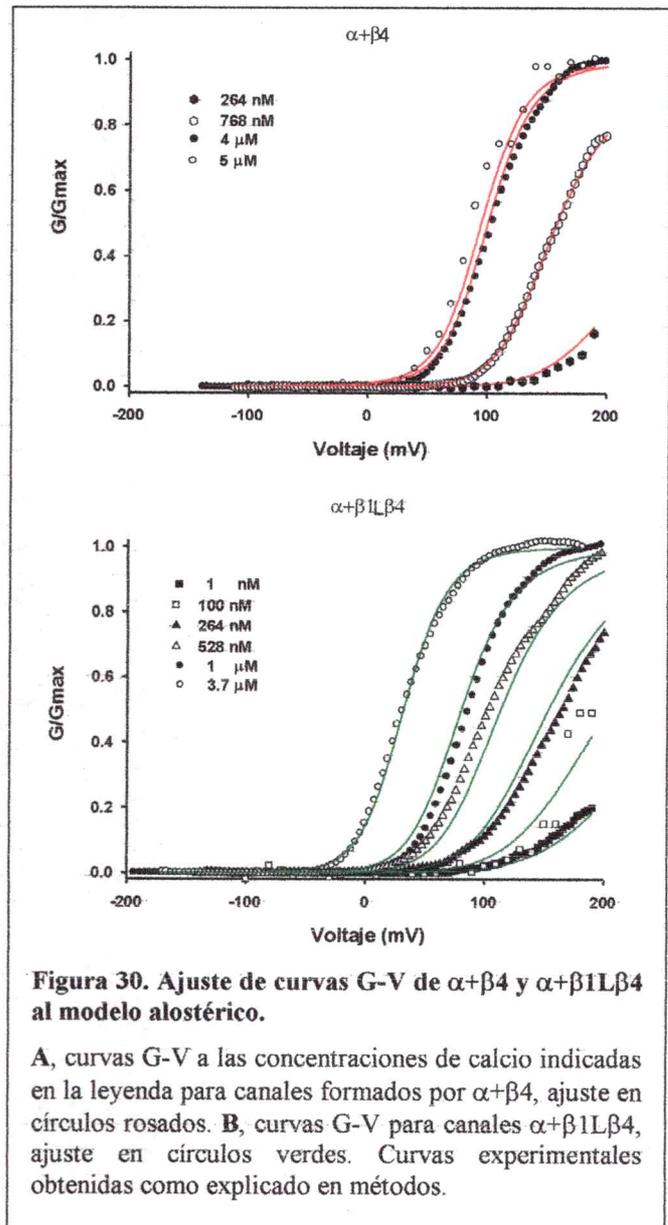
sensores. Al dejar libre este parámetro su valor varió muy poco, pero aumentaba considerablemente el error en la determinación de otros parámetros. Estos experimentos se llevaron a cabo en parches escindidos de oocitos de *Xenopus*, y es interesante notar que los parámetros obtenidos no son exactamente los mismos que los obtenidos en células HEK (Tabla2). La subunidad β_4 aumenta el valor de V_j y z_1 con respecto a canales formados sólo por subunidades α . El valor de K_d disminuyó en un orden de magnitud con respecto a α . La constante alostérica C está en un valor intermedio entre α y $\alpha+\beta_1$. La constante D mantuvo un valor cercano a $\alpha+\beta_1$.

Si se ejecuta el ajuste a partir de los valores de α variando sólo V_j , K_d y L_0 , se pueden reproducir las curvas de $\alpha+\beta_4$. Pero al hacer variar C o D se obtiene mejores ajustes. Esto significa que el cambio de V_j , K_d y L_0 no es suficiente para dar cuenta del efecto de la subunidad β_4 . Es necesario el efecto de al menos una de las constantes alostéricas (C o D).

Efecto de la quimera $\beta 1L\beta 4$

La quimera $\beta 1L\beta 4$ (lazo extracelular de $\beta 4$, sobre el “background” $\beta 1$, Figura 31A) produce un desplazamiento de los valores de $V_{0.5}$ similar a lo observado con $\alpha + \beta 1$ (Figura 31B). Esto implica que la región compartida por ambas subunidades, es decir los segmentos de membrana y los extremos N y C-terminales son la responsable de la sensibilidad por calcio.

En términos del modelo de activación alostérica dejando todos los parámetros libres (con la restricción $E=1$), esta quimera confiere valores de V_j , z_j , z_i , C y D similares a $\alpha+\beta 1$. El valor de K_d es un orden de magnitud mayor que $\alpha+\beta 1$ y un orden de magnitud menor que $\alpha+\beta 4$. El valor de L_0 es más cercano al conferido por $\beta 4$ que por $\beta 1$. Si se ajustan los datos experimentales a partir de los valores obtenidos del ajuste de $\alpha+\beta 1$, sólo es necesario variar K_d (disminuirlo en un orden de magnitud) y L_0



(aumentarlo casi el doble). Si se ajustan los puntos experimentales a partir de los parámetros de $\alpha+\beta_4$, es posible reproducir las curvas con los parámetros V_j , K_d y L_0 . El valor de V_j es similar al de $\alpha+\beta_1$, el valor de K_d es el doble que el de $\alpha+\beta_4$ y aproximadamente un orden de magnitud menor que para $\alpha+\beta_1$, y L_0 es un orden de magnitud menor que para $\alpha+\beta_4$ y un poco menos de dos ordenes de magnitud con respecto a $\alpha+\beta_1$. Es decir se llega básicamente a los mismos parámetros, reafirmando la validez de los parámetros encontrados por los primeros ajustes (con todos los parámetros libres). Los valores de z_1 y z_2 no afectaron el ajuste, es decir si ellos variaron o se mantuvieron fijos no influyó en el resultado final. En resumen, por el análisis de los parámetros del modelo cinético esta quimera se parece más a β_1 que a β_4 .

La cinética de activación de $\alpha+\beta_1L\beta_4$ fue ligeramente más rápida que la de $\alpha + \beta_1$ y $\alpha + \beta_4$, pero mucho más lenta que α (Figura 31C). Sin embargo la cinética de desactivación fue similar a la obtenida para $\alpha + \beta_4$, y más rápida que $\alpha+\beta_1$ (Figura 31D). Ya que la quimera modula la desactivación de manera similar a β_4 , y tanto la quimera como la subunidad β_4 comparten el dominio extracelular, podemos pensar en una relación entre este fenómeno y dicha región. Nada se puede decir sobre la activación por dos razones, debido a que las cinéticas de $\alpha+\beta_1$ y $\alpha+\beta_4$ son muy similares, y que la cinética de $\alpha+\beta_1L\beta_4$ es más rápida.

Tabla2. Parámetros del ajuste al modelo alostérico para $\beta 4$ y $\beta 1L\beta 4$

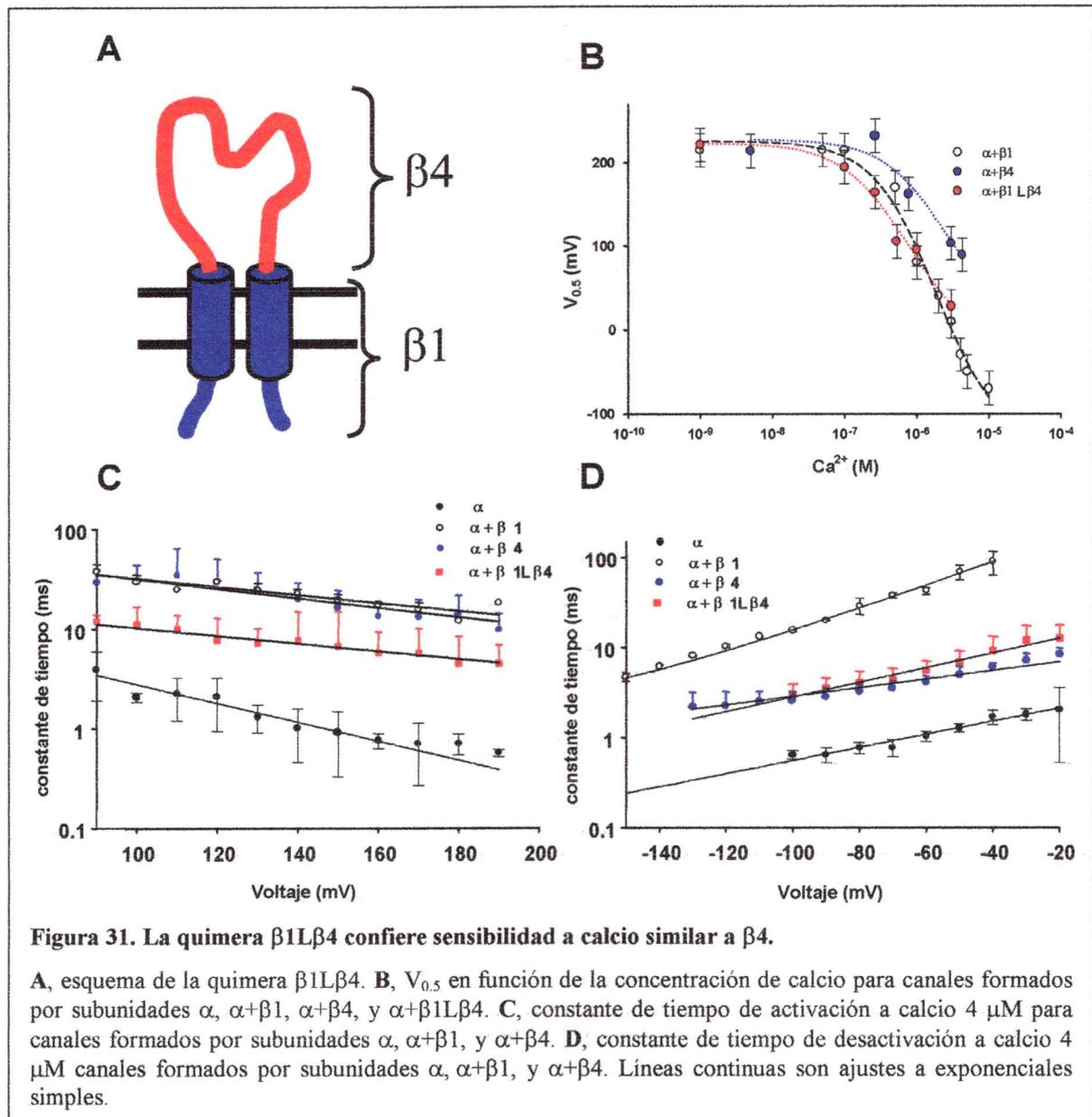
	α		$\alpha+\beta 1$		$\alpha+\beta 4$		$\alpha+\beta 1L\beta 4$	
Vj	108.8 ±11.5 *		71.20 ±3.41 *		136.6 ±32.03 *		65.17 ±6.61 *	
Zl	0.35		0.35		0.9 ±0.32 *		0.45	
Zj	0.47 ±0.016 *		0.47 ±0.01 *		0.53 ±0.91		0.43 ±0.04 *	
Kd	2.14x10 ⁻⁵ *		2.13x10 ⁻⁵ *		1.5x10 ⁻⁷ *		2.66x10 ⁻⁶ *	
	±5.12x10 ⁻⁷		±4.05x10 ⁻⁷		±1.11x10 ⁻⁷		±0.17x10 ⁻⁶	
L0	2.48x10 ⁻⁷ *		9.08x10 ⁻⁶ *		9.74x10 ⁻⁸		2.97x10 ⁻⁷	
	±5.83x10 ⁻⁷		±1.72x10 ⁻⁶		±17.67x10 ⁻⁸		±65.53x10 ⁻⁷	
D	36.05 ±2.76 *		16.93 ±1.07 *		11.23 ±13.82		13.85 ±7.87	
C	19.42 ±0.73 *		10.17 ±0.21 *		14.92 ±2.02 *		10.58 ±0.54 *	
E	1		1		1		1	
R ²	0.99647112		0.99813586		0.99690942		0.99313853	

Se indican los valores de los parámetros obtenidos del ajuste como promedio ± error estándar. Con * se indica la probabilidad de el valor predicho no sirva para predecir la variable dependiente ($P < 0.001$)

Ya que esta quimera tiene los segmentos de membrana de $\beta 1$ y el lazo de $\beta 4$, los resultados sugieren que los segmentos de transmembrana están involucrados en la sensibilidad a calcio, y el lazo involucrado con la modulación de la desactivación.

Al estudiar la quimera inversa, $\beta 4L\beta 1$, se obtuvo corrientes con características similares a las obtenidas cuando los canales están formados solamente por subunidades α . Esto puede significar que esta subunidad quimérica no se expresa, o no tiene efecto sobre la subunidad α .

Estos resultados sugieren la existencia de dominios funcionales dentro de las subunidades β . Los segmentos de transmembrana y los extremos N y C terminal, son responsables de modular la sensibilidad por calcio



DISCUSIÓN

1 **Disección molecular de la función de la subunidad reguladora $\beta 1$.**

1.1 ***Papel de las cisteínas extracelulares de $\beta 1$***

Hanner y sus colegas demostraron en 1998 que mutaciones puntuales de las cisteínas extracelulares por alanina disminuyen la afinidad por la toxina CTX y producen la pérdida de al menos un puente disulfuro, lo cual se ha interpretado como un cambio en la estructura terciaria de esta región (Hanner y col., 1998). Los resultados expuestos en este trabajo muestran que las propiedades modulatorias de una subunidad $\beta 1$ en la que se ha eliminado las cuatro cisternas extracelulares ($\beta 1$ CysLess) son indistinguibles de las propiedades modulatorias de la subunidad $\beta 1$ *wt*. Este mutante no afecta la modulación que la subunidad $\beta 1$ ejerce sobre la actividad del canal, tanto en la sensibilidad a calcio y potencial como en los parámetros cinéticos. Tampoco hay una modificación en la vía de conducción. Más aún, la eliminación química de dichos puentes disulfuro mediante el agente reductor DTT, tampoco afectó la actividad de los canales.

Los resultados de los mutantes puntuales parecen contradictorios a los del mutante $\beta 1$ CysLess, ya que en ellos se afectó la sensibilidad aparente por calcio pero no se afectó las cinéticas. Así, los mutantes puntuales generan un acoplamiento funcional diferente al de las subunidades $\beta 1$ wt y $\beta 1$ Cysless, debido a que el cambio estructural alteró su modulación sobre la actividad del canal. Estos resultados pueden explicarse pensando que los puentes disulfuro son importantes para el plegamiento original de la proteína, y que la eliminación de uno de ellos (por eliminación de una cisteína) causa un cambio estructural y un cambio en la modulación de la actividad del canal.

Lo importante es que la ausencia total de las cisteínas (y de los puentes disulfuro) no afecta la actividad moduladora pero si afecta parte de la estructura visto como una baja afinidad por CTX. Usando el mismo razonamiento, la aplicación de DTT al reducir los puentes disulfuro no afectaría la estructura relacionada con la actividad moduladora.

Todos estos resultados apuntan a que las cisteínas extracelulares de la subunidad $\beta 1$ wt no cumplen un rol en el acoplamiento funcional con la subunidad α aunque participan en mantener la estructura del sitio de unión a CTX.

Los intentos de expresar la actividad de los mutantes puntuales en términos de un modelo cinético de 70 estados dieron resultados difíciles de interpretar principalmente debido a que los datos experimentales recolectados no tienen la riqueza suficiente como para establecer límites estrechos para el rango de confiabilidad de los parámetros determinados. Sin embargo ninguno de los resultados es incompatible con la conclusión señalada más arriba para la mutante que carece de todas las cisternas.

1.2 **Papel de la región extracelular de $\beta 1$**

Si pensamos que el mutante $\beta 1$ CysLess afecta la estructura pero no la función, entonces podemos pensar que al menos parte de esta región no tiene participación en la “transducción” del efecto de la subunidad $\beta 1$ sobre la actividad del canal. El hecho que la quimera $\beta 1L\beta 4$ confiera sensibilidad a calcio similar que $\beta 1$, vuelve a sugerir carencia de efecto de la región extracelular sobre la sensibilidad a calcio.

Al hacer subunidades que carecieron de partes de su región extracelular, estas no expresaron funcionalmente. Esto puede deberse a que no interactuó funcionalmente con la subunidad α o a que no se produjo proteína. Esta última posibilidad no puede descartarse, ya que no se investigó la síntesis de dichos mutantes.

La eliminación de la región extracelular de $\beta 1$ produjo un dominio de inactivación, el cual puede haberse originado por un plegamiento diferente al de la subunidad *wt*. Por otra parte se produjo una disminución de la sensibilidad a calcio y potencial, lo cual refuerza la idea de una estructura impropia para este mutante.

Estos resultados sugieren que es necesaria la totalidad de la región extracelular de $\beta 1$ para que se produzca el efecto de ella sobre la actividad del canal.

1.3 **Rol de los segmentos de transmembrana y los extremos N y C terminales**

Los resultados con la quimera $\beta 1L\beta 4$ sugieren que la sensibilidad a calcio se encuentra ligada a los segmentos de transmembrana o a sus extremos N y C terminales.

Esto debido a que la sensibilidad de dicha quimera es similar a $\beta 1$, y ambas subunidades comparten tanto segmentos de transmembrana como extremos intracelulares. Resultados de nuestro laboratorio con las quimeras $\beta 1L\beta 2$ y $\beta 2L\beta 1$, muestran que el efecto sobre la sensibilidad a calcio está relacionado con los segmentos de membrana y los extremos N y C terminales, que se encuentran en el lado intracelular de la proteína (P.Orio, manuscrito en preparación).

Para la subunidad $\beta 4$ se ha mostrado que eliminación de probables sitios de fosforilación en los extremos intracelulares N y C suprime el efecto de esta subunidad sobre el canal (Jin y col., 2002b). Los resultados expuestos en este trabajo (y los de P. Orio) no descartan que los segmentos intracelulares sean los responsables de los efectos conferidos sobre la actividad del canal, ya que en todas las quimeras analizadas los segmentos de transmembrana fueron acompañados de sus respectivos extremos N y C

Es interesante notar que la quimera $\beta 1L\beta 4$ mostró cinéticas de desactivación similares a $\beta 4$, lo que hace pensar que la región extracelular de $\beta 4$ estaría involucrada en la modulación de la desactivación causada por las subunidades β . Esto sugiere que mientras una región regula la sensibilidad a calcio, otra regula la cinética de cierre. Sin embargo esto no ocurrió con los mutantes puntuales de cisteína en $\beta 1$. Entonces es probable que esta separación de funciones modulatorias sólo ocurra para $\beta 4$.

No se tiene una explicación al hecho de la no expresión funcional de la quimera $\beta 4L\beta 1$. Aunque fue secuenciada en nuestro laboratorio dos veces, una alternativa es que dicha quimera no se exprese funcionalmente. En el trabajo de Meera y col. (2000) se muestra que la co-inyección del mRNA de $\beta 4L\beta 1$ junto al de la subunidad α , producen

canales que son sensibles a CTX, mientras que la quimera $\beta 1L\beta 4$ muestra corrientes poco sensibles a CTX. Estos resultados se interpretaron pensando que la región extracelular de $\beta 4$ confiere la baja afinidad por CTX. Sin embargo, es posible que en dicho trabajo la quimera tampoco se haya expresado, ya que sus cinéticas de activación y desactivación son similares a canales formados sólo por la subunidad α , y no se muestra la sensibilidad a calcio de esta quimera.

La delección de distintas partes de la proteína, incluyendo ambos segmentos de transmembrana así como de partes de la región extracelular, produjo canales indistinguibles de los formados sólo por las subunidades α . Cualquiera que sea la razón de este comportamiento (no expresión o no asociación funcional) podemos decir que la región extracelular de $\beta 1$ es sensible a delecciones al menos para su expresión funcional.

En resumen los resultados sugieren que el acoplamiento funcional de la subunidad $\beta 1$ con la subunidad α reside en los segmentos transmembrana o los extremos intracelulares. La integridad de la región extracelular es esencial para la correcta disposición de las estructuras relacionadas con la interacción funcional entre la subunidad β y la subunidad α .

2 Conducción y la región extracelular de las subunidades β .

Se ha reportado que la corriente de potasio llevada por BK co-expresado con las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ presenta rectificación para el canal abierto, lo cual es un indicativo de que dichas subunidades afectan la vía de conducción (Zeng y col., 2001; Lingle y col., 2001; Zeng y col., 2003; Xia y col., 2000). En el caso de $\beta 3$, mediante la

construcción de quimeras con otras subunidades se pudo relacionar este efecto con la región extracelular (Zeng y col., 2003). Sin embargo, no se pudo encontrar secuencias específicas dentro de esta región que fueran responsables de la rectificación de canal abierto. La presencia de $\beta 3$ produce transiciones entre cerrado y abierto muy rápidas, lo que no permite la correcta determinación de la conductancia unitaria (Xia y col., 2000). Al tratar canales $\alpha + \beta 3$ con el agente reductor DTT por el lado extracelular, la rectificación fue disminuyendo y la conductancia unitaria fue aumentando según el tiempo de exposición a este agente (Zeng y col., 2003). Esto se ha interpretado como una ruptura de los puentes disulfuro (causada por DTT) que cambiaría la estructura de la región extracelular de $\beta 1$ en la cercanía de la vía de conducción. Este tratamiento con DTT también aumentó la afinidad por CTX, que en estos canales es reducida con respecto a canales que expresan sólo la subunidad α . Estos resultados sugieren que en la subunidad $\beta 3$ las cisteínas también se encuentran manteniendo la estructura de la región extracelular en la cercanía de la vía de conducción.

En esta tesis se reporta que las subunidades $\beta 1$ mutantes que alteran la unión de la toxina CTX mediante cambios en la estructura de la región extracelular (Hanner y col., 1998), no alteraron la vía de conducción. El mutante $\beta 1 \Delta \text{Loop}$ tampoco muestra rectificación, lo que indica que su posible mal plegamiento no afectó la vía de conducción. Una idea gráfica de éste fenómeno puede verse en la Figura 32. La eliminación de alguna o todas las cisteínas extracelulares cambia la estructura tridimensional de la subunidad $\beta 1$ y disminuye la afinidad por CTX, posiblemente por un cambio en su sitio de unión (Figura 32A-B). Por otro lado, estas modificaciones no

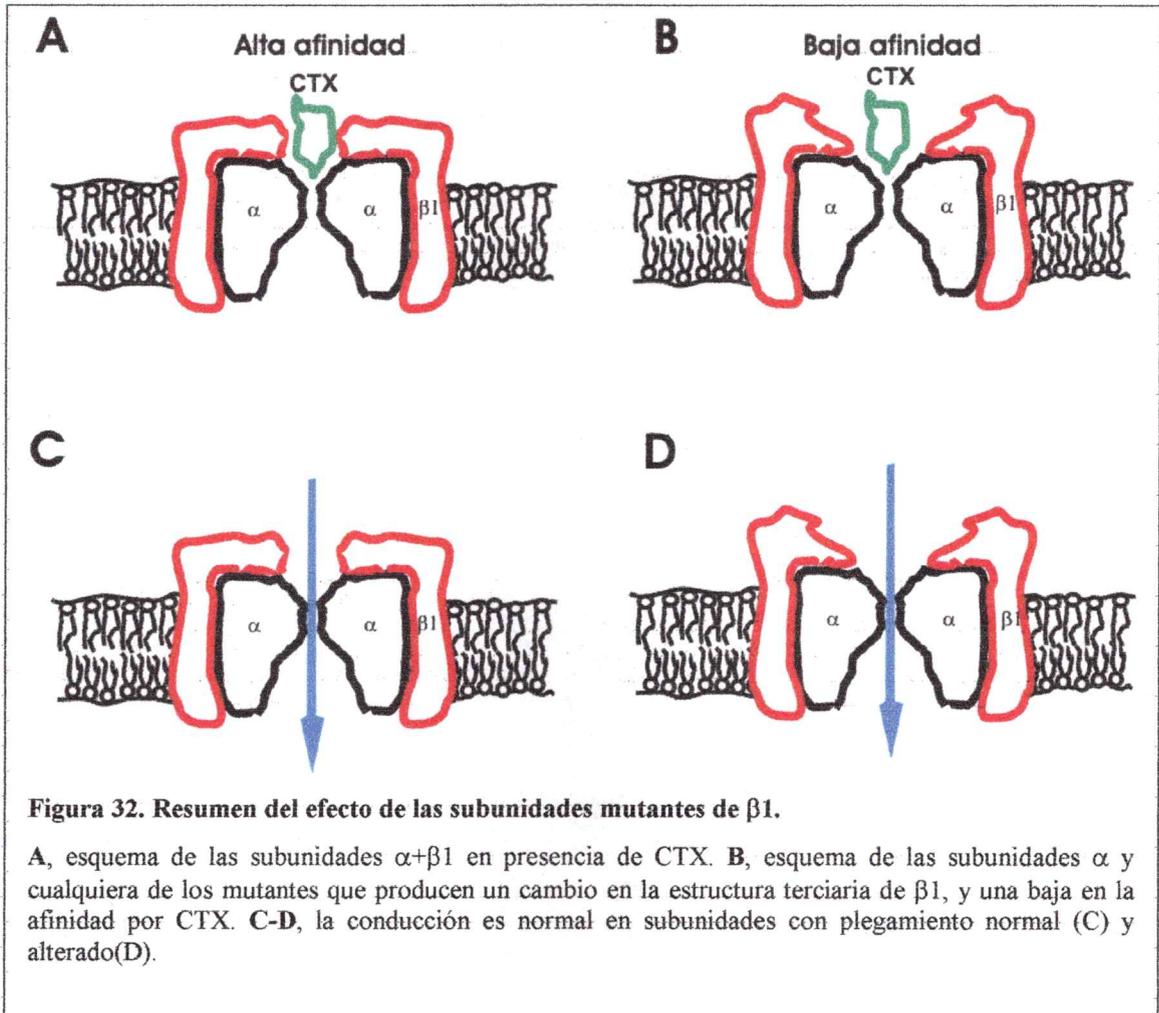


Figura 32. Resumen del efecto de las subunidades mutantes de $\beta 1$.

A, esquema de las subunidades $\alpha + \beta 1$ en presencia de CTX. B, esquema de las subunidades α y cualquiera de los mutantes que producen un cambio en la estructura terciaria de $\beta 1$, y una baja en la afinidad por CTX. C-D, la conducción es normal en subunidades con plegamiento normal (C) y alterado(D).

alteraron la conducción de iones a través de la vía de conducción del canal (Figura 32C-D).

Alternativamente se puede pensar que los cambios que las subunidades β confieren sobre la afinidad por CTX no se deben a que dichas subunidades se encuentren cerca a la vía de conducción, sino que existe algún sitio alostérico que es modificado por estas mutaciones, e impide la unión de CTX. Sin embargo, esto es poco probable ya que se ha mostrado mediante entrecruzamiento químico la cercanía de $\beta 1$ y CTX, la cual se une al poro (Knaus y col., 1994b).

3 Eliminación de la región extracelular: $\beta 1\Delta\text{Loop}$

3.1 Fenotipo $\alpha+\beta 1\Delta\text{Loop}$

Como se mostró en Resultados, la supresión de casi la totalidad de la región extracelular de $\beta 1$ produjo corrientes que sufren inactivación, la cual desaparece al digerir con tripsina por el lado intracelular (Figura 26). Esto se interpretó en secciones anteriores pensando que la desaparición de la región extracelular impide que las regiones de $\beta 1$ involucradas en la modulación de la actividad del canal, se encuentren en una posición adecuada para conferir su efecto. En esta sección se discutirán biofísicamente las características de la inactivación producida por $\beta 1\Delta\text{Loop}$.

Canales que expresan esta subunidad mutante fueron sensibles a calcio, pero en mucho menor medida que la observada para canales α o $\alpha+\beta 1$. Por ejemplo, entre calcio 4 y 188 μM el desplazamiento en el $V_{0.5}$ para $\alpha+\beta 1$ es de aproximadamente 200 mV, mientras que para $\alpha+\beta 1\Delta\text{Loop}$ es de sólo 40 mV (Figura 20C). Este desplazamiento es incluso menor que el reportado para canales que sólo expresan subunidad α , cuyo desplazamiento entre estas concentraciones de calcio es de aproximadamente 100 mV (Figura 9B). Este resultado muestra que el mecanismo de activación por calcio no ha sido eliminado, pero ha sido profundamente afectado. La dependencia de potencial del proceso de apertura también fue afectada, ya que los valores de z (obtenidos del ajuste a una distribución de Boltzmann) fueron menores con respecto a canales formados por subunidades α y $\alpha+\beta 1$. En este caso es posible que la subunidad mutante $\beta 1\Delta\text{Loop}$

produzca un cambio en la energética del proceso de apertura, lo que dificulta energéticamente la apertura del canal por calcio y por voltaje. Con respecto a la modulación de la cinética conferida por β_1 , esta fue eliminada por este mutante. Es decir, las velocidades de apertura y cierre son similares a las de canales que carecen de subunidad β_1 .

Las curvas de inactivación de canales $\alpha+\beta_1\Delta$ Loop se desplazan hacia voltajes negativos al aumentar la concentración de calcio, como lo hacen las curvas de activación. Esto es un indicio claro de que el proceso de inactivación se encuentra acoplado a la activación. Es decir, los canales necesitan entrar al estado abierto, para luego poder pasar al estado inactivado.

Ya que la aparición de inactivación es un indicativo de una estructura diferente a la de *wt*, entonces es posible que las regiones encargadas con la modulación de la actividad del canal no se encuentren en el lugar adecuado para ejercer su efecto.

Otra característica interesante conferida por $\beta_1\Delta$ Loop es que la constante de tiempo de inactivación es poco dependiente de potencial, e independiente de calcio (Figura 23C). Este resultado vuelve a sugerir que la inactivación es un proceso ligado a la apertura del canal, y no tiene una dependencia intrínseca a calcio ni a potencial.

Esta independencia de potencial puede explicarse sobre la base de un esquema cinético con un estado cerrado (C), abierto (O) e inactivado (I), donde toda la dependencia de potencial está en el paso C-O



En este esquema la rapidez ($1/\tau_{ina}$) de llegada al estado I es

$$\frac{1}{\tau_{ina}} = \gamma P_o = \frac{\gamma}{1 + \beta/\alpha}$$

donde α y β son las constantes de rapidez (dependientes de potencial) de apertura y cierre, respectivamente y P_o es la probabilidad condicional de encontrar el canal abierto. Como se puede apreciar en la Figura 21B, la curva de activación está saturada desde valores cercanos a +100 mV. Esto implica que los valores de $\alpha(V)$ son mucho mayores que $\beta(V)$, por lo que el cociente $\beta/\alpha \rightarrow 0$, por lo que $1/\tau_{ina} \approx \gamma$. Esto explica la independencia de potencial de τ_{ina} .

3.2 *La partícula de inactivación de $\beta 1\Delta$ Loop*

La inactivación conferida por $\beta 1\Delta$ Loop puede ser entendida con un modelo de “bola y cadena”, propuesto en un principio para los canales de sodio (Bezanilla y Armstrong, 1977), pero es también válido para canales de potasio. Este modelo postula la existencia de una región “bola” que produce la inactivación, unida a una “cadena” que la une al canal. Estas regiones que confieren inactivación se encuentran en el extremo N terminal.

Un grupo de secuencias de varios extremos N terminales de subunidades de canales de potasio que producen inactivación muestra que todas ellas tienen una región hidrófoba, seguida por una región con aminoácidos cargados (Figura 33). La naturaleza hidrófoba de estos extremos les permite entrar en la cavidad interna del canal, que también es de naturaleza hidrófoba (Toro y col., 1994; Toro y col., 1992; Murrell-

Lagnado y Aldrich, 1993a; Zhou y col., 2001a; revisado por Aldrich, 2001). Se ha postulado que la presencia de cargas ayuda a “enfocar” la partícula de inactivación en la región externa del sitio de unión, que también se encuentra cargada (Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993a; Murrell-Lagnado y Aldrich, 1993b; Toro y col., 1994).

El extremo N-terminal de $\beta 1\Delta$ Loop (y de $\beta 1$) muestra cuatro aminoácidos hidrófobos (LVMA) a partir de la posición cinco desde el N terminal, que podrían actuar como la partícula de inactivación, sin embargo esta secuencia se encuentra antecedida y precedida por dos aminoácidos cargados (Figura 33). Es interesante notar que las otras partículas de inactivación no tienen residuos cargados anteriores a la “bola” (con

ShB	M	A	A	V	A	G	L	Y	G	L	G	E	D	R	Q	H	R	K	K	Q
ShC	M	Q	M	I	L	V	A	G	G	S	L	P	K	S	S	G	D	E	E	G
ShD	M	T	M	W	Q	S	G	G	M	G	G	H	G	S	Q	N	N	P	W	N
Kv β 1.1	M	Q	V	S	I	A	C	T	E	H	N	L	K	S	R	N	G	E	D	R
Kv3.4	N	I	S	S	V	C	V	S	S	Y	R	G	K	K	S	G	N	K	P	P
Kv1.4	M	E	V	A	M	V	S	A	E	S	S	G	C	N	S	H	M	P	Y	G
Kv1.4(Δ 2-39)	M	A	A	A	L	A	V	A	A	A	T	A	A	V	E	G	T	G	G	S
BK β 2	M	F	I	W	T	S	G	R	T	S	S	S	Y	R	H	D	E	K	R	N
BK β 3b	M	T	A	F	P	A	S	G	K	K	R	E	T	D	Y	S	D	G	D	P
BK β 1	M	V	K	K	L	V	M	A	Q	K	R	G	E	T	R	A	L	C	L	

Figura 33. Extremos N-terminales de diferentes subunidades de canales de potasio que sufren inactivación.

Aminoácidos con cargas positivas en azul, y cargas negativas en rojo.

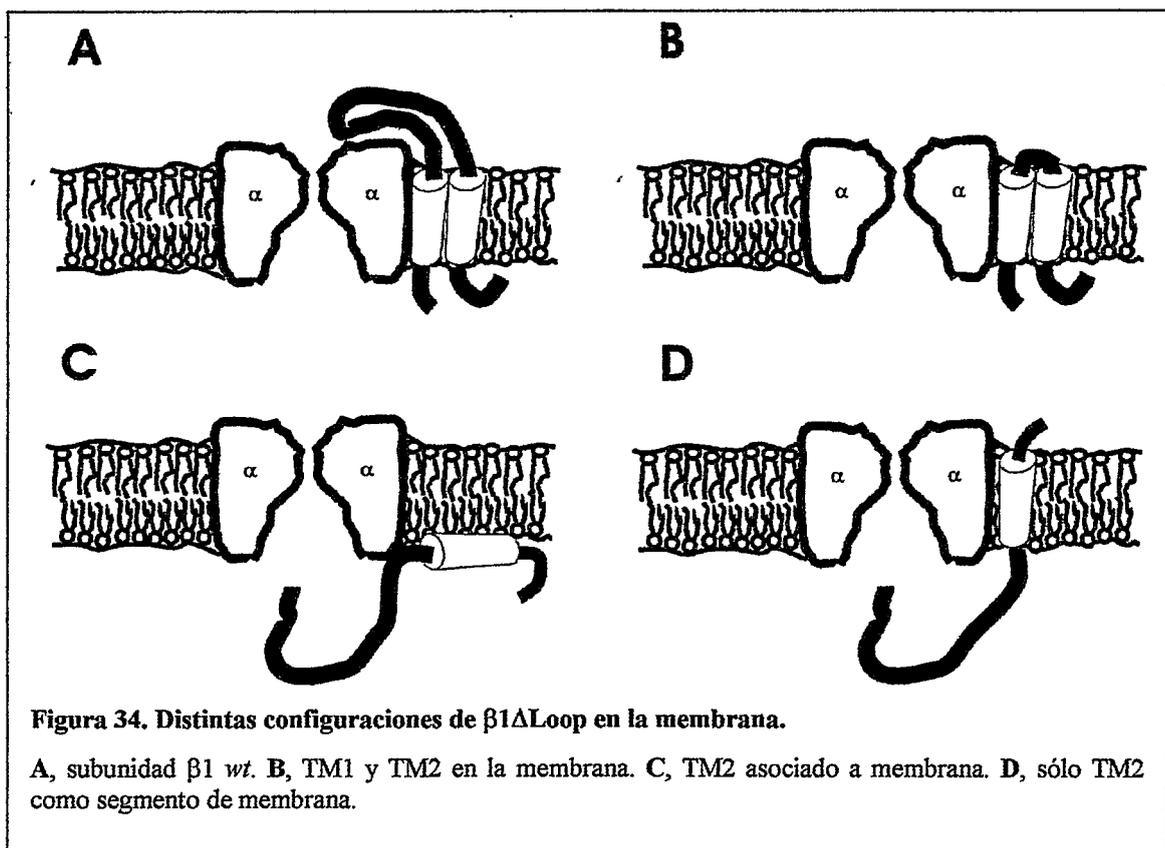
excepción de Kv1.4). Sin embargo, recientemente se ha mostrado que la cavidad interna de BK tiene dimensiones mayores que las de otros canales de potasio, debido a que permite el cierre del canal con bloqueadores de gran tamaño (Li y Aldrich, 2004). Esto

sugeriría que en ella podría entrar una “bola” de mayores dimensiones y cargada. Así, la presencia de cargas positivas en la “bola” de $\beta 1\Delta$ Loop podría estar estabilizada por una mayor cantidad de moléculas de agua presentes en la cavidad interna de BK, comparada a la de otros Kv.

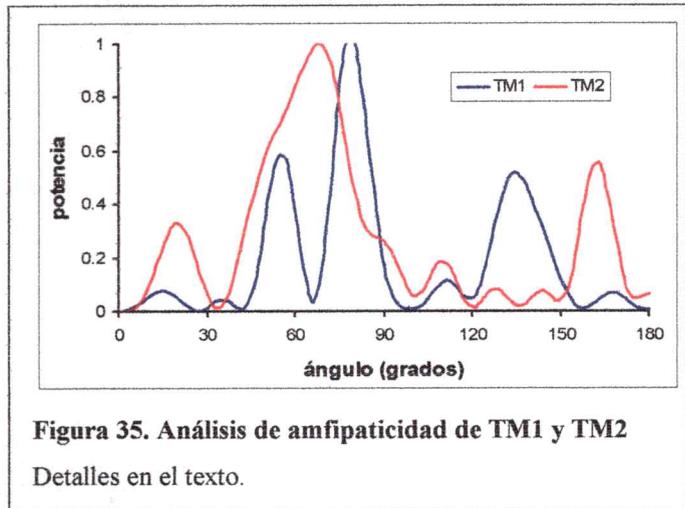
En el caso de la subunidad $\beta 2$ se ha determinado que los residuos FIW en el extremo N-terminal son los responsables de la inactivación (Xia y col., 2003). Al aumentar la longitud del N terminal (distancia desde la metionina inicial hasta TM1) la inactivación se hace más lenta, ya que se aumenta la distancia entre el bloqueador y el poro del canal. Subunidades $\beta 2$ con extremos N-terminales menores a 13 residuos no mostraron inactivación, mientras que las mayores a este valor sí lo hicieron, lo que hace pensar en esta longitud como un “límite estructural” para dicho proceso en esa subunidad (Xia y col., 2003).

Es interesante notar que $\beta 2$ y $\beta 3b$ (que presentan inactivación) tienen un N-terminal de 46 y 35 aminoácidos respectivamente, mientras que $\beta 1$ y $\beta 4$ (que no presentan inactivación) sólo tienen 15 y 17 respectivamente. Ya que $\beta 1$ y $\beta 4$ se encuentran cerca al valor de 13 aminoácidos, es probable que ésta longitud sea responsable de que ambas subunidades carezcan de inactivación.

Esta evidencia podría proveer una base para explicar el proceso de inactivación producido por $\beta 1\Delta Loop$. Debido a que $\beta 1\Delta Loop$ posee 15 aminoácidos en su N-terminal, entonces la presencia de inactivación estaría sugiriendo que el extremo N-terminal de $\beta 1\Delta Loop$ tiene más que los supuestos 15 residuos, eliminando la posibilidad de la conformación de la Figura 34B. Si se piensa que el mutante $\beta 1\Delta Loop$ haya



traspasado los residuos de transmembrana de TM1 al medio intracelular, el N-terminal tendría una longitud de 35 residuos (Figura 34C-D). Esto implicaría que el segmento TM2 tuviera una orientación inversa a la propuesta para la subunidad *wt* (con el



extremo C-terminal en el medio extracelular, Figura 34D), o que éste fuera un segmento asociado a membrana (Figura 34C). En ambos casos TM1 sería totalmente intracelular. Para poder elegir entre estas dos posibilidades, se realizó un análisis de periodicidad con transformada de Fourier de los valores de hidrofobicidad de los aminoácidos de TM1 y TM2. Este análisis no mostró periodicidad en ninguno de los segmentos, visto como ausencia de un pico a 100° (Figura 35), lo que sugiere que no se tratan de segmentos anfipáticos y por consiguiente es poco probable que sean segmentos asociados a membrana. O sea deberían ser de segmentos de transmembrana o solubles. Este último argumento sugiere que la configuración más probable sería TM2 insertado en membrana, invertido con respecto a la subunidad *wt* (Figura 34D).

4 Lecciones acerca del funcionamiento de BK

Un resultado claro de este trabajo es el haber mostrado que la eliminación de residuos de cisteína de la región extracelular de la subunidad $\beta 1$, los cuales alteran la

estructura, no afecta la modulación que esta subunidad le otorga al canal. La reducción química de los puentes disulfuro que forman estos residuos tampoco modificó el efecto de esta subunidad sobre el canal. Ambos resultados sugieren que parte de la estructura de la región extracelular no es importante para el efecto de la subunidad $\beta 1$.

Este cambio de estructura por las mutaciones tampoco afectó la conductancia de canal abierto, la cual es afectada por la presencia de otras subunidades β , posiblemente porque estas forman parte de la vía de conducción.

La eliminación de partes de la región extracelular de $\beta 1$ no produjo subunidades funcionales. La co-expresión de la subunidad α con el mutante $\beta 1\Delta\text{Loop}$ produjo una región de inactivación. Esto implica que su inserción en la membrana es diferente a la subunidad $\beta 1$ wt. Esto apunta a un rol estructural de la región extracelular de la subunidad $\beta 1$.

Los resultados con la quimera $\beta 1L\beta 4$ sugieren que la modulación de la sensibilidad a calcio se encuentra asociada a los segmentos de transmembrana y los extremos N y C terminales. Esto reafirma la idea de que los efectos de la subunidad $\beta 1$ radican en sus segmentos de transmembrana o sus extremos intracelulares.

El cuadro de BK que aparece con estos resultados es que el rol de la región extracelular de la subunidad $\beta 1$ es más bien estructural, y es el de mantener al resto de la proteína en una conformación adecuada para interactuar funcionalmente con la subunidad α .

APENDICE 1

Sistema de registro: Patch-Clamp.

Esquema eléctrico de la membrana plasmática.

La membrana plasmática puede representarse como un condensador (bicapa lipídica) en paralelo con varias resistencias (conductancias iónicas), que se encuentran en serie con una pila (fuerza electromotriz de cada ion). Para registrar la actividad de los canales iónicos presentes en la membrana, es necesario mantenerla a un voltaje constante, para lo que se usa un sistema de potencial controlado llamado "voltage clamp". Un "voltage clamp" ideal consiste de una batería, un cable, un interruptor, una célula, y un amperímetro. Ya que el cable tiene cero resistencia, el potencial de membrana cambia al valor de la pila al cerrar el interruptor, y el amperímetro mide la corriente. Sin embargo esta situación no es aplicable en registros en células debido a varios factores: los elementos conductores tienen resistencia finita, la capacidad de respuesta de los componentes es limitada tanto en tiempo como en frecuencia, los amperímetros tienen resistencia mayor a cero, entre otros. Por estas razones se utiliza un

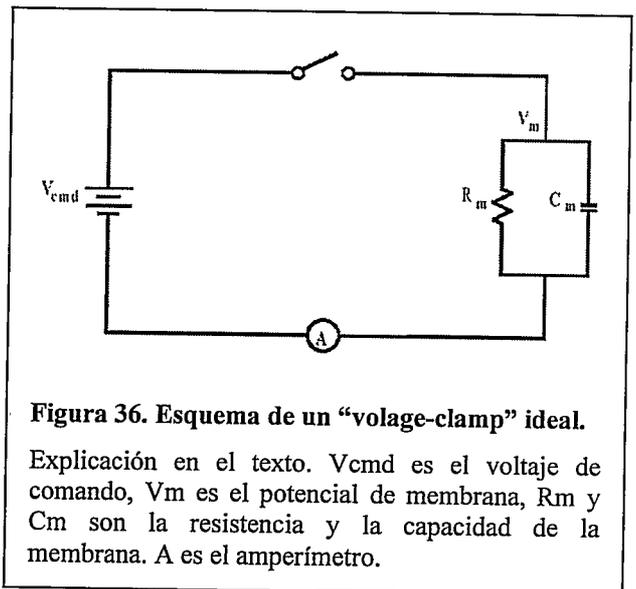


Figura 36. Esquema de un "voltage-clamp" ideal.

Explicación en el texto. V_{cmd} es el voltaje de comando, V_m es el potencial de membrana, R_m y C_m son la resistencia y la capacidad de la membrana. A es el amperímetro.

sistema de control de potencial dinámico, basado en elementos activos y no pasivos, como se discutirá a continuación.

Registro de corriente

Para registrar la corriente a través de los canales BK se utilizó la técnica de “voltage clamp” en su modalidad “patch-clamp”, que consiste en mantener un parche de membrana plasmática a un voltaje controlado, y registrar la corriente. Para controlar el voltaje se usó un convertor corriente-voltaje, cuyo elemento central es un amplificador operacional (OPA, “operational amplifier”). Un esquema de este circuito se encuentra en la Figura 37. Este convertor se encarga de entregar un voltaje de salida (V_o) que es proporcional a la corriente que registra el instrumento.

El OPA tiene una impedancia de entrada muy alta permitiendo la detección de corrientes muy pequeñas. El electrodo se inserta en la entrada inversora (V^-) del OPA (A1, Figura 37), y el potencial de comando (V_{cmd}) se aplica a la entrada no inversora (V^+). La salida (V_o) se encuentra conectada a la entrada inversora (V^-) en un lazo de

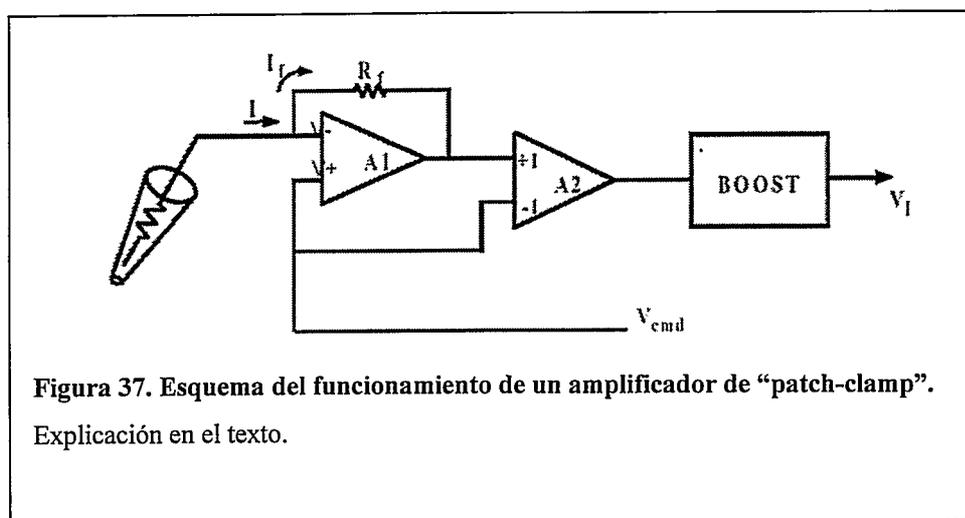


Figura 37. Esquema del funcionamiento de un amplificador de “patch-clamp”.

Explicación en el texto.

retroalimentación negativa, lo que hace que $V_- = V_+$ (Sherman-Gold, 1993). Esto significa que el potencial en V_- y en el electrodo se encuentren al valor de V_{cmd} . Para que esto ocurra, el amplificador debe inyectar corriente desde V_o , que se dirige hacia el electrodo, pasando por la resistencia de retroalimentación (R_f). La corriente que pasa por el circuito es :

$$I = \frac{(V_{cmd} - V_o)}{R_f}$$

lo que implica que el voltaje a la salida del circuito es:

$$V_o = -I * R_f + V_{cmd}$$

donde el voltaje a la salida depende de la corriente que pasa por el circuito, más el voltaje de comando. La señal se pasa por un amplificador diferencial (A2), el cual resta el valor de V_{cmd} para obtener un voltaje que es:

$$V = -I * R_f .$$

Sin embargo, este circuito es también un filtro pasa bajos, con una constante de tiempo de aproximadamente 10 ms, dada por los valores de R_f y C_m (capacidad de la membrana). Esto limita la resolución temporal del conversor I-V. Para remediar esto, la señal pasó a través de un "high frequency booster" (BOOST en Figura 37), el cual recupera la señal en los dominios del tiempo y la frecuencia. Explicaciones técnicas de este circuito pueden encontrarse en (Sigworth, 1995; Sherman-Gold, 1993)

Compensación de corrientes capacitivas

La pipeta de registro actúa como condensador, ya que el vidrio es un dieléctrico que separa dos medios con partículas cargadas (solución extracelular y de pipeta). Por

tal razón, al comportarse la membrana y la pipeta como condensadores, al aplicar un pulso cuadrado de voltaje se produce una corriente transitoria de carga de estos condensadores. Esta corriente “capacitiva” debe ser eliminada de los registros..

Para eliminar la corriente capacitiva, se inyecta por una vía paralela al circuito una

corriente de igual forma y magnitud que esta, de modo que no es registrado por el amplificador. Para esto se modifica el voltaje de comando con el circuito de la Figura 38, donde cada una de las resistencias variables corresponde a un potenciómetro. La señal modificada se hace pasar por el condensador C1, lo que genera una corriente de igual magnitud a la producida por Cp, lo que produce su cancelación. Los potenciómetros se mueven hasta que la corriente capacitiva desaparezca de la salida del conversor corriente voltaje.

Resistencia en serie

En el circuito del “patch-clamp” el potencial de membrana se controla mediante el mismo electrodo que inyecta la corriente que circula a través de los canales presentes

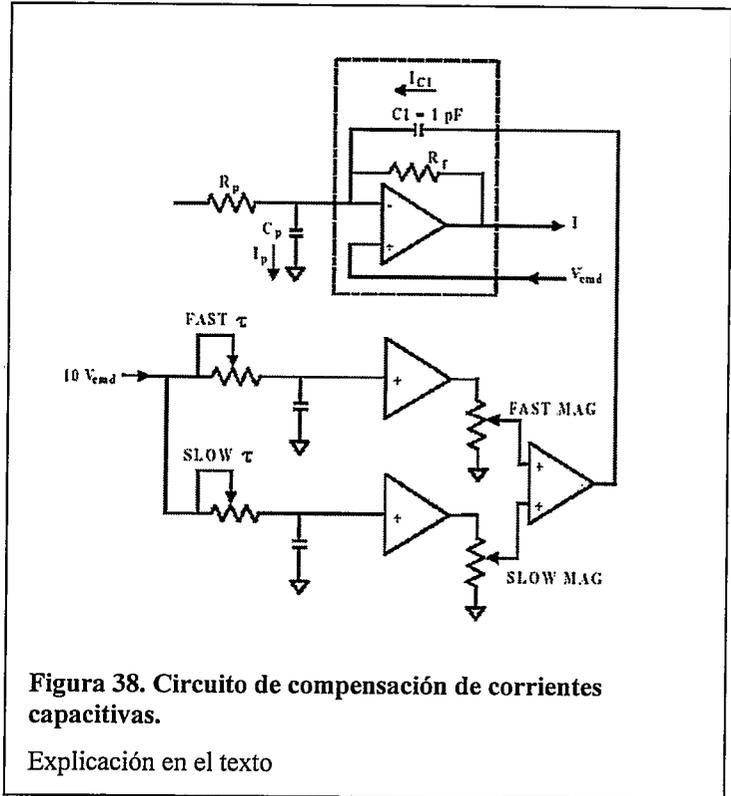


Figura 38. Circuito de compensación de corrientes capacitivas.

Explicación en el texto

en la membrana. Esto significa que no se puede conocer el potencial "real" de la membrana. En este sistema el potencial de membrana (V_m) corresponde al voltaje de comando (V_{cmd}) menos la caída de voltaje producida por la resistencia en serie (V_{rs}):

$$V_m = V_{cmd} - V_{rs} \text{ donde } V_m = I_m * R_m$$

siendo I_m la corriente, y R_m la resistencia de la membrana. Dada la naturaleza del circuito, tenemos:

$$V_{rs} = I_m * R_s$$

por lo que el potencial de membrana será:

$$V_m = V_{cmd} - I_m * R_s$$

Por lo tanto es de vital importancia mantener el valor de V_{rs} lo más bajo posible. Al hacer la razón de V_m y V_{rs} tenemos

$$\frac{V_{rs}}{V_m} = \frac{R_s}{R_m}$$

Esto significa que para que V_{rs} sea muy bajo con respecto a V_m , el valor de R_s debe ser mucho menor que la resistencia de la membrana (R_m). La resistencia en serie (R_s) está determinada principalmente por el tamaño y forma de la pipeta de registro. Para disminuir el valor de R_s se utilizó pipetas de baja resistencia (1-2 $M\Omega$) y se registró corrientes menores a 5 nA a 200 mV, que corresponde a una R_m de 40 $M\Omega$. Los valores de R_s rondaron los 2 $M\Omega$, lo que significa que $V_{rs}/V_m = 1/20$, lo que corresponde a un error de 5 % en el voltaje aplicado. Este error introducido en la resistencia en serie no fue corregido.

REFERENCIAS

- Abbott, G. W. y Goldstein, S. A. (1998). A superfamily of small potassium channel subunits: form and function of the MinK-related peptides (MiRPs). *Q.Rev.Biophys.* 31:357-398.
- Abbott, G. W. y Goldstein, S. A. (2001). Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the MinK-related peptides (MiRPs). *Mol.Interv.* 1:95-107.
- 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.
- Aldrich, R. W. (2001). Fifty years of inactivation. *Nature* 411:643-644.
- Arikkath, J. y Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr.Opin.Neurobiol.* 13:298-307.
- 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 BK(Ca) channel's high-affinity Ca^{2+} sensitivity. *J.Gen.Physiol* 120:173-189.
- Barrett, J. N., Magleby, K. L., y Pallotta, B. S. (1982). Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J.Physiol* 331:211-230.

- Begenisich, T. (1994). Permeation Properties of Cloned K^+ Channels. En Handbook of Membrane Channels. Molecular and Cellular Physiology., ed. Peracchia, C., ed. pp. 17-28. Academic Press, San Diego.
- 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. y Armstrong, C. M. (1977). Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. J.Gen.Physiol 70:549-566.
- Bhattacharjee, A., Joiner, W. J., Wu, M., Yang, Y., Sigworth, F. J., y Kaczmarek, L. K. (2003). Slick (Slo2.1), a rapidly-gating sodium-activated potassium channel inhibited by ATP. J.Neurosci. 23:11681-11691.
- Bian, S., Favre, I., y Moczydlowski, E. (2001). Ca^{2+} -binding activity of a COOH-terminal fragment of the Drosophila BK channel involved in Ca^{2+} -dependent activation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98:4776-4781.
- Brelidze, T. I., Niu, X., y Magleby, K. L. (2003). A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100:9017-9022.
- Brenner, R., 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., Perez, 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 beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. Nature 407:870-876.
- Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D. P., Wei, A., y Salkoff, L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. Science 261:221-224.
- Campbell, J. D., Sansom, M. S., y Ashcroft, F. M. (2003). Potassium channel regulation. EMBO Rep. 4:1038-1042.

Coetzee W, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal M, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, y Rudy B (1999). Molecular Diversity of K^+ Channels. En *Molecular and Functional Diversity of Ion Channels and Receptors*, eds. Rudy B y Seeburg P, ed. pp. 233-285. New York Academy of Sciences, New York.

Cohen, B. E., Grabe, M., y Jan, L. Y. (2003). Answers and questions from the KvAP structures. *Neuron* 39:395-400.

Cox, D. H. y Aldrich, R. W. (2000). Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca^{2+} sensitivity. *J.Gen.Physiol* 116:411-432.

Cox, D. H., Cui, J., y Aldrich, R. W. (1997a). Allosteric gating of a large conductance Ca -activated K^+ channel. *J.Gen.Physiol* 110:257-281.

Cox, D. H., Cui, J., y Aldrich, R. W. (1997b). Separation of gating properties from permeation and block in mslo large conductance Ca -activated K^+ channels. *J.Gen.Physiol* 109:633-646.

Cui, J. y Aldrich, R. W. (2000). Allosteric linkage between voltage and Ca^{2+} -dependent activation of BK-type mslo1 K^+ channels. *Biochemistry* 39:15612-15619.

Cui, J., Cox, D. H., y Aldrich, R. W. (1997). Intrinsic voltage dependence and Ca^{2+} regulation of mslo large conductance Ca -activated K^+ channels. *J.Gen.Physiol* 109:647-673.

Diaz, F., Wallner, M., Stefani, E., Toro, L., y Latorre, R. (1996). Interaction of internal Ba^{2+} with a cloned Ca^{2+} -dependent K^+ (hslo) channel from smooth muscle. *J.Gen.Physiol* 107:399-407.

Diaz, 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. *Journal of Biological Chemistry* 273:32430-32436.

Dick, G. M. (2002). The pure anti-oestrogen ICI 182,780 (Faslodex) activates large conductance Ca^{2+} -activated 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 beta1 subunit: a study of beta1 knockout mice. *J.Biol.Chem.* 276:44835-44840.
- Ding, J. P., Li, Z. W., y Lingle, C. J. (1998). Inactivating BK channels in rat chromaffin cells may arise from heteromultimeric assembly of distinct inactivation-competent and noninactivating subunits. *Biophys.J.* 74:268-289.
- Dolphin, A. C. (2003). Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J.Bioenerg.Biomembr.* 35:599-620.
- 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 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 hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J.Neurosci.* 16:4543-4550.
- Eghbali, M., Toro, L., y Stefani, E. (2003). Diminished surface clustering and increased perinuclear accumulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in mouse myometrium with pregnancy. *J.Biol.Chem.* 278:45311-45317.
- Elkins, T., Ganetzky, B., y Wu, C. F. (1986). A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:8415-8419.

Gollasch, M., Lohn, M., Furstenau, M., Nelson, M. T., Luft, F. C., y Haller, H. (2000). Ca^{2+} channels, Ca^{2+} sparks, and regulation of arterial smooth muscle function. *Z.Kardiol.* 89 Suppl 2:15-19.

Gonzalez, C., Rosenman, E., Bezanilla, F., Alvarez, O., y Latorre, R. (2000). Modulation of the Shaker K^+ channel gating kinetics by the S3-S4 linker. *J.Gen.Physiol* 115:193-208.

Gutman, G. A., Chandy, K. G., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., Covarriubias, M., Desir, G. V., Furuichi, K., Ganetzky, B., Garcia, M. L., Grissmer, S., Jan, L. Y., Karschin, A., Kim, D., Kuperschmidt, S., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Lesage, F., Lester, H. A., McKinnon, D., Nichols, C. G., O'Kelly, I., Robbins, J., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M., Seino, S., Stuehmer, W., Tamkun, M. M., Vandenberg, C. A., Wei, A., Wulff, H., y Wymore, R. S. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol.Rev.* 55:583-586.

Ha, T. S., Heo, M. S., y Park, C. S. (2004). Functional effects of auxiliary beta4-subunit on rat large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Biophys.J.* 86:2871-2882.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., y Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.

Hanlon, M. R. y Wallace, B. A. (2002). Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry* 41:2886-2894.

Hanner, M., Vianna-Jorge, R., Kamassah, A., Schmalhofer, W. A., Knaus, H. G., Kaczorowski, G. J., y Garcia, M. L. (1998). The beta subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel. Identification of residues involved in charybdotoxin binding. *J.Biol.Chem.* 273:16289-16296.

Herrera, G. M., Heppner, T. J., y Nelson, M. T. (2001). Voltage dependence of the coupling of Ca^{2+} sparks to BK_{Ca} channels in urinary bladder smooth muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 280:C481-C490.

Hille B (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*, third ed. Sinauer Associates, Inc.

Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. (1952a). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J.Physiol* 117:500-544.

Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. (1952b). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J.Physiol* 116:449-472.

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.

Hu, S., Labuda, M. Z., Pandolfo, M., Goss, G. G., McDermid, H. E., y Ali, D. W. (2003). Variants of the KCNMB3 regulatory subunit of maxi BK channels affect channel inactivation. *Physiol Genomics* 15:191-198.

Hurst, R. S., Kavanaugh, M. P., Yakel, J., Adelman, J. P., y North, R. A. (1992). Cooperative interactions among subunits of a voltage-dependent potassium channel. Evidence from expression of concatenated cDNAs. *Journal of Biological Chemistry* 267:23742-23745.

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.

Jaggar, J. H., Wellman, G. C., Heppner, T. J., Porter, V. A., Perez, G. J., Gollasch, M., Kleppisch, T., Rubart, M., Stevenson, A. S., Lederer, W. J., Knot, H. J., Bonev, A. D., y Nelson, M. T. (1998). Ca^{2+} channels, ryanodine receptors and Ca^{2+} -activated K^{+} channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol Scand.* 164:577-587.

Jan, L. Y. y Jan, Y. N. (1997). Ways and means for left shifts in the MaxiK channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:13383-13385.

Jaramillo, A. M., Zheng, X., Zhou, Y., Amado, D. A., Sheldon, A., Sehgal, A., y Levitan, I. B. (2004). Pattern of distribution and cycling of SLOB, Slowpoke channel binding protein, in *Drosophila*. *BMC.Neurosci.* 5:3.

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

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., y MacKinnon, R. (2002b). The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417:523-526.

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., y Levitan, I. B. (2002a). Reciprocal modulation between the alpha and beta 4 subunits of hSlo calcium-dependent potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 277:43724-43729.

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

Johnson, D. y Wu, S. (1995). *Foundations of Cellular Neurophysiology* The MIT Press, Cambridge, London.

Jones, E. M., Gray-Keller, M., y Fettiplace, R. (1999). The role of Ca^{2+} -activated K^+ channel spliced variants in the tonotopic organization of the turtle cochlea. *J.Physiol* 518 (Pt 3):653-665.

Jones, E. M., Laus, C., y Fettiplace, R. (1998). Identification of Ca^{2+} -activated K^+ channel splice variants and their distribution in the turtle cochlea. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 265:685-692.

Keynes, R. D. y Rojas, E. (1973). Characteristics of the sodium gating current in the squid giant axon. *J.Physiol* 233:28P-30P.

Knaus, H. G., Eberhart, A., Kaczorowski, G. J., y Garcia, M. L. (1994). Covalent attachment of charybdotoxin to the beta-subunit of the high conductance Ca^{2+} -activated

K⁺ channel. Identification of the site of incorporation and implications for channel topology. *J.Biol.Chem.* 269:23336-23341.

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. *Journal of Biological Chemistry* 269:20347-20351.

Langer, P., Grunder, S., y Rusch, A. (2003). Expression of Ca²⁺-activated BK channel mRNA and its splice variants in the rat cochlea. *Journal of Comparative Neurology* 455:198-209.

Latorre, R. y Alvarez, O. (1996). Vías y modelos de transporte a través de membranas. En *Biofísica y Fisiología Celular*, eds. Latorre, R., López-Barneo J, Bezanilla, F., y Llinás R, Universidad de Sevilla, Sevilla.

Latorre, R., López-Barneo, J., BEzanilla, F., y Llinás, R. (1996). *Biofísica y Fisiología Celular* Universidad de Sevilla, Sevilla.

Latorre, R., Vergara, C., y Hidalgo, C. (1982). Reconstitution in planar lipid bilayers of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel from transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 79:805-809.

Lewis, A., McCrossan, Z. A., y Abbott, G. W. (2004). MinK, MiRP1, and MiRP2 diversify Kv3.1 and Kv3.2 potassium channel gating. *Journal of Biological Chemistry* 279:7884-7892.

Li, W. y Aldrich, R. W. (2004). Unique inner pore properties of BK channels revealed by quaternary ammonium block. *J.Gen.Physiol* 124:43-57.

Li, Z. W., Ding, J. P., Kalyanaraman, V., y Lingle, C. J. (1999). RINm5f cells express inactivating BK channels whereas HIT cells express noninactivating BK channels. *J.Neurophysiol.* 81:611-624.

Lim, H. H., Park, B. J., Choi, H. S., Park, C. S., Eom, S. H., y Ahn, J. (1999). Identification and characterization of a putative *C. elegans* potassium channel gene (*Ce-slo-2*) distantly related to Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Gene* 240:35-43.

Liman, E. R., Tytgat, J., y Hess, P. (1992). Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9:861-871.

Lingle, C. J., Zeng, X. H., Ding, J. P., y Xia, X. M. (2001). Inactivation of BK channels mediated by the NH(2) terminus of the beta3b auxiliary subunit involves a two-step mechanism: possible separation of binding and blockade. *J.Gen.Physiol* 117:583-606.

Liu, X., Chang, Y., Reinhart, P. H., Sontheimer, H., y Chang, Y. (2002). Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J.Neurosci.* 22:1840-1849.

MacKinnon, R. (1991). Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232-235.

MacKinnon, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Lett.* 555:62-65.

Magleby, K. L. (2001). Kinetic gating mechanisms for BK channels: when complexity leads to simplicity. *J.Gen.Physiol* 118:583-587.

McCobb, D. P., Fowler, N. L., Featherstone, T., Lingle, C. J., Saito, M., Krause, J. E., y Salkoff, L. (1995). A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle. *Am.J.Physiol* 269:H767-H777.

McCrossan, Z. A., Lewis, A., Panaghie, G., Jordan, P. N., Christini, D. J., Lerner, D. J., y Abbott, G. W. (2003). MinK-related peptide 2 modulates Kv2.1 and Kv3.1 potassium channels in mammalian brain. *J.Neurosci.* 23:8077-8091.

Meera, P., Wallner, M., Jiang, Z., y Toro, L. (1996). A calcium switch for the functional coupling between alpha (hslo) and beta subunits (KV,Ca beta) of maxi K channels. *FEBS Lett.* 382:84-88.

Meera, P., Wallner, M., Song, M., y Toro, L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc.Natl.Acad.Sci.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 Ca^{2+} -activated K^+ channel resistant to charybdotoxin and iberiotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:5562-5567.

Melman, Y. F., Krummerman, A., y McDonald, T. V. (2002). KCNE regulation of KvLQT1 channels: structure-function correlates. *Trends Cardiovasc.Med.* 12:182-187.

Meredith, A. L., Thorneloe, K. S., Werner, M. E., Nelson, M. T., y Aldrich, R. W. (2004). Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca^{2+} - activated K^+ channel. *Journal of Biological Chemistry*.

Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., y MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K^+ selectivity filter. *Nature* 414:37-42.

Moss, B. L. y Magleby, K. L. (2001). Gating and conductance properties of BK channels are modulated by the S9-S10 tail domain of the alpha subunit. A study of mSlo1 and mSlo3 wild-type and chimeric channels. *J.Gen.Physiol* 118:711-734.

Munujos, P., Knaus, H. G., Kaczorowski, G. J., y Garcia, M. L. (1995). Cross-linking of charybdotoxin to high-conductance calcium-activated potassium channels: identification of the covalently modified toxin residue. *Biochemistry* 34:10771-10776.

Murrell-Lagnado, R. D. y Aldrich, R. W. (1993a). Energetics of Shaker K channels block by inactivation peptides. *J.Gen.Physiol* 102:977-1003.

Murrell-Lagnado, R. D. y Aldrich, R. W. (1993b). Interactions of amino terminal domains of Shaker K channels with a pore blocking site studied with synthetic peptides. *J.Gen.Physiol* 102:949-975.

Nimigeon, C. M., Chappie, J. S., y Miller, C. (2003). Electrostatic tuning of ion conductance in potassium channels. *Biochemistry* 42:9263-9268.

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

- Nishida, M. y MacKinnon, R. (2002). Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 111:957-965.
- Orio, P. y Latorre, R. (2005). Differential Effects of $\beta 1$ and $\beta 2$ Subunits on BK Channel Activity. *J.Gen.Physiol* 124:395-411.
- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., y Latorre, R. (2002). New Disguises for an Old Channel: MaxiK Channel β -Subunits. *News Physiol Sci*. 17:156-161.
- Pallotta, B. S., Magleby, K. L., y Barrett, J. N. (1981). Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K^+ currents in rat muscle cell culture. *Nature* 293:471-474.
- Papassotiriou, J., Kohler, R., Prenen, J., Krause, H., Akbar, M., Eggermont, J., Paul, M., Distler, A., Nilius, B., y Hoyer, J. (2000). Endothelial K^+ channel lacks the Ca^{2+} sensitivity-regulating beta subunit. *FASEB J*. 14:885-894.
- Petkov, G. V., Bonev, A. D., Heppner, T. J., Brenner, R., Aldrich, R. W., y Nelson, M. T. (2001). $\beta 1$ -Subunit of the Ca^{2+} -activated K^+ channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle. *J.Physiol* 537:443-452.
- Pourrier, M., Schram, G., y Nattel, S. (2003). Properties, expression and potential roles of cardiac K^+ channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J.Membr.Biol*. 194:141-152.
- Pozo, M. J., Perez, G. J., Nelson, M. T., y Mawe, G. M. (2002). Ca^{2+} sparks and BK currents in gallbladder myocytes: role in CCK-induced response. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 282:G165-G174.
- Qu, J., Kryukova, Y., Potapova, I. A., Doronin, S. V., Larsen, M., Krishnamurthy, G., Cohen, I. S., y Robinson, R. B. (2004). MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*.
- Quirk, J. C. y Reinhart, P. H. (2001). Identification of a novel tetramerization domain in large conductance K_{Ca} channels. *Neuron* 32:13-23.

- Rosenblatt, K. P., Sun, Z. P., Heller, S., y Hudspeth, A. J. (1997). Distribution of Ca^{2+} -activated K^+ channel isoforms along the tonotopic gradient of the chicken's cochlea. *Neuron* 19:1061-1075.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 272:11710-11717.
- Sambrook, J. y Russel, D. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schneider, M. F. y Chandler, W. K. (1973). Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242:244-246.
- 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. y Salkoff, L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys.J.* 73:1355-1363.
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., y Salkoff, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K^+ channel from mammalian spermatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273:3509-3516.
- Schreiber, M., Yuan, A., y Salkoff, L. (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat.Neurosci.* 2:416-421.
- Sherman-Gold, R. (1993). Instrumentation for Measuring Bioelectric Signals from Cells. En *The Axon Guide.*, ed. Sherman-Gold, R.,ed. pp. 25-80. Axon Instruments.
- Shi, J., Krishnamoorthy, G., Yang, Y., Hu, L., Chaturvedi, N., Harilal, D., Qin, J., y Cui, J. (2002). Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels. *Nature* 418:876-880.

Shih, T., Smith, R., Toro, L., y Goldin, A. (1998). High-Level Expression and Detection of Ion Channels in *Xenopus* Oocytes. En *Methods in Enzymology*, ed. Conn, P., ed. pp. 529-556. Academic Press.

Sigworth, F. J. (1995). Electronic Design of the Patch Clamp. En *Single Channel Recording*, eds. Sakmann, B. y Neher, E., ed. pp. 95-128. Plenum Press, New York.

Smith, S. W. (1997). *The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing* California Technical Publishing.

Solaro, C. R., Ding, J. P., Li, Z. W., y Lingle, C. J. (1997). The cytosolic inactivation domains of BK_i channels in rat chromaffin cells do not behave like simple, open-channel blockers. *Biophys.J.* 73:819-830.

Solaro, C. R. y Lingle, C. J. (1992). Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science* 257:1694-1698.

Solaro, C. R., Prakriya, M., Ding, J. P., y Lingle, C. J. (1995). Inactivating and noninactivating Ca²⁺- and voltage-dependent K⁺ current in rat adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 15:6110-6123.

Soto, M. A., Gonzalez, C., Lissi, E., Vergara, C., y Latorre, R. (2002). Ca²⁺-activated K⁺ channel inhibition by reactive oxygen species. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 282:C461-C471.

Stefani, E., Ottolia, M., Noceti, F., Olcese, R., Wallner, M., Latorre, R., y Toro, L. (1997). Voltage-controlled gating in a large conductance Ca²⁺-sensitive K⁺ channel (hsl_o). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:5427-5431.

Stuhmer, W. y Latorre, R. (1996). Biología molecular de los Canales Iónicos. En *Biofísica y Fisiología celular*, eds. Latorre, R. y López-Barneo, J., ed. pp. 285-310. Universidad de Sevilla, Sevilla.

Talukder, G. y Aldrich, R. W. (2000). Complex voltage-dependent behavior of single unliganded calcium-sensitive potassium channels. *Biophys.J.* 78:761-772.

Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus, H. G., y Toro, L. (1997). Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J.Physiol* 502 (Pt 3):545-557.

Tang, X. D., Daggett, H., Hanner, M., Garcia, M. L., McManus, O. B., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H., y Hoshi, T. (2001). Oxidative regulation of large conductance calcium-activated potassium channels. *J.Gen.Physiol* 117:253-274.

Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M., y Barhanin, J. (2000). KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* 19:6326-6330.

Toro, L., Ottolia, M., Stefani, E., y Latorre, R. (1994). Structural determinants in the interaction of Shaker inactivating peptide and a Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Biochemistry* 33:7220-7228.

Toro, L., Stefani, E., y Latorre, R. (1992). Internal blockade of a Ca^{2+} -activated K^+ channel by Shaker B inactivating "ball" peptide. *Neuron* 9:237-245.

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 Ca^{2+} -activated 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 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 (hSlo) 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., Ottolia, M., Kaczorowski, G. J., Latorre, R., Garcia, M. L., Stefani, E., y Toro, L. (1995). Characterization of and modulation by a beta-subunit of a human maxi KCa channel cloned from myometrium. *Receptors.Channels* 3:185-199.

Zhang, X., Solaro, C. R., y Lingle, C. J. (2001a). 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, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S., y MacKinnon, R. (2001a). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411:657-661.

Zhou, Y., Fei, H., y Levitan, I. B. (2003a). An interaction domain in Slob necessary for its binding to the slowpoke calcium-dependent potassium channel. *Neuropharmacology* 45:714-719.

Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., y MacKinnon, R. (2001b). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414:43-48.

Zhou, Y., Reddy, S., Murrey, H., Fei, H., y Levitan, I. B. (2003b). Monomeric 14-3-3 protein is sufficient to modulate the activity of the *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 278:10073-10080.

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.

Zhou, Y., Wang, J., Wen, H., Kucherovsky, O., y Levitan, I. B. (2002). Modulation of *Drosophila* slowpoke calcium-dependent potassium channel activity by bound protein kinase a catalytic subunit. *J.Neurosci.* 22:3855-3863.