

11281

9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

MODULACIÓN DE CANALES DE CALCIO
TIPO N EN NEURONAS SIMPÁTICAS.

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR
SUBUNIDADES BETA DE LAS PROTEÍNAS G.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL. RAFAEL ERNESTO GARCÍA FERREIRO

DIRECTOR:
DR. DAVID E. GARCÍA DÍAZ



MÉXICO, D.F.
SEPTIEMBRE, 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis más grandes maestros:
mi padre, Rolando García
y María Juana

A mi esposa:
Michelle

*“¿Qué proceso electroquímico
habrá producido la idea
de que el pensamiento
es un proceso electroquímico?”*

M. Ende

“Every physiological teaching on the working of the brain based on localization, no matter how excellent, leaves us ignorant about the mechanism of mental activity. These actions are certainly accompanied by molecular modifications in nerve cells and preceded by complex changes in the relationship between neurones. To understand mental activity it is necessary to understand these molecular modifications and changes in neuronal relationships. One must know, of course, the complete and exact histology of cerebral centres and their tracts. But that is not enough; it will be necessary to know the energetic transformations of the nervous system which accompany perception and thought, consciousness and emotion.”

Don Santiago Ramon y Cajal, 1911

“It is now established that even in the simplest organisms, such as bacteria, complex circuits of regulation play an essential role, governing not only the rate of flow of metabolites through different pathways but also the synthesis of proteins and other macromolecules. Most of these control systems involve a sequence of reactions and interactions and their physiological diversity is extreme. However, in several instances the components of such systems have been resolved, allowing identification and study of the elementary controlling interaction. In virtually all of the systems which have been analysed in sufficient detail, this elementary interaction involves a protein endowed with a specific biological activity and an active agent, generally a low-molecular weight metabolite, in whose presence the specific process governed by this protein is either accelerated or inhibited.”

J. Monod, J. P. Changeux y F. Jacob, 1963

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	XVII
AGRADECIMIENTOS.....	XIX
1. ABREVIATURAS.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	11
3.1. MODULACIÓN NEGATIVA DE $CCDV_N$: MÚLTIPLES VÍAS DE INHIBICIÓN.....	17
3.1.1. Modulación Dependiente del Voltaje y del Tiempo.....	18
3.1.1.1. <i>Mecanismo de Acción de la Inhibición Dependiente de Voltaje de $CCDV_N$</i>	19
3.1.1.2. <i>El Modelo “willing-reluctant” y el Fenómeno de Facilitación de Corrientes de $CCDV_N$</i>	28
3.1.1.3. <i>Inhibición Tónica</i>	39
3.1.2. Vías de Inhibición de $CCDV_N$ Independientes de Voltaje.....	41
3.1.2.1. <i>Sustrato Bioquímico de la Inhibición Independiente de Voltaje de $CCDV_N$</i>	43
3.1.3. ¿Qué Determina la Especificidad de los Efectos de una Vía Inhibitoria de $CCDV_N$?.....	46
3.2. MODULACIÓN POSITIVA DE $CCDV_N$	48
3.2.1. Convergencia e Interferencia entre Vías Moduladoras de $CCDV_N$	49
3.2.2. Incremento en la Amplitud de Corrientes de $CCDV_N$ Inducido por PKC: ¿Regulación Positiva o Des-Inhibición Tónica?.....	51
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA... ..	55

5. HIPÓTESIS.....	61
5.1. HIPÓTESIS GENERAL.....	61
5.2. HIPÓTESIS PARTICULARES.....	62
6. OBJETIVOS.....	63
6.1. OBJETIVOS GENERALES.....	63
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	63
7. MÉTODOS.....	65
CULTIVOS NEURONALES.....	65
7.1.1. Preparación de Cultivos Primarios de Neuronas Simpáticas del SCG.....	68
7.2. REGISTRO DE LA CORRIENTE A TRAVÉS DE CCDV _N	72
7.2.1. Aislamiento de la Corriente de CCDV _N	72
7.2.1.1. <i>Solución Externa</i>	72
7.2.1.2. <i>Solución Interna</i>	75
7.2.1.3. “Rundown” de la Corriente de CCDV.....	77
7.2.2. Medición de las Corrientes y Análisis.....	78
7.3. SOBREEXPRESIÓN DE SUBUNIDADES Gβ.....	79
7.3.1. Microinyección Intranuclear del DNA que Codifica para Subunidades Gβγ.....	81
7.4. PREINCUBACIÓN CON PMA.....	83
8. RESULTADOS.....	85
8.1. CARACTERÍSTICAS DE LA CORRIENTE DE CCDV _N EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS SIMPÁTICAS DEL SCG DE RATAS ADULTAS JÓVENES.....	85
8.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES Gβ CAPACES DE INDUCIR INHIBICIÓN DE CCDV _N	87
8.3. EFECTOS PARADÓJICOS DE LAS SUBUNIDADES Gβ.....	93
8.4. LA ACTIVACIÓN DE LA PKC MIMETIZA LOS EFECTOS ESTIMULADORES INDUCIDOS POR SUBUNIDADES Gβ.....	97
8.5. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE LA PKC SOBRE EL COMPORTAMIENTO BASAL DE LAS CORRIENTES DE CCDV _N	101

8.5.1. Efectos del PMA y del GDPβS en la Amplitud y Curso Temporal de Corrientes en Estado Estacionario del Voltaje.....	101
8.5.2. Efectos del Incremento en la Inhibición Tónica sobre la Cinética de Activación de la Corriente.....	104
8.5.3. Efectos del PMA y del GDPβS en el Comportamiento Poblacional de los CCDV _N	106
8.5.4. Efectos del PMA en Células Dializadas con GDPβS.....	111
8.5.5. El Tratamiento con PMA Aumenta la Inactivación Dependiente de Voltaje.....	114
8.5.6. Efectos Específicos del PMA en CCDV _N	120
8.6. EFECTO DE LA NE EN NEURONAS CONTROL Y TRATADAS CON PMA.....	122
8.6.1. Efecto de la NE en la Amplitud y Curso Temporal de Corrientes en Estado Estacionario del Voltaje.....	123
8.6.2. Efecto de la NE sobre el Comportamiento Poblacional de los CCDV _N en Neuronas Control y en Neuronas Tratadas con PMA.....	125
8.7. EL TRATAMIENTO CON PMA Y LA ACTIVACIÓN DE PG INDUCEN EFECTOS OPUESTOS EN CORRIENTES DE CCDV _N	128
9. DISCUSIÓN.....	135
9.1. ¿HAY ESPECIFICIDAD DE LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE SUBUNIDADES Gβ EN LA REGULACIÓN INHIBITORIA?.....	136
9.1.1. Inhibición Independiente de Voltaje Inducida por Subtipos Específicos de Subunidades Gβ.....	138
9.2. ACTIVACIÓN DE LA PKC POR SUBUNIDADES Gβ.....	141
9.3. MODULACIÓN POSITIVA DE CCDV _N POR PKC.....	142
9.3.1. Naturaleza del Aumento en la Amplitud de Corrientes Inducido por PKC.....	143
9.3.2. Cambios Inducidos por la PKC en las Cinéticas de Activación e Inactivación..	147
9.4. LA ACTIVACIÓN DE LA PKC INTERFIERE CON LA INHIBICIÓN POR PG.....	151
9.5. ¿PUEDE COMPAGINARSE UN ESQUEMA CINÉTICO TENTATIVO PARA DAR CUENTA DE LOS FENÓMENOS OBSERVADOS?.....	154
9.6. SIGNIFICADO FUNCIONAL E IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS..	160
9.7 PERSPECTIVAS..	167

10. CONCLUSIONES.....	169
11. CONTRIBUCIÓN.....	171
12. APÉNDICES.....	173
I. CARACTERÍSTICAS DE LAS CORRIENTES QUE FLUYEN A TRAVÉS DE CCDV.....	173
I.1 Características Cinéticas.....	173
I.1.1. <i>Activación</i>	173
I.1.2. <i>Desactivación</i>	174
I.1.3. <i>Inactivación</i>	175
I.1.4. <i>Comportamiento Cinético de la Corriente a través de Canales Individuales</i>	177
I.2. La Corriente de Ca^{2+} en Neuronas no es Homogénea: Múltiples Tipos de CCDV.....	178
II. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CCDV.....	185
II.1. Dos Nuevas Clasificaciones para los CCDV Nacidas de la Biología Molecular.....	186
II.2. La Subunidad β	187
III. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EXTRACELULARES.....	190
III.1. Receptores Heptahelicales.....	190
III.2. Proteínas G.....	191
III.3. La PKC.....	194
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	199
14. ANEXOS: TRABAJOS PUBLICADOS.....	215
García DE, Li B, García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B (1998) G-Protein β -Subunit Specificity in the Fast Membrane-Delimited Inhibition of Ca^{2+} Channels. <i>The Journal of Neuroscience</i> 18:9163-9170.....	215

García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, García DE (2001) Modulation of N-type Ca^{2+} channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* (en prensa, publicado online el 6 de julio; DOI 10.1007/s004240100618).....223

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES, FIGURAS Y TABLAS

Ilustr. 1 Primer evidencia (indirecta) de la inhibición de CCDV neuronales inducida por neurotransmisores...	13
Ilustr. 2 Inhibición y enlentecimiento de corrientes de Ca^{2+} neuronales inducidos por neurotransmisores.....	19
Ilustr. 3 El heterodímero $\beta\gamma$ de las proteínas G es el mediador de la inhibición dependiente de voltaje de CCDV_N	25
Ilustr. 4 Complejo oligomérico de los CCDV neuronales.....	26
Ilustr. 5 Modelo de inhibición dependiente de voltaje por un mecanismo delimitado a la membrana.....	27
Ilustr. 6 La inhibición dependiente de voltaje resulta de un corrimiento en la dependencia de voltaje de la activación de los CCDV_N	29
Ilustr. 7 (A-B) El modelo willing-reluctant de la inhibición delimitada a membrana de los CCDV_N	31
Ilustr. 8 La inhibición dependiente de voltaje de CCDV_N es transitoriamente revertida por una fuerte y breve despolarización de la membrana.....	33
Ilustr. 9 Interconversión entre modos de apertura willing y reluctant inducida por la unión de $G\beta\gamma$ con la subunidad principal de los CCDV_N	39
Ilustr. 10 La inhibición independiente de voltaje corresponde a la porción de la inhibición total que no es revertida por un prepulso.....	41
Ilustr. 11 Estimulación de corrientes de CCDV_N y prevención de la inhibición inducida por neurotransmisores tras la activación directa de la PKC.....	49
Ilustr. 12 Convergencia de vías moduladoras en el loop I-II de la subunidad α_1 de CCDV_N	51
Ilustr. 13 Vías de señalización intracelular que convergen en la subunidad α_1 de los CCDV_N en neuronas simpáticas.....	55
Ilustr. 14 Alternancia entre modos de apertura inactivante y no-inactivante de CCDV_N	150
Ilustr. 15 (A-D) Modulaciones divergentes, antagónicas y confluentes de CCDV_N inducidas por subunidades $G\beta\gamma$	162
Ilustr. 16 Sobre-recuperación de corrientes de CCDV_N	163

Ilustr. 17	<i>Inhibición temprana y aumento tardío de corrientes de $CCDV_N$, en respuesta a la activación directa de proteínas G.....</i>	165
Ilustr. 18	<i>Contribuciones de los resultados que se han obtenido en esta tesis al diagrama general de la modulación bidireccional de $CCDV_N$ en neuronas simpáticas.....</i>	171
Fig. 1 (A-D)	<i>Caracterización farmacológica de la corriente estudiada.....</i>	86
Fig. 2 (A-F)	<i>Alteraciones en la facilitación basal inducida por la inyección intranuclear del DNA codificante para la subunidad $G\beta_2$.....</i>	88
Fig. 3 (A-G)	<i>Identificación de los subtipos de subunidades $G\beta$ que causan modulación dependiente de voltaje de las corrientes de Ca^{2+}.....</i>	90
Fig. 4 (A-F)	<i>Inhibición de la densidad de corriente independiente de potencial inducida por subunidades $G\beta$.....</i>	92
Fig. 5 (A-D)	<i>Diferentes fenotipos modulatorios inducidos por sobreconcentración de subunidades $G\beta$.....</i>	94
Fig. 6 (A-F)	<i>Covariación de las características fenotípicas distintivas de cada grupo de neuronas de la Fig. 5.....</i>	96
Fig. 7 (A-D)	<i>Los grupos 1 y 3, representan características extremas de modulación por subunidades $G\beta$.....</i>	85
Fig. 8 (A-F)	<i>El activador de la PKC, PMA, reproduce y magnifica las características estimuladoras observadas en el grupo 3.....</i>	98
Fig. 9 (A-G)	<i>Efectos del PMA y del $GDP\beta S$ en la relación corriente-voltaje y en la cinética de activación de corrientes totales de $CCDV_N$.....</i>	102
Fig. 10 (A-B)	<i>Aumento dependiente de voltaje y eliminación de la facilitación basal inducidos por PMA y $GDP\beta S$.....</i>	104
Fig. 11 (A-G)	<i>Efectos del aumento en el nivel de inhibición tónica, inducida por $GTP\gamma S$, en la relación corriente-voltaje y en la cinética de activación de corrientes totales de $CCDV_N$.....</i>	105
Fig. 12 (A-E)	<i>Efectos del PMA y del $GDP\beta S$ en las curvas de activación de corrientes de $CCDV_N$.....</i>	107
Fig. 13 (A-B)	<i>Aumento dependiente de potencial y eliminación de la facilitación basal en corrientes de cola inducidos por PMA y por $GDP\beta S$.....</i>	110
Fig. 14 (A-F)	<i>Efectos del PMA sobre las corrientes de $CCDV_N$ en células dializadas con $GDP\beta S$.....</i>	112
Fig. 15 (A-F)	<i>Efectos del PMA y del $GDP\beta S$ sobre la inactivación de estado estacionario de corrientes de $CCDV_N$.....</i>	115

Fig. 16 (A-D) Efectos del PMA y del GDP β S en la inactivación de la corriente de CCDV _N en estado estacionario del voltaje.....	118
Fig. 17 (A-E) La ω -CgTx GVLA bloquea la mayor parte de la corriente de CCDV.....	121
Fig. 18 (A-E) Efecto de la NE en corrientes de estado estacionario de neuronas control y pretratadas con PMA.....	122
Fig. 19 (A-F) Efecto de la NE en las relaciones I-V y en la cinética de activación de la corriente de neuronas control y pretratadas con PMA.....	124
Fig. 20 (A-F) Efecto de la NE en el comportamiento poblacional de CCDV _N de neuronas control y pretratadas con PMA.....	126
Fig. 21 (A-B) Inhibiciones VD y VI inducidas por NE.....	128
Fig. 22 (A-D) Efecto del aumento en inhibición tónica - inducido por GTP γ S - sobre la inactivación de corrientes de CCDV _N	130
Fig. 23 (A-B) Comparación de la inactivación de corriente en neuronas pretratadas con PMA y en neuronas dializadas con GTP γ S.....	131
Fig. 24 (A-C) Comportamiento hipotético de la corriente de CCDV _N bajo modulaciones inducidas por PMA ó PG.....	132

Tabla 1 Parámetros derivados del ajuste a la suma de dos funciones de Boltzmann de las relaciones de corriente de cola promedio *versus* voltaje de los datos presentados en la Fig. 12...109

Tabla 2 Parámetros derivados del ajuste a la suma de dos funciones exponenciales al curso temporal de la inactivación de la corriente..... 120

Tabla 3 Parámetros derivados del ajuste a la suma de dos funciones de Boltzmann de las relaciones de corriente de cola promedio *versus* voltaje de los datos presentados en la Fig. 20...127

RESUMEN

Los canales de calcio tipo N son la población predominante de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) en la membrana plasmática de las neuronas simpáticas. La actividad de estos canales iónicos puede ser estimulada o inhibida por mecanismos de señalización intracelular. Este proceso de ajuste de su actividad intrínseca es conocido como “modulación”.

El propósito final de los trabajos aquí expuestos es el de conformar un cuadro de modulación bidireccional (tanto inhibidora como estimuladora) de CCDV tipo N ($CCDV_N$) en neuronas simpáticas. El interés que llevó a presentar un escenario de este tipo, parte del análisis de la capacidad de cada uno de los cinco subtipos de subunidades β de las proteínas G ($G\beta$) para modular corrientes poblacionales de $CCDV_N$ – registradas en configuración de “célula completa” de la técnica de *patch-clamp*, en células provenientes de cultivos primarios de neuronas del ganglio cervical superior de la rata – mediante la sobreconcentración intracelular de cada subtipo, conseguida a través de la inyección intranuclear del DNA que codifica cada uno de ellos.

Los resultados obtenidos pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) Los distintos subtipos de subunidades $G\beta$ difieren en la potencia relativa con la que inducen un patrón inhibitorio caracterizado por alteraciones en la cinética de activación de la corriente, y que es revertido transitoriamente por fuertes despolarizaciones de la membrana (inhibición “dependiente de voltaje”; VD). El orden de potencia relativa con la que cada subtipo de $G\beta$ induce este tipo de inhibición es: $G\beta_4 \geq G\beta_1 \approx G\beta_2 > G\beta_3 \gg G\beta_5$.
- 2) Algunos subtipos inducen, además, un patrón inhibitorio que reduce la amplitud de las corrientes macroscópicas sin alterar la cinética de las mismas, y cuya magnitud no varía en función del potencial de membrana (inhibición “independiente de voltaje”; VI). El orden de potencia relativa con la que cada subtipo de $G\beta$ induce este tipo de inhibición es: $G\beta_2 > G\beta_3 \approx G\beta_4 \gg G\beta_1 \approx G\beta_5$.

- 3) En algunos casos, la concentración de subunidades $G\beta$ induce, paradójicamente, un efecto estimulador de la corriente que puede ser mimetizado por un activador directo (el éster de forbol, PMA) de la proteína cinasa C (PKC).
- 4) Las vías estimuladoras e inhibitoras mediadas por subunidades $G\beta$ ejercen efectos parcialmente excluyentes: los efectos estimuladores se acompañan de un bloqueo selectivo de la inhibición VD inducida por un neurotransmisor (norepinefrina).

Por lo tanto, los resultados que se presentan en esta tesis sugieren que los $CCDV_N$ son sujeto de modulación bidireccional (estimuladora e inhibitora) inducida por subunidades $G\beta$, y que el establecimiento de un tipo de modulación excluye, al menos en parte, la expresión de la modulación contraria. Estas observaciones confrontan al “dogma” existente hasta el momento sobre la exclusividad de efectos inhibitorios asociados al heterodímero funcional $G\beta\gamma$ - respecto de la modulación de $CCDV_N$ -, y provee, además, un marco teórico plausible para inferir de qué manera, la modulación estimuladora de los $CCDV_N$, puede ser activada, y sobre cuál sería su papel, durante el funcionamiento normal del sistema nervioso.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo jamás hubiese existido si el Dr. David García no me hubiese abierto las puertas de su laboratorio. Mi agradecimiento hacia él es aún más profundo: depositó en mí la inmensa responsabilidad de tener absoluta libertad y apoyo incondicional para llevar a cabo cuanto a mí me se le ocurriese. Espero no haber defraudado con mi desarrollo la enorme confianza que siempre tuvo en mí y en que este sueño era posible.

Mi agradecimiento con la Universidad Nacional Autónoma de México es doble: no solamente me ha acogido y educado desde hace más de una década, sino que me ha mantenido económicamente durante los últimos cuatro años y medio de mi vida, a través de la beca que me fue otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado para realizar mis estudios en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Semestre tras semestre, durante cuatro años, el Dr. Dieter Mascher y el Dr. Agustín Guerrero apoyaron y alentaron el desarrollo del Proyecto de Investigación que dio origen a esta tesis. A ellos les agradezco, también, la enorme libertad y confianza de las que he gozado en todo este tiempo. Por otra parte, el desarrollo de este proyecto nunca hubiese sido el mismo sin la oportunidad de haber discutido los resultados, y sus interpretaciones, con el Dr. Ramón Latorre, el Dr. Osvaldo Álvarez, el Dr. Carlos González, el Dr. Jorge Sánchez, el Dr. Walter Stuhmer, y el Dr. Michael Delay. A este último le debo, además, la impagable ayuda prestada en la redacción del primer artículo de investigación que ostenta mi nombre como primer autor. Asimismo, expreso mi más sincera gratitud al Dr. Jorge Sánchez, por haber depositado su confianza en mí y haberme abierto las puertas de mi vida futura.

El trabajo que aquí se presenta goza la fortuna de haber sido revisado por el Dr. Hugo Aréchiga, el Dr. David García, el Dr. Jorge Aceves, el Dr. Marcelino Cerejido, el Dr. Jorge Sánchez, el Dr. José Vargas, el Dr. Arturo Hernández y la Dra. Marcia Huart, miembros del jurado del examen de grado. Al margen de lo que entonces suceda, mucho agradezco todo el

tiempo que dedicaron a leer y tratar de entender (y de volver comprensible) el manuscrito precedente. Si esta versión de la tesis no sufre de ciertos errores es gracias a las críticas y cuestionamientos que recibí de su parte.

Desde hace cinco años, he tenido el gusto y el honor de compartir una excelente amistad con el Dr. Gabriel Roldán. Gabriel no sólo ha creído en mí y me ha prestado su ayuda siempre, sino que ha dado la cara por mí, y le debo por ello el haber sobrevivido a situaciones extremadamente difíciles. Mi formación académica y personal serían aún muchísimo más deficientes de no ser por el intercambio de ideas que, desde siempre, con él se han dado. Pocas veces en mi vida había conocido a alguien con quién congeniara más el vuelo de mi mente. Gabriel es y será para mí un hermano siempre.

Mi vida en el Departamento de Fisiología no habría sido la misma de no haber contado con las amistades de Fernando Carvajal, de Manuel Hernández y de Eduardo Hernández. A todos ellos les agradezco la amistad pura que me han ofrecido y la solidaridad con la que siempre se han portado. A Manuel debo, además, agradecerle la *inteligencia, ingenio y habilidad maestra* con la que ha resuelto todos los problemas técnicos que han surgido en el laboratorio, y otros, que uno se ha inventado. A Eduardo le profeso mi más sincera admiración por todo lo que me ha enseñado de la vida, y por el cariño con que me ha cuidado en largas jornadas de trabajo.

A la señora María Luisa Rodríguez (q.e.p.d.) no tengo palabras para agradecerle el haberme abierto las puertas de su corazón y las de su familia, y por haberme aceptado y tratado como un miembro de ésta desde que nos conocimos. Su recuerdo irá conmigo siempre y a donde quiera que vaya. Junto a mi corazón irán también todos los miembros de mi familia Gutiérrez Rodríguez, por la calidez de su acogida, por su apoyo constante, por su tiempo y por su ejemplo, por su cariño y el respeto que me han obsequiado.

Hace alrededor de cuatro meses, volvió a mi vida Yuri Zambrano. Sólo él sabe porqué lo hizo. Sólo él conoce las razones que le llevaron a sentarse a mi lado, frente a la computadora, y llevarme de la mano desde tener un montón de archivos inconexos a presentar una tesis de grado. Durante todo este tiempo, Yuri ha sido un maestro que me llevó paso a paso, durante horas y horas, y días tras días, a cambiar por completo mi manera de redactar, y mi manera de mirar lo que yo había escrito. Sin su paciencia, dedicación y obstinación, este trabajo sería

ininteligible. No contento con ello, se ha portado conmigo como un consejero y amigo, como un hermano. Su obra me ha dejado pasmado, mi eterno agradecimiento cuelga junto a su nombre a mi lado. En algún lugar, nuestros vuelos se volverán a encontrar.

He tenido la suerte de contar, desde mucho antes, con otro hermano: Erick Hernández, coautor, compañero de trabajo, doctor, amigo... destino. Le tendré que pedir a Erick que me perdone: mi gratitud hacia él es inexpresable. Me ha salvado el pellejo y el trabajo, me ha salvado de la locura y de la soledad abismal, me ha brindado todo el apoyo que ha estado en sus manos, ha creído en mí y en las locuras que de mí han volado... hemos compartido la vida con un compromiso de hermanos, y vamos a salir adelante nos cueste lo que nos cueste y le pese a quien le pese. Porque la amistad no se detenga con ninguna frontera.

A mi familia entera dedico mi carrera. A mi madre, por su ejemplo de lucha, honestidad, humildad, empeño, entrega, solidaridad. Por el amor que me ha brindado, por la vida que me ha dado. A mi hermana, Valeria, porque no hay gusto en una vida sin ella. Por el orgullo de tenerla, por el placer de vivirla. A mi padre... ¿Qué no podría decir de mi padre? ¿Hay algo que no le deba a mi mejor amigo? ¿Hay algo que no haya aprendido de mi primer maestro? ¿Acaso ha habido maestro que supere a mi gran Maestro? Gracias papá por aguantar un día más, gracias por darme la oportunidad de mostrarte, que de tí, aprendí a caminar.

En este último año de mi vida, he reverdecido: tengo a mi lado a una mujer hermosa por esposa. Michelle se ha ganado toda mi admiración, mi respeto, mi amor y mi devoción, con un trabajo cotidiano que ha hecho de un sueño que tuvimos, la realidad en la que vivimos. De nuevo, las palabras no me alcanzan para expresarle mi gratitud por todos los sacrificios que estuvo dispuesta a compartir para que este proyecto pudiese subsistir. Por la pureza de tu amor, por tu apoyo y confianza, por tu lucha diaria y tu fidelidad a nuestra causa, por todo lo incomprensible e incommunicable, Michelle, eres sangre de mi sangre hasta que la muerte nos separe.

Finalmente, mi más profundo respeto por María Juana y por Leticia. Porque mi vida fue salvada por ellas, porque me fue, por ellas, la vida devuelta. Porque, día a día, han cuidado y sanado las heridas. Porque esculpieron en mí las alas que sostienen mis sueños, porque me han restituido el vuelo, porque me han dado problemas nuevos. No hacen falta palabras: nada de lo

que soy lo hubiese sido sin ellas. Y estoy contento con lo que soy. Y no pido más que un par de años para poder hacer de mi vida un monumento en su nombre. Y en su nombre, hoy termina la guerra: hoy moriría en paz.

Y gracias a la vida, *que me ha dado tanto...*

Rafael García

miércoles, 19 de septiembre del 2001

1. ABREVIATURAS

ω -CgTx GVIA. ω -conotoxina GVIA.

4-AP. 4 Amino-piridina.

CCDV. Canal(es) de Ca^{2+} dependiente(s) de voltaje.

CCDV_N. Canal(es) de Ca^{2+} dependiente(s) de voltaje tipo N.

DHP. Dihidropiridina.

DRG. Ganglio de la raíz dorsal de la médula espinal.

G α . Subunidad α de las proteínas G.

G β . Subunidad β de las proteínas G.

G γ . Subunidad γ de las proteínas G.

NE. Norepinefrina.

NT. Neurotransmisor(es).

PA. Potencial(es) de acción.

PG. Proteína(s) G.

PKC. Proteína cinasa C.

PLC. Fosfolipasa C.

PMA. Forbol 12 miristato, 13 acetato.

RHH. Receptor heptahelical.

SCG. Ganglio cervical superior.

TEA. Tetraetilamonio.

TTX. Tetrodotoxina.

VD. Dependiente de voltaje.

VI. Independiente de voltaje.

2. INTRODUCCIÓN

“The heart rate must be appropriately adjusted to meet the changing behavioral states of the animal, which means that the central pattern generator must be appropriately adjusted: this process is called modulation.”

G. M. Shepherd, 1988

“Much as neurotransmitters of the ANS modulate functions of peripheral organs, similar chemical signals within the nervous system modulate the functions of groups of neurons.”

B. Hille, 1994

El funcionamiento del sistema nervioso es modificado, en todo momento, en respuesta a las necesidades cambiantes del organismo durante su interacción con un medio ambiente en perpetua evolución. Esta “plasticidad neuronal” *“se evidencia en nuestras vidas por el aprendizaje y por el desarrollo de los reflejos, habilidades motoras y hábitos. Constituye la clave de la inteligencia humana, así como la capacidad de todas las formas animales superiores de responder adaptativamente a los estímulos más allá de los reflejos fijos, programados en el desarrollo del sistema nervioso por su maquinaria genética”* (Eckert et al., 1988).

Se piensa que esta capacidad adaptativa del sistema nervioso depende, al menos en parte, de la posibilidad de alterar el patrón de actividad eléctrica endógena de las células que componen dicho sistema (Levitan y Kaczmarek, 1997). En respuesta a estimulaciones sinápticas u hormonales, las neuronas pueden sufrir cambios transitorios o duraderos en sus propiedades eléctricas. En consecuencia, la amplitud, la forma y la frecuencia de los potenciales de acción (PA) que una neurona produce - y la respuesta de la misma frente a estimulaciones sinápticas subsiguientes - se ven alteradas. Estos cambios en la excitabilidad neuronal son conocidos como “neuromodulación” (Kaczmarek y Levitan, 1987). En este contexto, “modulación” se utiliza para denotar el proceso de ajuste en la actividad intrínseca e inherente a un fenómeno dado – manifiesto en un nivel de organización particular – en respuesta a eventos exógenos.

La habilidad de una membrana excitable para responder ante un shock eléctrico con un PA es una propiedad a la que se refiere como “excitación”, y se dice la célula es “excitable” (Shepherd,

1988). La excitabilidad de la membrana se define entonces como la propiedad de alterar la conductancia de la membrana (y a menudo el potencial de membrana) en respuesta a un estímulo (Eckert et al., 1988). Se califica como “excitador” a un suceso que incrementa la probabilidad de iniciación de un PA y se dice que sus efectos son “facilitadores” de la función; en contraposición, un suceso que reduce dicha probabilidad se califica como “inhibidor” (Eckert et al., 1988). En analogía con lo anterior, se hablará de “modulación estimuladora”¹ cuando ésta lleve a una regulación positiva en la actividad de determinado fenómeno, y de “modulación inhibidora”, si lleva a una regulación negativa en la misma. Por otra parte, se denotará como “modulación bidireccional” a la acción coordinada de ambas vías (Greengard et al., 1995).

“Las membranas de los axones, que solamente repiten los impulsos que les son provistos, tienen una excitabilidad que necesita de pocos ajustes rápidos. Por otra parte, las propiedades eléctricas de los cuerpos celulares y dendritas de las neuronas se ajustan minuto a minuto a las demandas y experiencia del organismo” (Hille, 1992a). Virtualmente, casi cada propiedad eléctrica de la membrana plasmática somatodendrítica, de prácticamente cualquier tipo neuronal, es sujeto de algún tipo de modulación a corto y/o a largo plazo. Las modificaciones pueden incluir cambios en el área total de membrana - y con ello alteraciones en la capacitancia membranal - o cambios en toda clase de sistema de transporte de iones a través de ésta, y pueden originarse de fenómenos bioquímicos altamente localizados espacio-temporalmente o ser el resultado más persistente de alteraciones en el patrón de expresión genética de alguno de sus constituyentes (Kaczmarek y Levitan, 1987; Hille, 1992a,b, 1994; Levitan y Kaczmarek, 1997).

El trabajo entero que aquí se presenta gira en torno de la modulación a corto plazo (segundos a minutos), por vías de señalización intracelular, de uno de los mecanismos de transporte de iones más interesantes en las membranas plasmáticas de las células excitables: los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV). Este fenómeno es de particular interés en virtud de lo siguiente: *“El sistema nervioso no es principalmente un dispositivo eléctrico. La mayor parte de las células excitables transducen finalmente su excitación eléctrica en otras formas de actividad. Como una generalización amplia, las células excitables traducen su electricidad en acciones a través de flujos de Ca^{2+} modulados por canales permeables al Ca y sensibles al voltaje.”* (Hille, 1992a). En otras palabras, *“el inicio y control de la entrada de Ca^{2+} es la raison d'être de los potenciales de acción.”* (Clapham, 1996).

¹ Nota: ver apartado de Discusión para una justificación de la elección de ésta denominación *versus* el término de primera elección “modulación facilitadora”

La capacidad de los CCDV para transducir fenómenos eléctricos en eventos bioquímicos - esto es, de fungir como “transductores electroquímicos” - se debe a que los iones de calcio, a diferencia de los demás iones que atraviesan la membrana en el curso de una despolarización de ésta, funcionan “*como un agente regulador intracelular sin competencia, por parte de ninguna otra molécula ionorgánica, ni en importancia ni en universalidad*” (Eckert et al., 1988). A diferencia del Na^+ y del K^+ , la concentración intracelular de calcio libre ionizado ($[\text{Ca}^{2+}]$) es mantenida tan baja que puede ser incrementada dramáticamente durante una sola respuesta despolarizante de una célula con CCDV. “*Este incremento es la llamada a la acción*” (Hille, 1992a): el Ca^{2+} que ingresa a la célula es un regulador alostérico de distintas proteínas efectoras que intervienen en una cantidad impresionante de fenómenos celulares (Clapham, 1995; Ghosh y Greenberg, 1995; Berridge, 1998).

El fenómeno bioquímico particular que se estimule como consecuencia de la activación de CCDV depende de la localización subcelular precisa, de la magnitud absoluta y del curso temporal con el que ingrese el Ca^{2+} (Bootman et al., 2001). Para citar solamente un par de ejemplos, la estrecha colocalización de CCDV con proteínas implicadas en la exocitosis, en terminales sinápticas nerviosas, o con canales de K^+ activados por Ca^{2+} , en somas y dendritas, acopla el influjo de Ca^{2+} con la liberación de neurotransmisores (NT) o con la regulación de la tasa de repolarización de la membrana en el curso de un PA y de la duración de la fase de post-hiperpolarización que sigue al mismo, respectivamente (Zucker, 1996; Marchant y Parker, 2000; Atlas, 2001).

Los CCDV también juegan un papel electrogénico en la membrana plasmática de las células excitables: al igual que el paso de cualquier partícula cargada a través de la membrana, el flujo de Ca^{2+} genera una corriente eléctrica en la misma. La dirección de esta corriente es entrante, según lo determina el enorme gradiente de concentración que existe entre el interior (concentración muy baja; $< 10^{-7}$ M) y el exterior (alta; $\sim 10^{-3}$ M). Una corriente positiva entrante lleva a la disipación del potencial eléctrico transmembranal, esto es, genera una despolarización de la membrana.

La función electrogénica de los CCDV es similar a la de otros canales iónicos regulados por voltaje: “*La electricidad [neuronal] es utilizada para abrir y/o cerrar canales, y los canales son utilizados para generar electricidad...*” (Hille, 1992). Sin embargo, sólo en casos aislados (como en las células

cardiacas “marcapaso” del nodo sinoatrial y en el músculo liso) el Ca^{2+} transporta la totalidad de la corriente de entrada (Hille, 1992). Generalmente, la corriente de Ca^{2+} no es lo suficientemente intensa como para provocar un PA sin la ayuda de la corriente de Na^+ . Así, en la mayoría de las membranas que exhiben una corriente de Ca^{2+} , la subida de un PA se genera principalmente por una intensa corriente de Na^+ , que tiene la responsabilidad principal de despolarizar rápidamente la membrana. Los CCDV, que reaccionan más lenta y débilmente, son activados por la despolarización causada por la primera y contribuyen a mantener la célula despolarizada por algunos milisegundos después de que los canales de Na^+ han inactivado. Esta activación tardía y poco inactivante de los CCDV genera la fase de “meseta” (*plateau*) característica de los PA somatodendríticos (Hille, 1992). Es decir, en la mayor parte de los casos, la función electrogénica principal de los canales tiene más que ver con el hecho de “esculpir” o “moldear” las características de un PA que es generado y propagado principalmente por corrientes de Na^+ y K^+ . En particular, la corriente de Ca^{2+} está ausente, de manera notable, en la mayoría de los axones, en los que la corriente de entrada es transportada exclusivamente por los canales de Na^+ .

Por todas estas razones, no es en absoluto sorprendente que, en las neuronas (al igual que en otras células excitables) hayan evolucionado todo tipo de estrategias para regular finamente la entrada de Ca^{2+} en el curso de una despolarización de membrana. Esto significa, en última instancia, la capacidad de regular, indirectamente, los procesos fisiológicos que dependen de ésta. El perfil de entrada de Ca^{2+} a través de CCDV es moldeado, en parte, por las propiedades biofísicas de los CCDV particulares. Esto es, el primer nivel de regulación tiene que ver con la expresión diferencial y localización subcelular precisa de un gran número de tipos de CCDV, cuyas propiedades se ajustan a la función particular que regulan. Así, existen CCDV de activación, inactivación y deactivación rápidas o lentas (Armstrong y Matteson, 1985) y que se abren con despolarizaciones pequeñas, cercanas al potencial de reposo de la célula (LVA, por *low voltage activated*), o con despolarizaciones mayores, como las que se alcanzan en el curso de un PA (HVA, por *high voltage activated*; Carbone y Lux, 1984; Fedulova et al., 1985) (ver Apéndice I.2).

Un segundo nivel de regulación del ingreso de Ca^{2+} a la célula puede conseguirse de manera indirecta: tanto la tasa como la amplitud absoluta del influjo de Ca^{2+} , a través de CCDV HVA, varía con cambios en las características de los PA (Sabatini y Regehr, 1999). Por lo tanto, los factores que afecten la tasa de despolarización, la amplitud, la duración o la frecuencia de los PA

pueden producir alteraciones significativas en la velocidad y curso temporal de la entrada de Ca^{2+} (Patillo et al., 1999). Los cambios en la forma de un PA son ubicuos y ocurren en una cantidad de condiciones fisiológicas. Por ejemplo, durante trenes de estímulos, la duración de un PA a menudo se incrementa dos o más veces, como consecuencia de una inactivación dependiente de frecuencia de canales de K^+ (Jackson et al., 1991; Park y Dunlap, 1998). Además, muchos NT alteran la duración de los PA a través de la modulación de canales de K^+ (Dunlap, 1985; Breitwieser, 1996).

El incremento en la duración de un PA generalmente provoca un incremento general en el influjo de Ca^{2+} . Sin embargo, este mecanismo no siempre lleva a un aumento en la actividad de los fenómenos que dependen de éste: si el cambio en la duración es suficientemente grande, la tasa de entrada de Ca^{2+} es enlentecida y el influjo pico (el máximo absoluto) es reducido (Park y Dunlap, 1998; Patillo et al., 1999; Sabatini y Regehr, 1999).

Finalmente, los cambios dependientes de amplitud y frecuencia de los PA, y el influjo asociado de Ca^{2+} , son moldeados aún más allá por NT y hormonas, cuyas vías de transducción de señales actúan directamente sobre el funcionamiento de los canales de Ca^{2+} . Este proceso es, justamente, el fenómeno que nos interesa.

El tipo particular de CCDV que interesa a este estudio es denominado como “tipo N” (CCDV_N). Estos canales HVA se expresan exclusivamente en neuronas, y constituyen la población predominante de CCDVs presentes en la membrana plasmática somatodendrítica y de las terminales sinápticas de las neuronas simpáticas y sensoriales (Jones y Elmslie, 1997).

El efecto predominante que inducen los NT en CCDV_N es inhibitorio (Jones y Elmslie, 1997). En neuronas simpáticas, modelo experimental empleado en esta tesis, la actividad de CCDV_N puede ser inhibida tras la activación de más de una decena de RHH que activan proteínas G (PG) de, cuanto menos, cinco familias distintas (Hille, 1994). Como se detallará en los Antecedentes, las características propias de la inhibición resultante en cada caso pueden ser remarcablemente similares o sustancialmente distintas, dependiendo del grado relativo de acople de cada vía con la producción de dos “patrones inhibitorios” electrofisiológicos principales.

Ocasionalmente, han sido reportados efectos estimuladores de los NT y vías de señalización intracelular sobre los CCDV_N (Bley y Tsien, 1990; Kasai, 1991; Elmslie, 1992; Mironov y Lux, 1992; Surmeier et al., 1995; Frank et al., 1996; Morikawa et al., 1999). Sin embargo, no existe a la fecha ningún marco conceptual de modulación de estos CCDV que incorpore un mecanismo de modulación positiva. La razón se encuentra en el hecho de que el mecanismo de acción invocado para explicar el efecto estimulador sobre las corrientes ha sido causa de profundas discrepancias entre distintos grupos de investigación.

En las posiciones extremas, dos hipótesis se han postulado para explicar el fenómeno citado. En una de ellas, el incremento en las corrientes ha sido atribuido a un efecto directo sobre la actividad intrínseca de los CCDV (Yang y Tsien, 1993). En la opinión contraria, la corriente crece en amplitud como consecuencia indirecta de la remoción de una inhibición tónicamente presente en condiciones basales (Swartz et al., 1993).

Cada una de las posturas tiene consecuencias profundas sobre la manera en la que se concibe el funcionamiento de los CCDV. En particular, el segundo enfoque sostiene que toda modulación altera el equilibrio entre dos estados posibles (inhibido y no-inhibido), mientras que en la primera de ellas varios modos de actividad serían esperables (inhibido, no modulado y estimulado). En el límite, esto implica el desechar o postular la existencia de estimulación de la entrada de Ca²⁺ a través de CCDV_N en ausencia de inhibición.

La tesis que se somete a consideración sostiene que la modulación positiva de CCDV_N existe en neuronas simpáticas, y que ésta induce un comportamiento cinético de la corriente poblacional característico y distintivo. Por lo tanto, se postula la necesidad de un modelo cinético que contemple, al menos, tres modos operativos distintos para representar el cuadro de modulación bidireccional de estos canales. Además se aportarán evidencias de que la vía de modulación positiva ejerce una interferencia selectiva y excluyente sobre el establecimiento de uno de los dos patrones de modulación inhibitoria que se han mencionado. Finalmente, se propondrá que ambas vías de señalización (positiva y negativa) pueden originarse a partir de un intermediario común: la subunidad heterodimérica $\beta\gamma$ de las PG.

El problema particular que dio origen a este estudio requiere de un pequeño preámbulo para que su planteamiento sea entendido. Baste mencionar por ahora que se trata de uno de los

problemas que subyacen a la especificidad de la señalización inhibitoria entre los diversos RHH y los $CCDV_N$ que se encuentran en esta preparación. Como se ha mencionado, el estudio de la modulación de la actividad de estos canales no es nuevo. De hecho, las neuronas simpáticas han sido, históricamente, una de las poblaciones de neuronas que, por excelencia, han constituido un modelo en su estudio (Hille, 1994; Jones y Elmslie, 1997). Los fenómenos ligados a la modulación negativa de los canales han sido los más ampliamente estudiados y analizados. El esquema de vías de regulación inhibitoras es complejo y, en uno de los tres casos particulares que existen, el conocimiento es sumamente vasto.

Para establecer el marco teórico en el que se circunscriben los problemas específicos abordados en este trabajo con el fin de sustentar la tesis referida, se expondrá en la siguiente sección el estado actual del amplio conocimiento que se tiene respecto de las distintas vías de modulación que concurren en estos canales. Dada la extensión señalada que tiene el conocimiento en el área, la revisión bibliográfica no ha sido exhaustiva en términos de número de trabajos citados. Más bien, se ha intentado ubicar las ideas centrales en torno a los mecanismos generales por los que opera cada vía y las evidencias de interacciones entre éstas. La presentación de los trabajos sigue un orden cronológico. La razón de ello es simple: es la única manera en como el autor llegó a entender lo poco que entiende de este universo de conocimientos en expansión.

3. ANTECEDENTES

"It is easy to be chauvinistic about calcium channels."

R. W. Tsien, 1987

*"Calcium channels are both
regulating and regulated.
Influx of Ca^{2+} through calcium channels
modulates cellular activity;
cellular activity
modulates calcium channels."*

S. W. Jones, 1998

*"If the neurotransmitters studied here
affect I_{Ca} in sensory nerve terminals
in the same way that they do in the cell bodies,
then they may decrease transmitter release.
This suggests a rather novel mechanism
for the phenomenon of presynaptic inhibition."*

K. Dunlap y G. D. Fishbach, 1981

La modulación positiva de CCDV del miocardio - inducida por norepinefrina (NE) - fue el primer ejemplo descrito de la influencia de un NT sobre una conductancia iónica dependiente de voltaje (Reuter, 1967, 1974). Sin embargo, la historia de la modulación por NT de CCDV neuronales se origina en la investigación de los mecanismos que regulan inhibitoriamente su respuesta al voltaje. La idea de la existencia de dichos mecanismos nace, a su vez, como una hipótesis para explicar el mecanismo mediante el cual una serie de NT acortan la duración de los PA registrados en el soma de neuronas embrionarias en cultivo, disociadas a partir de los ganglios de la raíz dorsal (DRGs, por *dorsal root ganglion neurons*) de pollos (Dunlap y Fischbach, 1978; Ilustr. 1).

Al igual que en otros tipos neuronales (Hille, 1992a), los PA somáticos que presentan las DRGs son el producto de la precisa sucesión temporal con la que se activan tres conductancias de la membrana plasmática. La fase de rápida despolarización inicial depende de la activación de conductancias al Na^+ . Sin embargo, éstas decaen ("inactivan"; ver Apéndice I.1) pronto. La corriente responsable de la despolarización tardía - la fase de "meseta" (*plateau*) - es acarreada por iones de Ca^{2+} . Esta corriente entrante se activa e inactiva más lentamente que la de Na^+ . Finalmente, el desarrollo de una corriente saliente transportada por iones K^+ es la encargada de la repolarización que culmina el proceso completo.

La inferencia fundamental del trabajo clásico de K. Dunlap y G. D. Fischbach (1978) puede resumirse de la siguiente manera: ya que los NT no alteraban la tasa de despolarización inicial (Ilustr. 1), el acortamiento en la duración de los PA podía explicarse de tres maneras: (1) Un incremento en la permeabilidad al K^+ ; (2) Una reducción en las conductancias al Ca^{2+} ; o (3) Una combinación de ambos mecanismos. Con muy pocas evidencias experimentales que lo sustentaran, Dunlap y Fischbach proponen que el efecto es mediado exclusivamente por una acción directa sobre los CCDV.

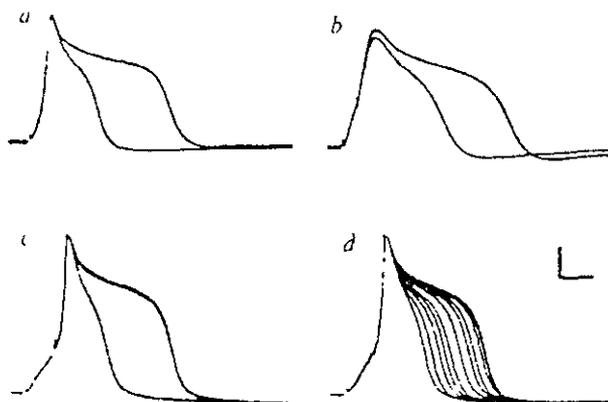
Poco tiempo después de la publicación de la observación antes referida, J. P. Horn y D. A. McAfee (1979, 1980), trabajando en neuronas simpáticas, provenientes del ganglio cervical superior (SCGs, por superior cervical ganglion neurons), repiten la observación, apoyan la hipótesis, y agregan dos sustentos experimentales a la misma: (1) La fase de post-hiperpolarización de los PA, que resulta de la activación – dependiente de la acumulación de Ca^{2+} durante la fase de despolarización del PA - de otra corriente saliente de K^+ , también era reducida por norepinefrina; (2) Los NT inhibían los PA de Ca^{2+} , registrados en condiciones de ausencia de Na^+ o en presencia de TTX.

El conjunto de los datos referidos, apoyaba sin duda la hipótesis de la inhibición de los CCDV por acción de los NT, pero la publicación de una evidencia directa del fenómeno tendría que aguardar aún algunos años.

El inferir qué cambios puede sufrir una conductancia, mediante el análisis del comportamiento de un PA, no es tarea sencilla. La duración de un PA es una función sensible del potencial de reposo de la membrana (Horn y McAfee, 1980; Forscher y Oxford, 1985), y este último puede presentar una enorme variabilidad (entre -35 y -60 mV) entre neuronas vecinas en cultivo (Dunlap y Fischbach, 1978) e *in situ* (Galvan y Adams, 1982). Por lo tanto, el investigar los efectos que tienen los NT sobre los CCDV a través de la medición de la duración de los PA, puede arrojar datos ambiguos (Forscher y Oxford, 1985).

Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials

KATHLEEN DUNLAP
GERALD D. FISCHBACH



Ilustr. 1 Primer evidencia (indirecta) de la inhibición de CCDV neuronales inducida por neurotransmisores. Efecto de la serotonina (*a*, 10^{-5} M), el GABA (*b*, 10^{-4} M) y la NE (*c* y *d* 10^{-4} M) sobre el PA somático de una neurona del DRG de pollo en cultivo. Los dos barridos sucesivos muestran el PA antes (PAs más largos) y después de la aplicación de las drogas. El regreso a la duración control se muestra en *d* con intervalos de 10 segundos entre barridos. Barra de calibración, 20 mV y 2 ms.

La corriente de Ca^{2+} debía ser estudiada en aislamiento. “La única manera de medir directamente la corriente eléctrica transmembranal de Ca^{2+} es mediante el uso de la técnica de fijación de voltaje” (Kostyuk, 1981). Si el comportamiento de los canales iónicos depende del voltaje, el primer paso en el estudio de estos canales es el control del voltaje. Bajo fijación de voltaje, el comportamiento cinético de un canal (o de un conjunto de ellos) se encuentra en su más simple expresión. Sin fijación del voltaje, existen interacciones complejas entre la apertura de canales y el potencial de membrana: cuando los canales se abren, la corriente que fluye a través de ellos afecta al potencial de membrana, lo cual lleva a que los canales se abran (o se cierren), afectando de nueva cuenta al potencial de membrana, etc. (Jones, 1990).

La fijación de voltaje no es más que el paso inicial en el aislamiento de una conductancia específica. Distintas poblaciones de canales iónicos son activadas en rangos de potenciales de membrana que suelen superponerse en mayor o menor grado. Las corrientes de Ca^{2+} y de Na^{+} pueden ser parcialmente separadas en términos del curso temporal que sigue el desarrollo de

cada una. Sin embargo, este mismo criterio no permite estudiar el curso temporal con el que se activan las conductancias al Ca^{2+} , ni tampoco aislarlas del componente de K^+ .

En 1981, Dunlap y Fischbach consiguen resolver parcialmente los componentes individuales de las corrientes de las DRGs en cultivo mediante una combinación de la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos y una mezcla de bloqueadores farmacológicos de corrientes de Na^+ (TTX) y de K^+ (4-AP y TEA). La amplitud de las corrientes entrantes que registraron en estas condiciones era disminuida, de manera dosis-dependiente, por los mismos NT que acortan la duración de los PA. Las evidencias más fuertes que obtuvieron para sostener que este efecto fuese debido a una acción sobre CCDV, fue el encontrar que los NT reducían la corriente entrante “de cola” (ver Apéndice I.1.2) registrada en el potencial de inversión estimado para las corrientes de K^+ , y que ellos no afectaban las corrientes de Na^+ o de K^+ registradas en presencia de cobalto. Sin embargo, las técnicas convencionales disponibles en ese momento no permitían obtener evidencias completamente concluyentes. En particular, *“No podemos, sin embargo, sostener que las acciones de la norepinefrina [NE, uno de los NT que probaron] estén restringidas a las corrientes de calcio: un efecto sobre la corriente de potasio activada por calcio no puede ser eliminado”* (Dunlap y Fischbach, 1981). La preocupación por esta posibilidad no era excesiva: después de todo, una aparente reducción de la corriente entrante podía originarse como un artefacto producido por un aumento en una corriente saliente, que podía ser no evidente en condiciones de bloqueo de la corriente de Ca^{2+} por ser, justamente, dependiente de este catión (Forscher y Oxford, 1985).

La fijación de voltaje con microelectrodos presenta muchas limitaciones. Entre los principales obstáculos se encuentra el reducido tamaño de la mayor parte de las neuronas de vertebrados (30-80 μm), que torna difícil la penetración de la membrana con dos microelectrodos convencionales. El desarrollo de técnicas para la fijación de voltaje con un solo microelectrodo ayudó a reducir el daño a la membrana plasmática, pero impone severas limitaciones que, en general, permiten únicamente el análisis de corrientes pequeñas y en un rango de voltajes limitado. Sin embargo, el obstáculo más importante para analizar adecuadamente la corriente de Ca^{2+} , es la coactivación de corrientes salientes de K^+ que obscurecen las cinéticas de activación e inactivación de la corriente de Ca^{2+} (Freschi, 1983; ver Apéndice I.1). Estas corrientes salientes no pueden ser bloqueadas por completo desde el espacio extracelular. La única manera de deshacerse de ellas es mediante el reemplazo del K^+ interno por un catión no-permeante a través

de los canales que conducen dicho ión (p.e., el Cs^+). Una técnica de microperfusión intracelular para cubrir estos requerimientos habría de desarrollarse por el grupo de P. G. Kostyuk para el análisis de corrientes de Ca^{2+} en neuronas de invertebrados, pero lamentablemente las neuronas de vertebrados resultaban demasiado pequeñas como para soportar el tamaño considerable de las perforaciones de la membrana plasmática que requiere esta técnica (Kostyuk, 1981).

Todo lo que sabemos hoy en día respecto de los mecanismos de modulación de los CCDV está relacionado, de una manera u otra, con una de las grandes revoluciones tecnológicas que se dio en la investigación biomédica a finales de los años setenta: la técnica del *patch-clamp* (Neher y Sakmann, 1976; Neher et al., 1978; Hammill, et al, 1981). Esta modalidad de fijación de voltaje, fue inicialmente concebida para demostrar que las corrientes membranales realmente fluyen a través de canales discretos (Neher, 1992). Sin embargo, su contribución más significativa fue el inesperado beneficio de poder romper la membrana contenida en la luz de la pipeta de registro y establecer una conexión eléctrica entre ésta y el interior de la célula (“configuración de célula completa”; Hammill et al., 1981)

De manera general, el registro de célula completa es análogo al que se consigue mediante el empalme con microelectrodos convencionales. Sin embargo, hay tres diferencias fundamentales que lo hicieron apto para el estudio de neuronas de vertebrados: (1) La muy alta resistencia del sello establecido entre la pipeta y la membrana plasmática provoca que la filtración entre el interior de la célula y el baño sea verdaderamente baja, de manera que células muy pequeñas toleran esta forma de penetración; (2) La baja resistencia de acceso eléctrico permite que, siempre que se usen células pequeñas, se consigan buenas condiciones de fijación de voltaje sin el empleo de electrodos adicionales; (3) El tamaño relativamente grande de la apertura de la pipeta de registro genera que se establezca un rápido equilibrio entre los componentes de la solución de la pipeta de patch y el interior de la célula. Los dos primeros puntos permitieron que los estudios electrofisiológicos se inclinaran hacia el estudio de las pequeñas células de los mamíferos (comparado con las preparaciones de grandes células provenientes de invertebrados), el número de tipos celulares en los que se podía conseguir una buena fijación del voltaje fuese impresionantemente ampliado para incluir a casi cualquier célula que pudiese ser aislada o cultivada. Por su parte, el tercer punto permitió el control de la composición de soluciones a ambos lados de la membrana que habría de permitir el fácil, sistemático y reproducible aislamiento de corrientes de Ca^{2+} en dichas células.

En 1982, el grupo de E. Neher (Fenwick et al., 1982) y aquél de S. Hagiwara (Hagiwara y Ohmori, 1982) publican simultáneamente el aislamiento y caracterización de la corriente de Ca^{2+} en células cromafines y en una línea celular tumoral de la pituitaria (GH_3), respectivamente. La lógica experimental seguida en ambos casos para conseguir disecar la corriente a través de CCDV fue la misma: la diálisis intracelular con una solución libre de K^+ , que utiliza al Cs^+ como catión principal, y el control de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mediante el uso de un quelante de cationes divalentes (EGTA). El empleo de esta solución interna, junto con una solución externa que incluye TTX y TEA^+ , aísla una corriente entrante sensible a la presencia de bloqueadores de CCDV (La^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) y de amplitud proporcional a la concentración de distintos cationes divalentes que permean a través de éstos (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}).

La publicación de los trabajos anteriores desencadenaría una avalancha de reportes relativos a las propiedades cinéticas y farmacológicas de la corriente de Ca^{2+} en todo tipo de preparaciones. Estos estudios, que conducirían finalmente al descubrimiento de múltiples tipos de CCDV, mantendrían alejada la atención del problema de la regulación de las corrientes durante un par de años. No es sino hasta 1985 que, de manera independiente, el grupo de G. S. Oxford (Forscher y Oxford, 1985) y el de H. D. Lux (Deisz y Lux, 1985) presentan las primeras evidencias concluyentes respecto de la hipótesis planteada por Dunlap y Fischbach (1978) para explicar el efecto de los NT sobre la duración de los PA: la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} reportada por dichos autores en el '81 era producto de una regulación directa de la actividad de los CCDV y no la consecuencia de la estimulación de una corriente de K^+ . Más tarde, se demostraría que el efecto inhibitorio inducido por los NT sobre los CCDV de las neuronas sensoriales (Dunlap y Fishbach, 1978, 1981) y simpáticas (Horn y McAfee, 1979, 1980) era debido a la regulación negativa de CCDV_N , predominantes en ambas preparaciones (Jones y Elmslie, 1997). En estas células, la inhibición de CCDV es selectiva para el componente sensible al bloqueo por ω -conotoxina GVIA (una toxina peptídica selectiva para CCDV_N ; ver Apéndice I.2), con pocos (Mathie et al., 1992) o ningún efecto sobre el componente de tipo L (Kasai y Aosaki, 1989; Plummer et al., 1989, 1991; Cox y Dunlap, 1992; Elmslie et al., 1992).

A partir de los trabajos realizados en neuronas centrales (ver Apéndice I.2), se ha demostrado que existe otro subtipo de CCDV (aquéllos de tipo P/Q) que son sujeto de una regulación inhibitoria que guarda cierta semejanza con el mecanismo de modulación que a continuación se

presenta. Aunque existen algunas diferencias en cuanto a las características particulares que exhibe la modulación de $CCDV_N$ y P/Q, los mecanismos involucrados que se han propuesto para explicar la modulación de los segundos, suelen ser una generalización de los mecanismos propuestos para los primeros. Debido a que la mayoría de las investigaciones se han desarrollado en células del sistema nervioso periférico, el conocimiento que se tiene sobre la modulación de canales de tipo P/Q es mínimo comparada con aquél que concierne a los $CCDV_N$, y sigue siendo sujeto de controversia entre distintos grupos de investigación (Arnot et al., 2000; Colecraft et al., 2000). Por lo tanto, la mayor parte de la discusión que sigue se circunscribe a la modulación de $CCDV_N$. Este hecho no preocupa: los canales tipo P/Q no contribuyen a la corriente de $CCDV$ en el soma de las SCGs, modelo experimental de esta tesis (Mintz et al., 1992).

3.1. MODULACIÓN NEGATIVA DE $CCDV_N$: MÚLTIPLES VÍAS DE INHIBICIÓN

En 1985, el grupo de H. D. Lux (Deisz y Lux, 1985) da cuenta de un “misterioso fenómeno” (según se referiría a él B. P. Bean [1989b]): un NT (el GABA), en DRGs de pollo, producía un retraso – dependiente de su concentración - en el tiempo que le lleva a la corriente HVA alcanzar un valor máximo en el transcurso de una despolarización (ver Ilustr. 2). Casi diez años después, B. Hille (1994), en una revisión de la literatura acumulada, dejaría claramente asentado que, dicho fenómeno, constituye una de las características distintivas de una de las múltiples vías de inhibición, potencialmente estimuladas por distintos NT, que convergen en un complejo escenario de modulación de $CCDV_N$.

En neuronas simpáticas, la modulación inhibitoria de $CCDV_N$ puede proceder a través de, cuanto menos, cinco vías mediadas por distintas proteínas G (PG) acopladas a más de una decena de receptores heptahelicales (RHH) para NT y hormonas (Hille, 1994). Dos “patrones inhibitorios” pueden distinguirse en términos de los efectos que estas diversas rutas bioquímicas inducen en el comportamiento de los canales. La alteración en la cinética de activación de la corriente de $CCDV_N$ descrita por el grupo de Lux es característica de la inhibición “dependiente de voltaje”. También es característica distintiva de esta inhibición el que pueda ser transitoriamente revertida por fuertes y/o largas despolarizaciones de la membrana. Por otra parte, la inhibición “independiente de voltaje” reduce la amplitud de las corrientes poblacionales de $CCDV_N$ sin alterar la cinética de las mismas. Por mucho, la inhibición dependiente de voltaje ha sido la vía más estudiada y, por tanto, es la que se encuentra mejor caracterizada.

3.1.1. Modulación Dependiente del Voltaje y del Tiempo de $CCDV_N$

El grupo de H. D. Lux dio cuenta del inusitado “*enlentecimiento cinético*” (por *kinetic slowing*, según fue bautizado por Luebke y Dunlap en 1994) en la fase de activación de la corriente (ver Apéndice I) que producían ciertos NT, y aportó, además, una interpretación cuya validez se sostiene hasta nuestros días: la lenta activación de la corriente podía ser explicada en términos de una reducción en la probabilidad de apertura de los canales, sin invocar, ni una reducción en el número de $CCDV_N$ disponibles, ni cambios en la conductancia unitaria de los mismos (Deisz y Lux, 1985).

En un par de trabajos subsecuentes (Marchetti et al., 1986; Grassi y Lux, 1989), el mismo grupo agregaría lo siguiente: la magnitud, tanto de los efectos sobre la cinética de activación como de aquéllos sobre la amplitud de la corriente, es inversamente proporcional a la magnitud y duración del escalón de voltaje con que se activa la corriente (Ilustr. 2). Esto es, a un potencial dado, la magnitud de la inhibición decrece conforme aumenta la duración del escalón de voltaje. De la misma manera, en un intervalo de tiempo fijo, la proporción de corriente inhibida disminuye a medida que se incrementa el voltaje al cual se cuantifica. En otras palabras, la inhibición es “dependiente de tiempo y de voltaje” (Marchetti et al., 1986).

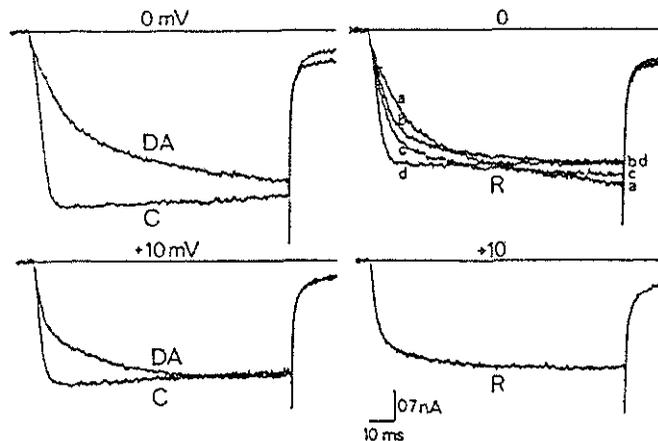
Las dos observaciones descritas constituyen las piezas angulares de la “firma cinética” característica que define e identifica a una de las vías de modulación de los $CCDV_N$ más ampliamente distribuida entre diferentes tipos neuronales de una amplia variedad de vertebrados: la inhibición “dependiente de voltaje” (VD, por *voltage-dependent*).

3.1.1.1. Mecanismo de Acción de la Inhibición Dependiente de Voltaje de $CCDV_N$

La explicación más simple para la inhibición de $CCDV_N$ por NT era suponer que estos últimos podrían estarse uniendo y bloqueando los $CCDV_N$, de la misma manera en que ciertas toxinas bloquean ciertos canales iónicos, y que la lenta activación de la corriente podía reflejar el curso temporal (dependiente de voltaje) del despegue de los NT (Marchetti et al., 1986). Existen, sin embargo, varias observaciones que sugerían que cada NT ejercía sus efectos mediante la activación de receptores membranales específicos: (1) Varios NT diferentes producen efectos

Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick

C. Marchetti^{***}, E. Carbone^{***}, and H. D. Lux



Ilustr. 2 Inhibición y entretardamiento de corrientes de Ca^{2+} neuronales inducidos por neurotransmisores. Efecto de la dopamina (DA, 10 μ M) en corrientes de Ca^{2+} HVA, registradas mediante la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula completa en una neurona sensorial en cultivo proveniente del DRG de pollo. Los valores que se encuentran en la parte superior de los trazos indican el valor del potencial en el pulso de prueba. C, control; R, recuperación. El panel superior derecho de la figura muestra los trazos de corriente a diferentes tiempos de la fase de recuperación (a, inmediatamente después del cese de la perfusión, b, c y d, 1, 2 y 5 min después, respectivamente).

similares (Dunlap y Fischbach, 1978, 1981); (2) Sus acciones son bloqueadas por antagonistas específicos para ciertos receptores heptahelicales (RHH; ver Apéndice III.1) (Dunlap y Fishbach, 1978; Mudge et al., 1979); y (3) Diferentes drogas producen efectos aditivos (Dunlap y Fishbach, 1981). Por lo tanto, tenía que haber un mecanismo compartido entre distintos RHH que vinculara su activación con un patrón de inhibición común de las corrientes de $CCDV_N$.

La configuración de célula completa obtenida con la técnica de *patch-clamp* aportó la posibilidad de acceder a la solución intracelular, dando la oportunidad de definir claramente los componentes iónicos y bioquímicos necesarios para la regulación de $CCDV_N$ inducida por NT. El esfuerzo de los múltiples grupos de investigación habría de dar un resultado contundente: ningún reporte pudo correlacionar la activación de alguna de las vías de señalización intracelular que utilizan segundos mensajeros convencionales (ver Apéndice III) con los fenómenos electrofisiológicos característicos de la inhibición VD (Forscher y Oxford, 1985; Forscher et al., 1986; Bley y Tsien, 1990; Bernheim et al., 1991; Plummer et al., 1991; Elmslie et al., 1994; Wilding et al., 1995).

La observación de que la adición de ATP a la solución de perfusión interna o de diálisis estabiliza las corrientes de $CCDV_N$, fue una de las primeras evidencias obtenidas de que la ruta del AMPc no se encuentra involucrada en la inhibición inducida por NT de las corrientes de $CCDV_N$ (Fedulova et al., 1981; Doroshenko et al., 1982; Forscher y Oxford, 1985). Más aún, ni concentraciones intracelulares de AMPc suficientes para saturar cualquier actividad de la proteína cinasa A (PKA; ver Apéndice III.1), ni la exposición a activadores directos de ésta, bloquean o enmascaran la expresión de la modulación inducida por NT (Dunlap, 1985; Forscher y Oxford, 1985; Bernheim et al., 1991).

Por otra parte, ni altas concentraciones de quelantes de Ca^{2+} en la solución interna (p.e., ~10 mM EGTA, ver Métodos), ni los inhibidores de la calmodulina (p.e., trifluoperazina) alteran la respuesta a NT o interfieren con la modulación (Forscher y Oxford, 1985; Bernheim et al., 1991). También fueron negativos los resultados del análisis de otra vía de señalización, que dependen de la producción del nucleótido cíclico de guanina monofosfatada (GMPc) por la enzima guanilato ciclasa (Forscher y Oxford, 1985; Bernheim et al., 1991), y aquéllos que se obtuvieron del examen de la actividad de una serie de fosfatasas (Elmslie et al., 1993).

La idea de que la proteína cinasa C (PKC; ver Apéndice III.3) estuviese involucrada en la inhibición de $CCDV_N$ resultaba particularmente atractiva porque esta cinasa se encuentra especialmente concentrada en los componentes membranales del tejido nervioso. Además, en el cerebro, una proporción sustancial de la PKC se encuentra asociada a membranas, mientras que en los demás tejidos, la enzima es recuperada principalmente de la fracción soluble y en configuración inactiva (Nishizuka, 1984). A pesar de que aún persiste la controversia respecto a su posible participación como mediador de alguna vía inhibitoria de $CCDV_N$ (ver 3.1.2.1), en el mejor de los casos, la inhibición de la corriente por la PKC que se ha reportado no se acompaña de ningún cambio evidente, ni en la dependencia de voltaje de la activación, ni en la cinética de la corriente (Rane y Dunlap, 1986; Doerner et al., 1988, 1990). Por otra parte, una gran cantidad de trabajos han descartado que los efectos de los NT puedan ser mimetizados por activadores de la PKC u ocluidos por inhibidores de ésta (Wanke et al., 1987; Dolphin et al., 1989; McFadzean et al., 1989; Bernheim et al., 1991; Plummer et al., 1991; Abrahams y Schofield, 1992; Elmslie et al., 1993). Por el contrario, existen fuertes evidencias que vinculan su actividad con una prevención de los efectos de NT inhibitorios (Lester y Jahr, 1990; Swartz et al., 1993; Swartz, 1993; Zhu e

Ikeda, 1994; Shapiro et al., 1996), posiblemente ligada a una estimulación de la actividad de los $CCDV_N$ (Yang y Tsien, 1993).

Lo dicho en el párrafo anterior es de suma importancia para el presente trabajo, pues es en el marco de la modulación positiva donde se desarrollará buena parte del estudio aquí presentado. La idea completa será tratada con detalle más adelante (ver 3.2). Por ahora, baste con que estas evidencias descarten también la participación de la PKC como intermediario de la inhibición VD.

Finalmente, el curso temporal con el que se establecen los efectos sobre la permeabilidad iónica de las vías que utilizan segundos mensajeros, es relativamente lento y puede persistir desde minutos hasta horas (Kehoe y Marty, 1980). En contraste, la inhibición de las corrientes por la vía VD se desarrolla en menos de 1 s, y desaparecen sus efectos dentro de 30 s tras la remoción del fármaco en condiciones de perfusión extracelular favorables (Deisz y Lux, 1985; Forscher y Oxford, 1985; Bernheim et al., 1991; Jones, 1991).

En resumen, ninguna de las vías intracelulares de transducción de señales mediadas por segundos mensajeros que estimulan, a su vez, la actividad de distintas cinasas, es responsable de mediar los efectos inhibitorios de la vía VD.

Una serie de observaciones particularmente interesantes sugería que el intermediario responsable de este tipo de inhibición no se desplazaba más allá de los confines de la membrana plasmática aledaña a los canales: las corrientes de $CCDV_N$ registradas en el modo *cell-attached*, no son inhibidas por la presencia de un NT en la solución que baña la célula, a pesar de que los RHH deben activarse en toda la superficie de la membrana plasmática que no esté contenida en la luz de la pipeta (Forscher et al., 1986; Bernheim et al., 1991). En contraste, los $CCDV_N$ pueden ser inhibidos en un sello *cell-attached* por NT aplicados a través del electrodo (Lipscombe et al., 1989; Hirning et al., 1990; Elmslie et al., 1994), o en un sello escindido en configuración *outside-out* por la rápida aplicación de los NT al sello (Wilding et al., 1995). Esto demuestra que el efecto es “delimitado a la membrana”: toda la maquinaria molecular necesaria para acoplar el receptor al canal se encuentra presente en el sello (Hille, 1994; Jones y Elmslie, 1997).

¿De qué manera se establece entonces la conexión entre los RHH y los $CCDV_N$? La respuesta habría de encontrarse pocos años después de la caracterización de una familia de proteínas

periféricas de membrana, que median el enlace intracelular entre la estimulación de un RHH y la producción de segundos mensajeros: las proteínas G (PG; ver Apéndice III.2).

Las primeras evidencias sobre la participación de las PG en la modulación de los $CCDV_N$ son publicadas en 1986 (Holz et al., 1986), y a partir de entonces, la utilización de una amplia batería de herramientas farmacológicas ha determinado, invariablemente, la participación de las mismas en la inhibición de $CCDV_N$ inducida por NT (Plummer et al., 1989; Bley y Tsien, 1990; Elmslie et al., 1990; Beech et al., 1991; Elmslie, 1992; Formenti et al., 1993; Shapiro et al., 1994b).

En breve, el grado de inhibición de la corriente se incrementa cuando se utilizan procedimientos que estimulan la actividad de PG, y disminuye con aquéllos que la inhiben. Entre los primeros, cabe destacar la diálisis intracelular con análogos no hidrolizables del GTP, como el $GTP\gamma S$. A diferencia del GTP, el cual es rápidamente hidrolizado por la actividad de GTPasa inherente a la subunidad α de las PG ($G\alpha$; ver Apéndice III.2) (Katada et al., 1986a,b), el $GTP\gamma S$ es un pobre sustrato de hidrólisis (Jakobs et al., 1983). Éste induce, por tanto, una activación persistente de PG. En consecuencia, la unión de $GTP\gamma S$ al sitio de unión de GTP en la subunidad $G\alpha$ produce una activación irreversible, e independiente de receptor, de las PG (Helmreich y Pfeuffer, 1976). En particular, la aplicación intracelular de $GTP\gamma S$ convierte los efectos inhibitorios de los NT sobre corrientes de $CCDV_N$, normalmente reversibles, en respuestas irreversibles, siendo, además, capaz de inducir *per sé* una inhibición “tónica” de las mismas (Holz et al., 1986; Scott y Dolphin, 1986; Hescheler et al., 1987; Wanke et al., 1987; Grassi y Lux, 1989; Marchetti y Robello, 1989; Kasai y Aosaki, 1989; Toselli et al., 1989; Lopez y Brown, 1991; Formenti et al., 1993).

En contraparte, la aplicación intracelular de $GDP\beta S$ - el cual compite con el GTP para los sitios de fijación del nucleótido y “atrapa”, por tanto, a las PG en conformación heterotrimérica inactiva - bloquea las acciones inhibitorias de los NT (Holz et al., 1986; Hescheler et al., 1987; Grassi y Lux, 1989; Swartz, 1993).

Otros procedimientos que se utilizan para inhibir la actividad de PG habrían de aportar evidencia experimental aún más valiosa: en buena parte de las preparaciones utilizadas, la inhibición VD puede ser eliminada tras un pretratamiento con la toxina de la bacteria *Bordetella*

pertussis (toxina pertussis; PTX). De manera similar a la toxina del cólera, la PTX transfiere el grupo ADP-ribosa desde el NAD^+ a un residuo de cisteína cercano al carboxilo terminal presente en algunas de las subunidades $G\alpha$ (α_v , α_s , α_o y en alguna de las subunidades α del tipo α_q y α_{11}). El efecto de esta modificación covalente es la de desacoplar estos subtipos de PG de los RHH que inducen su activación. Por lo tanto, el haber mostrado que la inhibición VD inducida por una variedad de RHH era bloqueada por PTX permitió asociar, en algunos casos, subtipos específicos de PG con dicha acción (Beech et al., 1992). En muchos de estos casos, la inhibición VD inducida por NT involucra la activación de $G\alpha_o$: la introducción de PG_o purificadas al interior de neuronas tratadas con PTX reestablece la inhibición de corrientes de CCDV_N inducida por agonistas, en mayor grado que lo que lo hacen las PG_i (Hescheler et al., 1987; Ewald et al., 1988), mientras que la introducción de anticuerpos contra $G\alpha_o$ son capaces de interferir con la inhibición (McFadzean et al., 1989).

Dada la falta de intermediarios conocidos, estos resultados llevaron rápidamente a un buen número de investigadores a postular que el mecanismo de inhibición VD, delimitado a la membrana, involucraba una interacción directa entre subunidades $G\alpha$ sensibles a PTX y CCDV_N (entre otros, Marchetti et al., 1986; Ewald et al., 1988; Bean, 1989b; Toselli et al., 1989; Elmslie et al., 1990; Hirning et al., 1990; Lopez y Brown, 1991; Boland y Bean, 1993). Sin embargo, había una evidencia que no encajaba bien con este escenario: no toda la inhibición VD de CCDV_N es mediada por G_o y bloqueada por PTX (Hille, 1994). En particular, se ha mostrado que la activación de PG insensibles a esta toxina puede inducir un patrón inhibitorio cinéticamente indistinguible de aquél inducido por PG sensibles a la misma (Song et al., 1989; Bernheim et al., 1991; Beech et al., 1992; Elmslie, 1992; Shapiro et al., 1994a; Ehrlich y Elmslie, 1995; Zhu e Ikeda, 1994).

Dos explicaciones podían dar cuenta de esta aparente inespecificidad de la inhibición VD: (1) Los CCDV_N carecían de selectividad frente a distintas subunidades $G\alpha$; (2) Distintas subunidades $G\alpha$ compartían un efector común. En 1987, el grupo de D. E. Clapham (Logothetis et al., 1987) habría de aportar, indirectamente, la clave para la solución de la disyuntiva anterior. Contrario hasta lo que entonces se había creído, la subunidad heterodimérica $\beta\gamma$ de las PG ($G\beta\gamma$, ver Apéndice III.2) no actuaba como una subunidad puramente reguladora de la actividad de $G\alpha$, sino que era el encargado de mediar la activación de un canal rectificador entrante de K^+

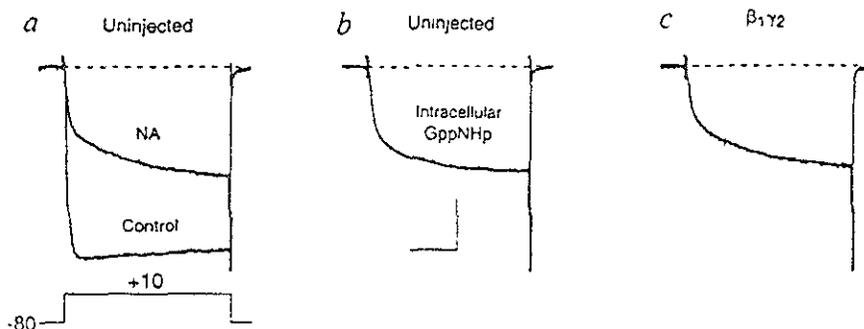
inducida por agonistas muscarínicos en el músculo cardíaco ($I_{K_{ACh}}$; revisado en Clapham, 1994, 1996; Clapham y Neher, 1997). Claramente, era posible concebir que la falta de especificidad sobre la corriente de $CCDV_N$ entre distintos tipos de PG pudiera deberse a la utilización común de subunidades $G\beta\gamma$ similares. La comprobación de esta hipótesis no era trivial y habría de aguardar casi una década. En particular, no podía emplearse el mismo procedimiento utilizado para el $I_{K_{ACh}}$ ya que las corrientes de $CCDV_N$ no se mantienen el suficiente tiempo en sellos escindidos como para poder aplicar las subunidades de las PG purificadas (Marchetti et al., 1986).

A principios de 1996 aparecieron dos reportes simultáneos (Ikeda, 1996, Herlitze et al., 1996) en los cuales se mostraba que la sobreconcentración de subunidades $G\beta\gamma$ en el interior de la célula, por transfección con el DNA que codifica (cDNA) estas proteínas (Ikeda, 1996; Herlitze et al., 1996) o por inyección intracitoplasmática de mRNA o de la proteína purificada (Herlitze et al., 1996), mimetiza (i.e., induce cambios similares) y ocluye (i.e., inhibe la expresión de cambios adicionales) la modulación inducida por la activación RHH y provoca un fenotipo de corriente constitutivamente inhibida, similar a aquella causada por inclusión de análogos no hidrolizables del GTP en la pipeta de registro (Ilustr. 3). En clara oposición, la sobreconcentración de subunidades $G\alpha$ atenúa la inhibición mediada por agonistas, lo cual es consistente con un hipotético secuestro de subunidades $G\beta\gamma$ (Ikeda, 1996). Desde entonces, tales observaciones han sido corroboradas y ampliadas por otros grupos de investigación (Shekter et al., 1997; Delmas et al., 1998b; Stephens et al., 1998a). De alguna manera, la hipótesis había sido comprobada, y esto llevó a consolidar la idea de que el heterodímero $G\beta\gamma$ es el único intermediario entre la activación de un RHH y los $CCDV_N$, y que, por lo tanto, actúa de manera directa sobre estos últimos. Aunque no se cuenta aún hoy día con una evidencia terminante al respecto, varios trabajos de biología molecular habrían de apoyar posterior y fuertemente esta postura.

Los CCDV neuronales son complejos heteromultiméricos constitutivos de membrana (Ilustr. 4; Apéndice II). En uno de los dos trabajos pioneros en el descubrimiento de que la subunidad $G\beta\gamma$ es la encargada de mediar el efecto de los NT sobre los $CCDV_N$, S. Ikeda (1996) señaló que una región citoplasmática que une dos de los cuatro dominios transmembranales (*loop I-II*; Ilustr. 4) de la subunidad principal (la subunidad α_1) de los CCDV que son moduladas por PG incluye, en su secuencia primaria, un motivo consenso (QXXER) previamente identificada como sitio crítico para la unión de subunidades $G\beta\gamma$ en la adenilato ciclasa 2 (Chen et al., 1995).

Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits

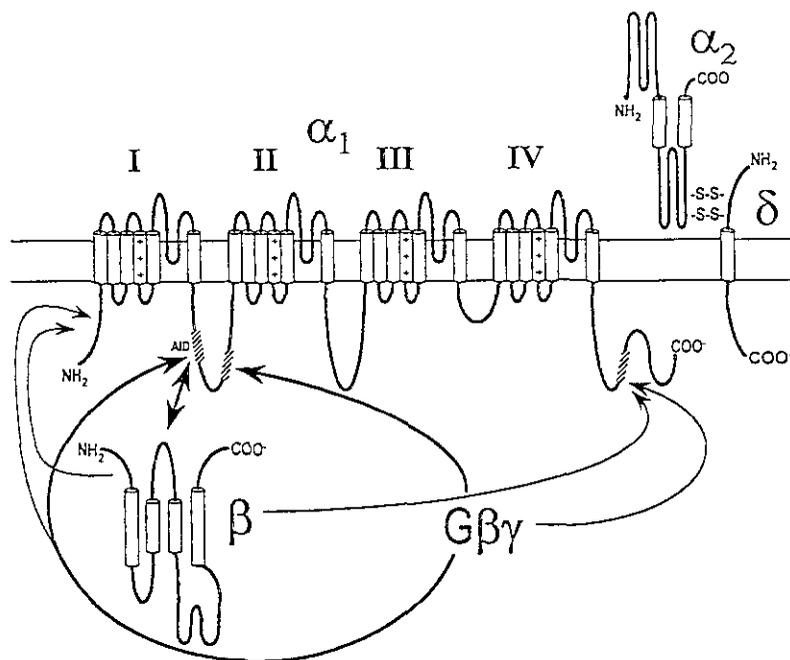
Stephen R. Ikeda



Ilustr. 3 El heterodímero $\beta\gamma$ de las proteínas G es el mediador de la inhibición dependiente de voltaje de $CCDV_N$. Enlentecimiento cinético de corrientes totales de Ca^{2+} - registradas en neuronas simpáticas en cultivo provenientes del SCG de rata - inducido por NE (a, 10 μM), activación directa de proteínas G (b, mediante la diálisis intracelular de un análogo no hidrolizable del GTP), ó por sobreexpresión heteróloga de subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (c, mediante la inyección intranuclear del DNA que codifica para los subtipos indicados en la figura). Barra de calibración: 500 pA y 20 ms.

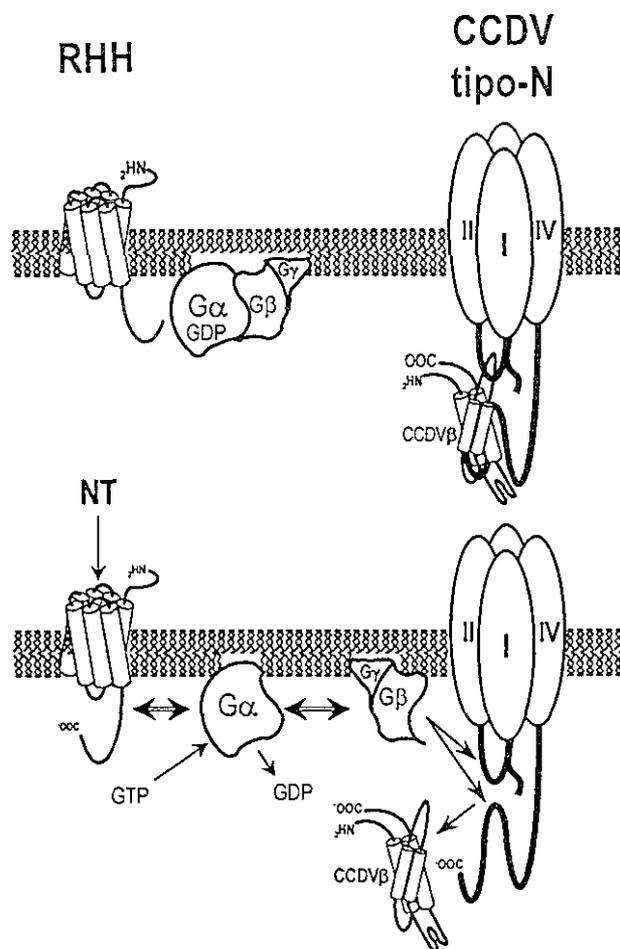
Casi de inmediato, se publicaron evidencias de que en esta región podría ocurrir una interacción entre subunidades α_1 de los CCDV y $\beta\gamma$ de las PG: (1) Dos regiones del *loop I-II* proveniente de subunidades α_1 que codifican para CCDV susceptibles de modulación VD (los CCDV tipo N y P/Q; ver Apéndice I.2) tienen afinidad *in vitro* por subunidades $G\beta\gamma$ (De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997); (2) En CCDV que no muestran inhibición por PG (p.e., los CCDV tipo L), la sustitución del *loop I-II* con aquel de CCDV modulables induce, en los primeros, algunas de las características fenotípicas de una corriente modulada por PG (Zamponi et al., 1997; Page et al., 1997); (3) Péptidos sintéticos, que contienen en sus secuencias los sitios postulados de interacción del *loop I-II*, son capaces de inhibir (presumiblemente por unión específica a $G\beta\gamma$) la modulación causada por adición, también en la pipeta de registro, de subunidades $G\beta\gamma$ purificadas (Zamponi et al., 1997) o de $GTP\gamma S$ (Herlitze et al., 1997).

Aunque estas evidencias no demuestran que la modulación de corrientes de $CCDV_N$ se dé por una interacción alostérica entre las subunidades $G\beta\gamma$ y α_1 en el *loop I-II* (Qin et al., 1997; Herlitze et al., 1997; Dolphin, 1998), sí constituyen una evidencia de que, *in vitro*, las regiones de α_1 que



Ilustr. 4 *Complejo oligomérico de los CCDV neuronales.* La estructura secundaria propuesta para la subunidad principal (α_1) establece un agrupamiento de la secuencia primaria en cuatro dominios homólogos (I-IV), compuesto cada uno de seis segmentos transmembranales (ver Apéndice II). La estructura de la subunidad citoplasmática (β) se desconoce, pero los análisis de la secuencia de aminoácidos sugieren una serie de α -hélices. La subunidad extracelular (α_2) se encuentra unida por una serie de puentes disulfuro (-S-S-) con la subunidad transmembranal δ . Se encuentran marcados, sobre la subunidad α_1 , los sitios de interacción con la subunidad β y con el heterodímero $\beta\gamma$ de las PG. El grosor relativo de las flechas indica la afinidad relativa de interacción entre las subunidades.

muestran afinidad *in vitro* para subunidades $G\beta\gamma$, también tienen afinidad por subunidades $G\beta\gamma$ libres. En un principio, estos resultados llevaron a algunos grupos (De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997) a postular que esta región es tanto necesaria como suficiente para que se exprese la modulación inducida por PG. Hoy en día, existen suficientes evidencias para pensar que, en realidad, el *loop I-II* es una de las varias regiones de la subunidad α_1 que son requeridas para la expresión completa del fenómeno (Zhang et al., 1996a; Herlitz et al., 1997; Qin et al., 1997; Stephens et al., 1998b). En particular, hay una región de 38 aminoácidos hacia la mitad de la larga cola *C-terminal* de la subunidad α_1 que tiene afinidad por subunidades $G\beta\gamma$ libres *in vitro*, a pesar de que no contiene la secuencia motivo propuesta como crítica para el anclaje de la subunidad $G\beta\gamma$ al *loop I-II* (Qin et al., 1997), y hay evidencias de que tanto esta región como el dominio I completo (incluyendo la región *N-terminal*; ver Apéndice II) son necesarios para que se



Ilustr. 5 Modelo de inhibición dependiente de voltaje por un mecanismo delimitado a la membrana.

manifieste el fenotipo completo de corrientes moduladas (Ilustr. 4) (Zhang et al., 1996a; Qin et al., 1997; Stephens et al., 1998b; Page et al., 1998; Hamid et al., 1999).

Aún no se conoce con precisión de qué manera interfiere la unión de $\text{G}\beta\gamma$ con el funcionamiento de los CCDV_N . Sin embargo, ha sido repetidamente subrayado un hecho notable: todas las regiones de la subunidad α_1 involucradas en la unión de $\text{G}\beta\gamma$ se superponen con las regiones de interacción entre las subunidades α_1 y β de los CCDV tipo N y P/Q (Ilustr. 4). Por otra parte, la expresión forzada de subunidades α_1 en ausencia de subunidades β provoca - además de los cambios en las características electrofisiológicas de las corrientes que se mencionan en el Apéndice II 2. - que los efectos inhibitorios de varios NT y neuromoduladores se vean aumentados (Beirrow et al., 1995, Roche et al., 1995, Bourinnet et al., 1996, Zhang et al.,

1996a), mientras que, de manera opuesta, la sobreexpresión de subunidades β en ovocitos bloquea la inhibición mediada por agonistas (Roche et al., 1995, Zhang et al., 1996a, Roche y Treisman, 1998).

Aunque aún no se entiende de qué manera las subunidades β de los $CCDV_N$ y $\beta\gamma$ de las PG pudieran alterar la sensibilidad de la subunidad α_1 al voltaje, es notorio que los cambios en el comportamiento cinético de las corrientes que inducen las primeras son antagónicos (ver Apéndice II.2) a los cambios que inducen las segundas. Estas observaciones llevaron a algunos grupos de investigación a proponer que la inhibición VD es el resultado de una competencia entre $G\beta\gamma$ y la subunidad β de los $CCDV_N$ por su unión a algún sitio dentro de la secuencia de la subunidad α_1 de los mismos (ver Apéndice II; Campbell et al., 1995; Dolphin, 1998). Sin embargo, la inhibición VD no puede reducirse a un escenario de competencia entre ambas subunidades: de ser esto así, sería esperable que la inhibición por $G\beta\gamma$ fuese nula en ausencia de expresión de subunidades β y no que aumentara en su presencia (Zhang et al., 1996a).

En resumen, el mecanismo de acción que subyace a la inhibición VD parece no involucrar más de tres pasos, y ser, por tanto, el más sencillo concebible (Ilustr. 5): (1) La unión de un NT a un RHH induce la activación de PG; (2) La disociación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ induce la liberación de subunidades $G\beta\gamma$; (3) Estas últimas, siguiendo una vía delimitada a membrana, interactúan de manera directa con la subunidad α_1 de los $CCDV_N$.

3.1.1.2. El Modelo "willing-reluctant" y el Fenómeno de Facilitación de Corrientes de $CCDV_N$

"In its most general form the allosteric mechanism is defined by two statements, one negative, the other positive.

1. No direct interactions of any kind need occur between the substrate(s) of an allosteric protein and the regulatory metabolite which controls its activity.

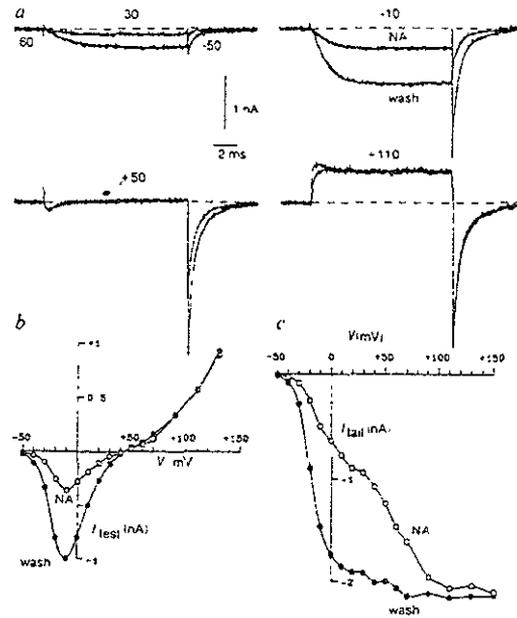
2. The effect is entirely due to a reversible conformational alteration induced in the protein when it binds the specific effector."

J. Monod, J. P. Changeux y F. Jacob, 1963

Según la discusión anterior, el mecanismo de acción propuesto para explicar la inhibición VD sugiere que, en analogía con la regulación de la dependencia de sustrato que guardan ciertas enzimas (Monod et al., 1963, 1965), la modulación se lleva a cabo por un mecanismo alostérico

Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence

Bruce P. Bean



NATURE · VOL 340 · 13 JULY 1989

Ilustr. 6 La inhibición dependiente de voltaje resulta de un corrimiento en la dependencia de voltaje de la activación de los $CCDV_N$. Inhibición inducida por NE (30 μ M) de corrientes totales de Ca^{2+} , registradas en una neurona sensorial en cultivo proveniente del DRG de rana. Los valores que se encuentran en la parte superior de los trazos en *a* indican el valor del potencial en el pulso de prueba. Los paneles inferiores muestran las curvas I-V para la corriente durante el pulso de prueba (*b*) y de la cola de corriente registrada durante la repolarización de la membrana tras el fin de dichos pulsos (*c*).

(Bean, 1989b). ¿De qué manera repercute esta interacción 'proteína-proteína' en el funcionamiento de los $CCDV_N$ en forma tal que se altere el curso temporal y la dependencia de voltaje de la activación de la corriente que transportan? ¿Qué tipos de cambios en la cinética de los canales induce la unión de subunidades $G\beta\gamma$?

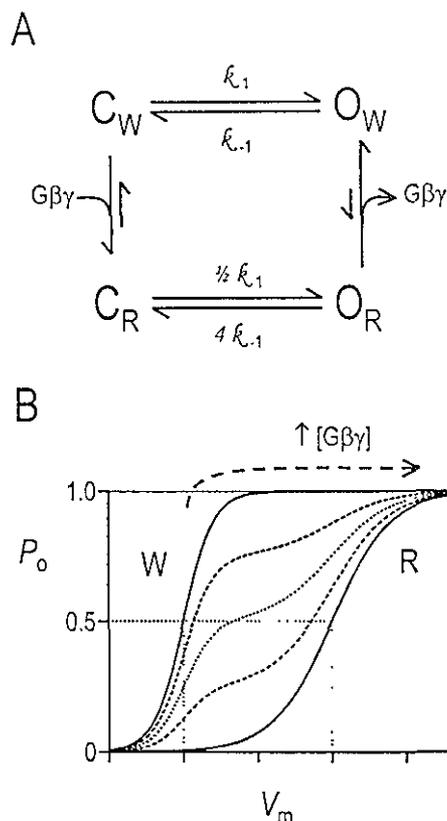
De las muchas teorías, y esquemas cinéticos asociados, que han sido invocadas para dar explicación a los fenómenos asociados con la inhibición VD (p.e., Marchetti et al., 1986; Grassi y Lux, 1989; Kasai y Aosaki, 1989; Swandulla et al., 1991; Kasai, 1992; Pollo et al., 1992; Golard y Siegelbaum, 1993), ninguna ha probado tener la capacidad explicativa y predictiva que tiene el modelo "willing-reluctant" (ver adelante) propuesto por B. P. Bean (1989b). De hecho, a pesar de que han pasado casi doce años desde su planteamiento original, esta teoría constituye el marco conceptual más extensamente utilizado para explicar las características funcionales claves de esta forma de modulación de CCDV.

La observación central que fundamenta al modelo aludido es la siguiente. Las curvas de activación de corrientes de CCDV - trazadas a partir de las corrientes de cola registradas al *off* de

pulsos de prueba a varios potenciales (ver Apéndice I.1) -, que son bastante simétricas con respecto al punto medio de activación máxima en condiciones basales, en presencia de un NT se vuelven claramente bifásicas, con un componente similar al control (pero fuertemente reducido) en un rango de potenciales medianamente despolarizantes, y un nuevo componente que satura a potenciales sumamente despolarizantes (Ilustr. 6). El hecho de que el valor de corriente máxima registrada en este último caso alcanzase valores semejantes en ambas condiciones, llevó a B. P. Bean a postular que, la mayor parte de los canales se encuentran aún funcionales tras el tratamiento con NT y que, por tanto, la inhibición no podía ser entendida en términos de una reducción en el número de canales funcionales. “*Más bien, una fracción de los canales parece sufrir un corrimiento en la dependencia de voltaje de manera que ya no puedan ser abiertos por pequeñas o moderadas despolarizaciones pero que aún puedan ser abiertos por muy grandes despolarizaciones*” (Bean, 1989b).

En estos términos, la población de $CCDV_N$ podía ser concebida como compuesta por dos sub-poblaciones en equilibrio dinámico. Cada una de ellas puede ser representada por un modo de apertura (ver Apéndice I.1.4) distintivo. Dado que, ni la dependencia de voltaje de la inactivación, ni la conductancia unitaria de los $CCDV_N$, son afectadas por la presencia de NT, la diferenciación entre ambos modos operativos distintivos fue establecida por Bean exclusivamente en términos de la probabilidad con la que se abrirían frente a una despolarización moderada: un modo *willing* (W; “dispuesto”) de alta probabilidad de apertura, característico de canales no inhibidos, y un modo *reluctant* (R; “reticente”), inducido por la unión de PG, en el cual se requiere de despolarizaciones más fuertes para abrirlos (Ilustr. 7A).

Dado que el término “equilibrio” implica la interconvertibilidad de los canales entre ambos modos operativos, el efecto de las PG es explicado como un desplazamiento del equilibrio de la reacción, dependiente de la concentración de PG activas ([PG]), hacia el modo *reluctant* (Bean, 1989b; Ilustr. 7A). Esta aplicación directa de la ley de acción de masas, operando en sentido inverso, es invocada en el modelo para explicar la fase de lenta activación de la corriente que se presenta durante despolarizaciones largas a potenciales medianamente despolarizantes. Una despolarización de este tipo produciría, en los primeros milisegundos, la activación de la gran mayoría de los canales en el modo *willing*, pero prácticamente ninguna activación de canales en el modo *reluctant*. Sin embargo, si la interconversión de los canales entre ambos modos operativos es lo suficientemente rápida, la reducción en el número de canales *willing* en el estado cerrado (C_w) provocaría la rápida conversión de canales *reluctant* cerrados (C_R) al estado C_w seguido de su



Ilustr. 7 El modelo willing-reluctant de la inhibición delimitada a membrana de los $CCDV_N$. **A** Las constantes de velocidad (en s^{-1}) derivadas del análisis de corrientes macroscópicas por Elmslie et al, 1990, están dadas por $k_1 = 200 e^{+0.06(V+5)}$ y $k_{-1} = 200 e^{-0.06(V+5)}$. C_W y O_W representan los estados *willing* cerrado y abierto, respectivamente. C_R y O_R representan a los estados *reluctant* cerrado y abierto, respectivamente. Las transiciones verticales, que corresponden al pegado y desunión de $G\beta\gamma$, son consideradas independientes de potencial. El cambio en la afinidad de esta interacción entre los estados abierto y cerrado está representada esquemáticamente por la longitud relativa de las flechas de transición. **B** Cada modo de apertura está diferenciado en términos de la probabilidad de que un canal sea abierto durante una despolarización a un voltaje dado (P_o). En el modo *willing* (W) los canales son activados rápidamente por pulsos de voltaje medianamente despolarizantes, mientras que en el *reluctant* (R), los canales requieren de despolarizaciones mucho más grandes y tienen una dependencia del voltaje menos marcada. En cada modo se asume que los canales tienen una curva de activación dada por una función de Boltzmann (ver texto), de manera que la curva de activación de una población heterogénea es representada por la suma de dos funciones independientes de este tipo.

rápida activación (O_W), en el curso de una despolarización prolongada. El lento desarrollo de la corriente sería, por lo tanto, un reflejo directo no solamente de la conversión *reluctant* \rightarrow *willing* sino también del tránsito forzado de los primeros a través de un número mayor de estados cerrados ($C_R \rightarrow C_W \rightarrow O_W$; Ilustr. 7A). En último término, dada una despolarización lo suficientemente fuerte como para abrir todos los canales en el modo *willing*, virtualmente todos

los canales que se encontraban inicialmente en el modo *reluctant* también se abrirían eventualmente (Bean, 1989b).

Finalmente, se asume que, en cada modo, los canales tienen una curva de activación independiente dada por una función de Boltzmann de la forma:

$$P(V) = \frac{P_{\max}}{1 + e^{\frac{(V - V_{0.5})}{k}}}$$

donde P_{\max} corresponde a la máxima probabilidad de apertura, $V_{0.5}$ es el valor del voltaje al que se alcanza la mitad de dicho valor - esto es, el punto de inflexión de la curva -, y k es la sensibilidad relativa a los cambios de voltaje - que corresponde a la pendiente de la parte lineal de la curva - (Ilustr. 7B, curvas continuas).

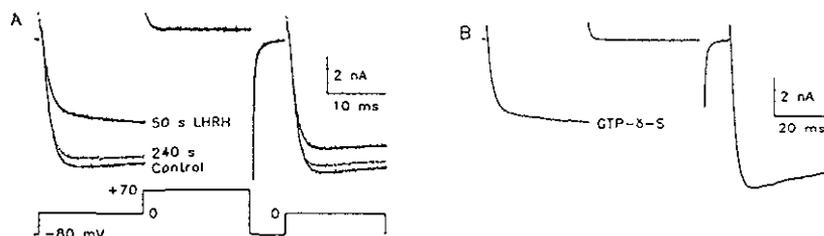
Una implicación directa de la suposición anterior del modelo es que, una población mixta de $CCDV_N$, compuesta tanto por canales en modo *willing* como en modo *reluctant*, tendría una curva de activación claramente asimétrica con respecto a $V_{0.5}$, y podría ser descrita con una función compuesta por la suma de dos ecuaciones de Boltzmann (Ilustr. 7B, curvas punteadas). El componente de esta sumatoria con $V_{0.5}$ más negativo correspondería a la curva de activación de canales *willing*, mientras que el restante correspondería a la activación de canales *reluctant*.

Al año siguiente de la publicación anterior, Elmslie et al. (1990) incorporaron al modelo de Bean una vía de transición adicional entre ambos modos de apertura: a través de los estados abiertos respectivos. Esto es, en su versión del modelo *willing-reluctant*, el intercambio modal puede ocurrir tanto entre canales cerrados como entre canales abiertos. Sin embargo, la constante de equilibrio de la transición entre estados cerrados favorece al modo *reluctant*, mientras que aquella de los estados abiertos favorece al modo *willing* (Ilustr. 7A). Esta aportación, trivial a primera vista, tiene profundas repercusiones en la fisiología de los $CCDV_N$, y era absolutamente crucial para dar cuenta de un fenómeno denominado "facilitación" (Ilustr. 8).

El razonamiento que justifica lo anterior es el siguiente. Si existe una vía de interconversión entre ambos modos a través de los estados abiertos ($O_R \leftrightarrow O_W$), y si la constante de equilibrio de esta transición favorece al estado O_W , entonces, dada una despolarización de amplitud y duración suficientes como para activar la mayor parte de los canales, habrá un movimiento neto de canales

LHRH and GTP- γ -S Modify Calcium Current Activation in Bullfrog Sympathetic Neurons

Keith S. Elmslie, Wei Zhou, and Stephen W. Jones



Ilustr. 8 La inhibición dependiente de voltaje de $CCDV_N$ es transitoriamente revertida por una fuerte y breve despolarización de la membrana. Facilitación de corrientes de totales de Ca^{2+} - registradas en neuronas simpáticas en cultivo provenientes de los ganglios paravertebrales de rana - en presencia de LHRH en la solución externa (A, 100 nM a dos tiempos distintos) ó de GTP γ S en la solución interna (B, 100 μ M). Nótese, en la parte inferior del panel A, el *prepulso* a +70 mV que separa a los dos pulsos de prueba idénticos utilizados para evocar la corriente.

a través de la vía $C_R \rightarrow O_R \rightarrow O_W$ durante este estímulo. Tras el fin del pulso, los mismos canales seguirían, una ruta $O_W \rightarrow C_W \rightarrow C_R$ (Ilustr. 7A). Supongamos que dicho pulso fuertemente despolarizante (el “*prepulso*” del protocolo de fijación de voltaje; Ilustr. 8), es sucedido un pulso de prueba medianamente despolarizante - que en condiciones normales activaría exclusivamente canales *willing* - con un intervalo de tiempo lo suficientemente breve como para prevenir que los canales alcancen el estado C_R . En tal caso, habrá un incremento neto en la población de canales reclutables por el pulso de prueba - respecto de un pulso idéntico aplicado sin el *prepulso* - el cual será directamente proporcional a la cantidad de canales previamente inhibidos (Ilustr. 8; Elmslie et al., 1990). Un aumento en la amplitud de la corriente - acompañado de un reestablecimiento de las cinéticas de activación normales de la misma - es justamente lo que ha sido observado repetida y sistemáticamente por todos los estudios que han utilizado dicho protocolo en condiciones que favorecen la activación de vías inhibitorias VD (Ilustr. 8).

Al fenómeno descrito se le denomina “facilitación por *prepulsos* de corrientes de $CCDV_N$ ”. Éste ha sido repetidamente observado con la inclusión de GTP, y su homólogo no-hidrolizable, GTP γ S en la pipeta de registro (Ikeda, 1991; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Herlitz et al., 1996; Stephens et al., 1998a), tras la sobreexpresión de subunidades $G\beta\gamma$, y en presencia de NTf y hormonas, que activan RHH acoplados a vías de inhibición VD. A su vez, el fenómeno es

encuentra todavía inclinada hacia el modo *willing* durante el pulso de prueba siguiente, dando como resultado la facilitación de la corriente.

Este cuadro simple, a pesar de que sigue sin haberse comprobado (Bean, 2000), ofrece una explicación satisfactoria para una variedad de cambios complejos en la cinética y en la dependencia de voltaje de las corrientes. Sin embargo, ¿Cuáles son las evidencias experimentales en las que este modelo se sostiene?

Las siguientes implicaciones necesarias del modelo han sido observaciones experimentales frecuentes:

- 1) La constante de tiempo con la que se desarrolla la reinhibición (τ_{reinh}) de los canales tras un *prepulso* es dependiente de la concentración de [PG] e independiente de voltaje a potenciales donde los canales están mayoritariamente cerrados (Lopez y Brown, 1991; Golard y Siegelbaum, 1993; Elmslie y Jones, 1994; Ehrlich y Elmslie, 1995; Jones y Elmslie, 1997; Zamponi y Snutch, 1998).
- 2) La constante de tiempo del curso temporal de la facilitación (τ_{fac}) es función inversamente proporcional del potencial de membrana, e independiente de [PG] (Kasai, 1992; Elmslie y Jones, 1994; Ehrlich y Elmslie, 1995; Jones y Elmslie, 1997).
- 3) La amplitud del componente de activación lenta es dependiente de [PG], pero la constante de tiempo con la que éste se activa (τ_{act}) es independiente de aquélla (Kasai, 1992; Pollo et al., 1992; Elmslie y Jones, 1994).
- 4) A potenciales muy despolarizantes, $\tau_{\text{act}} < \tau_{\text{fac}}$ (Boland y Bean, 1993; Elmslie y Jones, 1994).

Los efectos de [PG] sobre τ_{reinh} y τ_{fac} pueden ser cualitativamente explicados si se asume que las transiciones *willing* \leftrightarrow *reluctant* están gobernadas por una reacción bimolecular simple - independiente de voltaje - en la que la reacción de unión depende de la concentración de reactantes pero en la que su separación es independiente de ésta (Elmslie y Jones, 1994; Ehrlich y Elmslie, 1995).

Entonces, si las PG se unen a los CCDV y si la unión-separación es el paso limitante de la reacción, la constante de tiempo de la reacción global está dada por:

$$\frac{1}{\tau} = k_{on}[PG] + k_{off}$$

donde k_{on} es la tasa de unión y k_{off} es la tasa de separación. En el modelo *willing-reluctant*, las constantes de velocidad, k_{on} y k_{off} , varían como función del voltaje como consecuencia directa del estado en que se encuentren los canales. A potenciales muy negativos, en los que la mayor parte de los canales se encuentran cerrados, la afinidad de los $CCDV_N$ por las PG es máxima y una buena parte de ellos pueden ser inhibidos. Por lo tanto, $k_{on}[PG] > k_{off}$ y las alteraciones en la [PG] afectan fuertemente la constante de tiempo resultante (τ_{reinh}). Por otra parte, ya que la mayor parte de la inhibición puede ser revertida por voltaje, a valores de potencial muy positivos $k_{off} \gg \gg k_{on}$ y la constante de tiempo de la reacción (τ_{fac}) estará dominada por k_{off} de manera que las variaciones en [PG] tendrán poco efecto sobre ésta.

Según lo anterior, la dependencia de [PG] de τ_{reinh} implica que: (1) La velocidad de establecimiento de la unión PG- $CCDV_N$ está gobernada por ley de acción de masas y es favorecida por el estado del canal; y (2) Que los canales se vuelven no-modulados durante el *prepulso* (Elmslie y Jones, 1994). Por su parte, el hecho de que $\tau_{act} < \tau_{fac}$ a valores de potencial del *prepulso* que generan facilitación máxima (punto 4), implica que los canales inhibidos primero se activan y luego facilitan. Esto último apoya la suposición de que las PG se disocian más fácilmente de los canales abiertos que de aquéllos cerrados (Boland y Bean, 1993).

Los datos que han sido obtenidos del registro de canales únicos han mostrado que las PG no afectan la conductancia unitaria de los canales, y, además, los efectos en la cinética de los mismos han probado ser completamente interpretables en el marco del modelo descrito. (Evidentemente, el diagrama de la Ilustr. 7A es una simplificación: se requiere de más de dos estados posibles por modo de apertura para describir el proceso de activación completa de las corrientes de $CCDV$; ver Apéndice I.1.4 y sección 9.5 de la Discusión). A potenciales por debajo del umbral de activación de la población *reluctant*, la vía de activación de los canales modulados sigue, principalmente, una ruta de “intercambio preferencial” (Patil et al., 1996), en el cual el despegue de las PG predomina antes de que existan aperturas *reluctant* apreciables ($C_R \rightarrow C_W \rightarrow O_W$). Esto es, los registros llevados a cabo en este rango de potenciales, han mostrado que los NT causan una marcada reducción en la probabilidad de apertura, debida a un pronunciado aumento –

completamente reversible por *prepulsos* - en la latencia a la primer apertura (Carabelli et al., 1996; Patil et al., 1996; Colecraft et al., 2000; Lee y Elmslie, 2000).

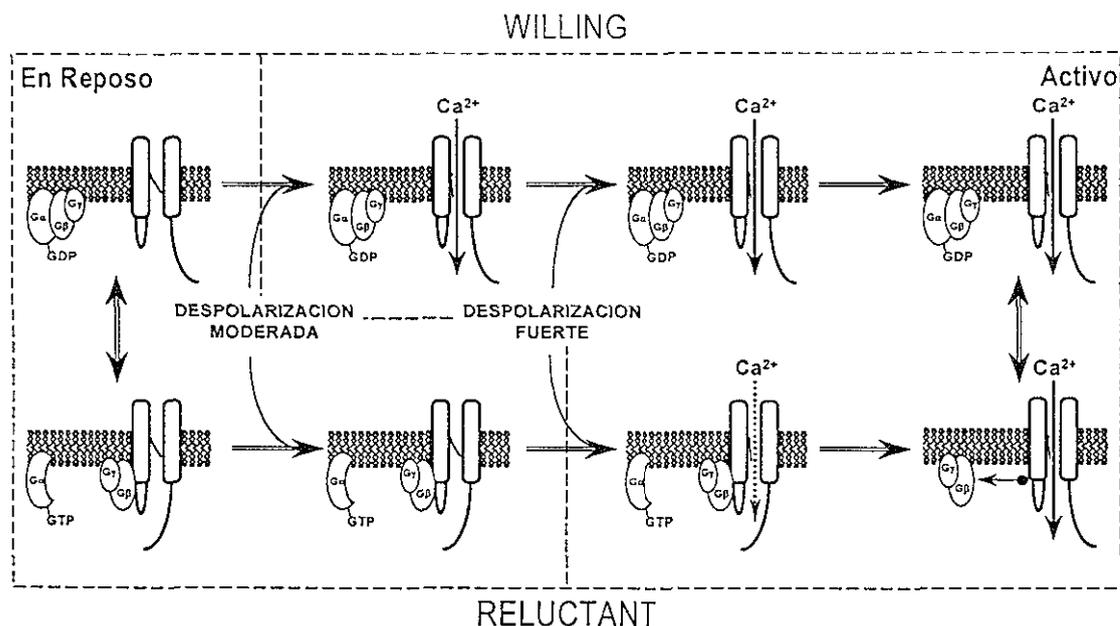
A potenciales más positivos, existe un escenario de “intercambio permisivo” (Patil et al., 1996), en el que despolarizaciones lo suficientemente fuertes son capaces de llevar a los canales *reluctant* a abrirse apreciablemente antes de que las PG tengan tiempo de despegarse ($C_R \rightarrow O_R$; Elmslie et al., 1990; Boland y Bean, 1993). Las aperturas *reluctant* son característicamente breves y van seguidas de largos tiempos de cerrado (Lee y Elmslie, 2000) que preceden a menudo a una transición hacia un modo de apertura de alta probabilidad (Colecraft et al., 2000; Lee y Elmslie, 2000).

A la luz de las observaciones que llevaron a proponer que las subunidades $G\beta\gamma$ son necesarias y suficientes para inducir modulación VD de los $CCDV_N$ (ver 3.1.1.1), y con las evidencias que establecieron la hipótesis de que la inhibición es el producto de una interacción directa entre ambos (Miller, 1990; Hille, 1994; Diversé-Pierluissi et al., 1995; Wickman y Clapham, 1995), es posible plantear el modelo *willing-reluctant* (Ilustr. 7A) de la manera en la que se esquematiza en la Ilustr. 9. Según ésta, la asociación directa de un complejo $G\beta\gamma$ con una o más regiones del $CCDV_N$ sería la responsable de que el canal pasara del modo de apertura *willing* a uno *reluctant*. Por su parte, la facilitación de las corrientes de $CCDV_N$ por *prepulsos* dependería de la remoción, durante la fuerte despolarización, de la interacción entre $G\beta\gamma$ y el $CCDV_N$.

3.1.1.3. Inhibición Tónica

El grado de facilitación de corrientes de $CCDV_N$ que induce un *prepulso* es hoy día universalmente considerado como una medida directa del grado de inhibición VD (ver 3.1.1.2) inducida por PG. El establecimiento de esta correlación causal proveyó, la herramienta experimental por excelencia utilizada en la investigación de los mecanismos involucrados en la inhibición de los $CCDV$ neuronales (de tipo N y P/Q), y permitió también una explicación racional al fenómeno de la “facilitación basal” que hasta entonces se había tenido por paradójico en la literatura.

El primer reporte del fenómeno de facilitación de corrientes de Ca^{2+} por *prepulsos* despolarizantes es tan antiguo como el aislamiento mismo de la corriente mediante la técnica de



Ilustr. 9 Interconversión entre modos de apertura willing y reluctant inducida por la unión de $G\beta\gamma$ con la subunidad principal de los $CCDV_N$. La interpretación molecular del modelo *willing-reluctant* sostiene que los canales en el modo de apertura *reluctant* se encuentran unidos a $G\beta\gamma$, mientras que aquéllos en el modo *willing* se encuentran libres de éstas. Una despolarización moderada rápidamente lleva a la apertura de canales *willing*. En contraste, los canales *reluctant* requieren de despolarizaciones más fuertes para ser abiertos.

patch-clamp. En uno de los dos trabajos pioneros contemporáneos, el grupo de E. Neher reporta dicho fenómeno en células cromafines bovinas en cultivo (Fenwick et al., 1982) y subraya el contraste que establece este comportamiento de los $CCDV$ con lo que se hubiese esperado de una analogía directa con la respuesta al voltaje de otros canales iónicos. En 1984, el grupo de S. J. Smith y J. Rothlein (Hoshi et al., 1984) repite la observación en la misma preparación y plantea su posible vínculo con la facilitación de la liberación de catecolaminas inducida por estimulación repetitiva. Sin embargo, estos trabajos sugerían que el fenómeno era producto de reacciones intrínsecas a los propios $CCDV$.

La estandarización del protocolo de *prepulsos* por K. S. Elmslie y S. W. Jones (Elmslie et al., 1990) para el estudio de la inhibición inducida por NT (Ilustr. 8), llevó al grupo de A. C. Dolphin (Scott y Dolphin, 1990) a postular la hipótesis obvia que vincula al fenómeno reportado por el grupo de Neher con el conocimiento que se había acumulado sobre la modulación inducida por NT: la facilitación de $CCDV$ se origina a partir de una "inhibición tónica" por PG basalmente activas en ausencia de estimulación experimental. La demostración formal de esta explicación aparece al año siguiente en un meticuloso y exhaustivo estudio de S. R. Ikeda (1991) en neuronas

del SCG de ratas adultas. El autor demuestra que el fenómeno que se observa en condiciones basales comparte todas y cada una de las características electrofisiológicas que se habían descrito para la inhibición inducida por NT. Más aún, la exquisita correlación en la sensibilidad farmacológica de ambos fenómenos a la diálisis intracelular con un inhibidor o un activador directo de PG (GDP β S y GTP γ S, respectivamente), aportó la evidencia final para vincularlos en un sustrato bioquímico común.

Un número importante de trabajos que han aparecido desde entonces, ha reproducido sistemáticamente la observación anterior (p.e., Kasai, 1991; Swartz, 1993; Yang y Tsien, 1993; Luebke y Dunlap, 1994; Zhu e Ikeda, 1994) y han llevado a la consolidación de que, al menos en cultivo, los CCDV_N suelen encontrarse en un moderado (generalmente menor al 10%) nivel de inhibición tónica. La sensibilidad al voltaje de esta inhibición ha llevado repetidamente a la especulación sobre su posible vínculo con el fenómeno de facilitación de la liberación de NT que se ha observado tras la estimulación repetitiva de ciertas terminales nerviosas. Sin embargo, las dos preguntas fundamentales que saltan de inmediato a la mente siguen sin explicación fundamentada alguna: ¿Es este fenómeno inducido por las condiciones en las que se desarrollan los cultivos neuronales o representa un fiel reflejo de lo que ocurre *in situ*? En cualquier caso, ¿Qué - y cómo - lo origina?

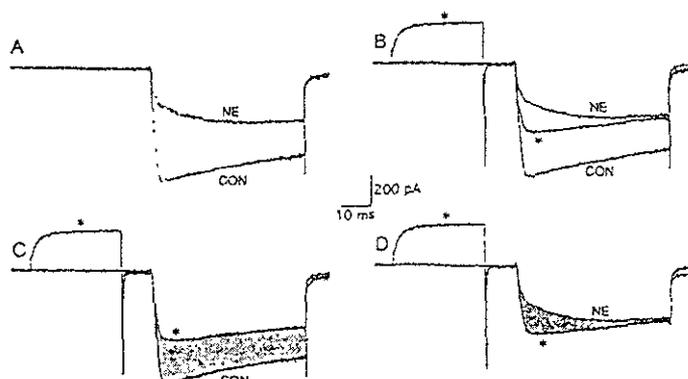
No vale la pena repetir aquí todas las especulaciones que se han planteado como explicación de lo anterior, puesto que aún no hay evidencia experimental que las sustente. La única excepción está dada por una evidencia negativa: mientras que la inhibición sensible al voltaje que induce la activación de un RHH es - en la mayor parte de los casos - sensible a PTX, la inhibición tónica no puede ser removida por dicho tratamiento. Por tanto, parece poco probable que sea mediada por PG de las familias G_o o G_i (Ikeda, 1991; Kasai, 1991; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994).

3.1.2. Vías de Inhibición de CCDV_N Independientes de Voltaje

Con excepción de algunos casos aislados, y que parecen estar confinados a estudios llevados a cabo en sistemas de expresión (p.e., Kasai, 1992; Patil et al., 1996), la inhibición de CCDV_N neuronales inducida por NT no puede ser descrita en su totalidad por modelos exclusivamente dependientes de potencial, en los que se encuentre implícita la suposición de que la modulación

Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms

Jennifer I. Luebke, Kathleen Dunlap



Ilustr. 10 La inhibición independiente de voltaje corresponde a la porción de la inhibición total que no es revertida por un prepulso. A Corrientes totales de Ca^{2+} - registradas en neuronas sensoriales en cultivo provenientes del DRG de pollo - evocadas por pulsos de 50 ms a 0 mV en ausencia (CON) y presencia de NE (100 μM). B Trazos de I_{Ca} superpuestos, en ausencia y presencia de NE. El trazo marcado con * fue tomado en esta última condición tras un prepulso de 30 ms a +80 mV. La diferencia entre los trazos marcados con CON y * (región sombreada en C) es tomada como el componente de inhibición independiente de voltaje, mientras que la diferencia entre los trazos marcados con NE y * (región sombreada en D) es tomada como el componente de inhibición dependiente de voltaje (y asociado con un *enlentecimiento cinético*).

involucra un único proceso homogéneo (Luebke y Dunlap, 1994). La afirmación anterior parte de dos evidencias experimentales principales: (1) La reversión de los efectos inducidos por NT por potenciales despolarizantes es generalmente incompleta (Marchetti et al., 1986; Grassi y Lux, 1989; Kasai y Aosaki, 1989; Elmslie et al., 1990; Scott y Dolphin, 1990; Boland y Bean, 1993; Elmslie y Jones, 1994), de manera que una fracción variable (de entre el 10 y el 30%) de la inhibición permanece incluso a potenciales sumamente despolarizados (Grassi y Lux, 1989; Elmslie et al., 1990; Beech et al., 1992; Boland y Bean, 1993; Formenti et al., 1993; Luebke y Dunlap, 1994); (2) Al menos parte de la reducción de la corriente de CCDV no está asociada con un *enlentecimiento* de la cinética de activación (Dunlap y Fischbach, 1981; Forshcer y Oxford, 1985; Bernheim et al., 1991; Beech et al., 1992; Diversé-Pierluissi y Dunlap, 1993; Formenti et al., 1993; Luebke y Dunlap, 1994) (Ilustr. 10).

Como consecuencia directa del primer punto, la interrupción transitoria de la inhibición que induce un *prepulso* es generalmente incompleta, aún con la utilización de un protocolo de voltaje que induzca facilitación máxima (Elmslie et al., 1990; Boland y Bean, 1993). Resultado del

segundo es que una disminución sustancial de la amplitud de la corriente permanezca al final de despolarizaciones con duraciones de varias veces la constante de tiempo calculada para el componente de activación *enlentecida* (Boland y Bean, 1993; Luebke y Dunlap, 1994). Ambos efectos están interrelacionados: la inhibición de la corriente que no es revertida por tiempo, tampoco lo es por voltaje, de manera que, en corrientes en las que se presenta un *enlentecimiento* cinético, se observa una dramática atenuación de la inhibición por *prepulsos* y, en contraste, en las que no, la magnitud de ésta no muestra sensibilidad al voltaje (Ilustr. 10; Luebke y Dunlap, 1994).

Más aún, en una misma preparación, ciertos RHH se encuentran asociados a vías de señalización que inducen una disminución de la amplitud corrientes de $CCDV_N$ principalmente asociada con cinéticas de activación enlentecidas y fuerte sensibilidad al voltaje, mientras que la activación de otros RHH desencadena una reducción porcentual insensible al voltaje y no asociada con alteraciones cinéticas (Beech et al., 1991, 1992; Bernheim et al., 1991, 1992; Formenti et al., 1993).

Es universalmente aceptada la interpretación según la cual todos los fenómenos anteriores son manifestaciones de que existen al menos dos patrones de inhibición que convergen en $CCDV_N$: aquél que induce una modulación VD, y otro, distinto, que reduce la corriente de manera independiente de voltaje (VI, por *voltage-independent*; Hille, 1994). Del primero son características distintivas el *enlentecimiento* cinético y la reversión por voltaje, mientras que el segundo engloba todo aquello que no comparte ambas características (Ilustr. 10; Luebke y Dunlap, 1994).

La falta de alteraciones cinéticas en la inhibición VI le ha valido la denominación alternativa de “inhibición de estado estacionario” (*steady-state inhibition*; Luebke y Dunlap, 1994). Valga hacer notar que, si bien la presencia de alteraciones cinéticas indica inequívocamente la presencia de una inhibición VD prominente, la ausencia de las mismas ha de tomarse con cautela para descartarla, puesto que se requieren de inhibiciones superiores al 50% de la corriente total para que su contribución al comportamiento global de la corriente sea significativa dentro de los tiempos relativamente cortos de los pulsos de voltaje normalmente utilizados para estimularla (Jones y Elmslie, 1997). Sin embargo, el patrón de dependencia del voltaje puede ser utilizado como índice claro del grado de contribución relativa de cada vía. Hay dos maneras de cuantificar

esto: (1) Trazando curvas de activación de la corriente; (2) Analizando el efecto de un protocolo de voltaje que incorpore un *prepulso*.

Generalmente, ambos métodos dan resultados cualitativamente similares. Aquellas inhibiciones que no son revertidas por *prepulsos* tampoco alteran la dependencia de voltaje de la corriente remanente. Sin embargo, únicamente la comparación directa entre la magnitud de la inhibición a diferentes potenciales, en registros de corrientes de cola, puede ser tomada como una estimación cuantitativa del grado relativo de contribución de ambas, por lo siguiente. La reinhibición de los canales tras la facilitación se desarrolla de una manera dependiente de la [PG] (ver 3.1.1.2), con una constante de tiempo del orden de 30 a 50 ms a dichos potenciales (Lopez y Brown, 1991; Golard y Siegelbaum, 1993; Elmslie y Jones, 1994). Por lo tanto, una repolarización de 15 ms puede causar una reinhibición de entre el 40% y el 25% de la corriente, con una subestimación consecuentemente proporcional de la inhibición VD.

3.1.2.1. *Sustrato Bioquímico de la Inhibición Independiente de Voltaje de CCDV_N*

Al igual que la inhibición VD, la inhibición VI inducida por NT es mediada por activación de PG (Carbone et al., 1998). Si en el primer caso la expresión de la modulación es debida a una interacción directa PG-CCDV_N, ¿De qué manera se establecen los efectos VI? La respuesta es directa: aún no se conoce el(los) mecanismo(s) responsable(s) de generar dicho patrón inhibitorio en CCDV_N.

En 1986, el grupo de K. Dunlap publica la observación de una depresión de corrientes de Ca²⁺ en DRGs embrionarias de pollo tras breves exposiciones a estimuladores de la PKC (ver 3.1.1.1; Rane y Dunlap, 1986). La reducción observada fue rápida, completamente reversible, y no estaba acompañada por cambios evidentes en la dependencia de voltaje de la activación o en la cinética de la corriente. Estas características prácticamente reproducían a la perfección las características de la inhibición VI (ver 3.1.2). Los resultados llevaron a los autores a sugerir que la PKC podría ocupar el lugar del vínculo desconocido entre RHH y CCDV_N (Diversé-Pierluissi y Dunlap, 1993; Diversé-Pierluissi et al., 1995, 2000).

El reporte anterior habría de generar una profunda divergencia de opiniones al respecto entre los investigadores en este campo. La participación de la PKC fue favorecida por algunas

publicaciones (p.e., Rane et al., 1989; Doerner et al., 1988). En otros estudios no se observaron los efectos reportados ni con ésteres de forbol ni con diacilgliceroles sintéticos, así como tampoco pudo bloquearse por inhibidores de la PKC la modulación inducida por PG (Dolphin et al., 1989; McFadzean et al., 1989; Wanke et al., 1987). Aún más, una complicación adicional que subsiste es que los ésteres de forbol y los análogos del diacilglicerol pueden ejercer efectos inhibitorios no específicos e independientes de la activación de la PKC sobre $CCDV_N$ (Hockberger et al., 1989; Doerner et al., 1990; Abrahams y Schofield, 1992). Así, en el mejor de los casos, si el fenómeno observado por el grupo de Dunlap fuese genuino, representaría un fenómeno específico de la preparación analizada (Ikeda y Dunlap, 1999).

Durante la primer mitad de la década pasada, el grupo de B. Hille dedicó una gran cantidad de investigaciones para tratar de identificar la vía de transducción de señales responsable de inducir la inhibición VI de corrientes de $CCDV_N$ en neuronas simpáticas (Beech et al., 1991, 1992; Bernheim et al., 1991; Mathie, 1992; Shapiro y Hille, 1993; Shapiro et al., 1994a,b; Wollmuth et al., 1995). Si bien el monumental trabajo realizado por este grupo habría de fracasar en su objetivo primario, el conjunto de los resultados que presentaron planteó un escenario de vías inhibitorias, convergentes en $CCDV_N$, enormemente complejo (revisado en Hille, 1994). En particular, estas investigaciones mostraron que la producción de un patrón inhibitorio VI no involucra a una única vía de señalización intracelular, sino que puede ser dividido, a su vez, en dos procesos moduladores independientes (Beech et al., 1992).

La separación anterior se basa en los siguientes criterios: (1) RHH involucrado; (2) Velocidad de establecimiento de los efectos; (3) Sensibilidad a quelantes intracelulares de Ca^{2+} ; (4) Dependencia de segundos mensajeros (Hille, 1994). En estos términos, el grupo de B. Hille utilizó la nomenclatura de *slow* (por *slow messenger and not [voltage-dependent]*; Beech et al., 1992) para identificar una vía inhibitoria de establecimiento lento (> 4 s; Bernheim et al., 1991), acoplada a la activación de algunos receptores muscarínicos (M_1 ; Bernheim et al., 1992) y de angiotensina (AngioII; Shapiro et al., 1994a), que utiliza algún segundo mensajero (aún desconocido) capaz de difundir hacia un sello *on-cell* (Bernheim et al., 1991), y que, aunque no desencadena una elevación de $[Ca^{2+}]_i$, es parcialmente sensible a concentraciones intracelulares elevadas de quelantes de este catión (Beech et al., 1991). La vía restante, a la que bautizaron con el nombre de *fast* (por "*fast and not [voltage-dependent]*"; Bernheim et al., 1991), establece sus efectos rápidamente (< 1 s; Bernheim et al., 1991) tras la activación de ciertos RHH por NE

(Beech et al., 1992), por sustancia P (Shapiro y Hille, 1993) o por polipéptido pancreático (Wollmuth et al., 1995), es delimitada a membrana, e insensible a quelantes de Ca^{2+} .

Es innecesario agregar que, así como no se ha podido establecer la naturaleza bioquímica exacta de ambas vías modulatorias, tampoco se conoce el mecanismo preciso por el cual se desencadena un patrón inhibitorio VI. En registros de la corriente de CCDV_N individuales, una actividad inhibitoria VI ha sido correlacionada con un pronunciado aumento en registros con actividad nula durante un pulso de voltaje en presencia de NT (Mathie et al., 1992; Carabelli et al., 1996).

En la única hipótesis formal que existe para explicar este fenómeno, K. S. Elmslie y S. W. Jones (1997), lejos de asumir que alguna modificación covalente desconocida pudiera secuestrar a los canales en un supuesto estado inactivo, no-conductor (Mathie et al., 1992; Luebke y Dunlap, 1994; Carabelli et al., 1996), plantearon que aquella parte de la inhibición VI que corresponde a la vía *fan* podría tener su origen en un mecanismo idéntico al planteado para explicar la inhibición VD (ver 3.1.1.1): la interacción directa de PG activas (las subunidades $\text{G}\beta\gamma$) con los CCDV_N .

¿De qué manera sería esto posible? En la versión de estos autores del modelo *willing-reluctant* (versión que es la que permanece vigente hasta nuestros días; ver 3.1.1.2), la facilitación de corrientes durante un *prepulso* es explicada en términos de una vía de equilibración $\text{O}_R \leftrightarrow \text{O}_W$. Esta reacción en equilibrio implica que la interconversión entre ambos modos de apertura es incompleta. Por lo tanto, está implícito en el modelo que, incluso tras despolarizaciones máximas, una porción de los canales regresarán al estado cerrado a través de una vía $\text{O}_R \rightarrow \text{C}_R$. Esto es, el modelo *willing-reluctant* contempla y explica que la reversión de la inhibición por *prepulsos* sea parcial. Justamente, ésta es una de las características distintivas de una reducción “VI” de la amplitud de la corriente durante el pulso de prueba subsiguiente (ver 3.1.2), y es remarcable que, frecuentemente, en registros de actividad unitaria, los *prepulsos* no reviertan la disminución en la probabilidad de apertura que induce la presencia de un NT en la pipeta de registro (Carabelli et al., 1996; Lec y Elmslie, 2000).

En el modelo de K. S. Elmslie y S. W. Jones, el modo de apertura *reluctant* está bioquímicamente caracterizado por una interacción alostérica entre PG y CCDV_N . En estos términos, los estados abierto y cerrado son distinguidos por diferencias en la afinidad con la que

se establece dicha interacción (ver 3.1.1.2). Si se llegara a demostrar que los CCDV_N pueden interactuar con distintos grados de afinidad con las subunidades $G\beta\gamma$, y que la interacción de baja afinidad no es seguida, necesariamente, de una disociación de ambos, el modelo *willing-reluctant* pasaría de ser un esquema interpretativo de la inhibición VD, a ser un marco conceptual general de “inhibición delimitada a la membrana” de CCDV_N por PG.

3.1.3. ¿Qué Determina la Especificidad de los Efectos de una Vía Inhibitoria de CCDV_N ?

“Convergence of many transmitter inputs onto a single effector pathway... raises a dilemma.

Is the specificity implied by the great diversity of transmitter molecules

lost by translating them all

into common intracellular actions?”

B. Hille, 1992b

La extraordinaria similitud de efectos inducidos por distintas vías de inhibición - farmacológicamente discriminables en términos del RHH involucrado y por la sensibilidad a toxinas de la subunidad $G\alpha$ activada en cada caso (ver 3.1.1.1) - fue la que llevó a proponer que debía existir un intermediario común entre distintas $G\alpha$ y los CCDV_N . Esta hipótesis, a su vez, llevó a la demostración de que la subunidad $G\beta\gamma$ pudiera servir como modulador alostérico directo de los CCDV_N . Este planteamiento aporta una solución al problema de “inespecificidad” de efectos entre la activación de distintos RHH.

Sin embargo, distintos NT no sólo son capaces de inducir efectos idénticos sobre el comportamiento de los CCDV_N : sus patrones inhibitorios pueden ser también notoriamente disímiles. Más aún, un solo NT puede inducir la activación de más de una vía de regulación, induciendo en consecuencia un patrón inhibitorio “mixto” (ver 3.1.2). Entonces, ¿En qué términos se preserva o se pierde la especificidad de los efectos de NT distintos?

En otras palabras, la pregunta anterior, aún no resuelta, representa el recíproco del planteamiento originalmente propuesto para explicar la inespecificidad de efectos inhibitorios. La inducción de inhibiciones VD y/o VI tras la activación de cualquier RHH investigado hasta el momento depende de la activación de PG, a juzgar por el hecho de que, ambos patrones inhibitorios son bloqueados por diálisis intracelular con $\text{GDP}\beta\text{S}$ (ver 3.1.1.1; Carbone et al.,

1998). Si la activación de todas las PG involucradas en las distintas inhibiciones va seguida de la liberación de subunidades $G\beta\gamma$ (ver Apéndice III.2), entonces, ¿Porqué no se registra un patrón inhibitorio VD en todos los casos?

La única hipótesis formal para explicar la existencia de efectos mixtos VD y VI en la inhibición causada por algunos NT sostiene que ambos efectos pueden ser mediados por subunidades $G\beta\gamma$ al interactuar con diferentes afinidades con la subunidad α_1 de los $CCDV_N$ (ver 3.1.2.1). Sin embargo, esta propuesta tampoco resuelve por completo el problema: ¿De qué depende entonces que la relación VD/VI presente gran variabilidad entre la activación de RHH distintos en una misma célula, y gran conservación tras la activación de un RHH entre distintas neuronas de una preparación?

Una, de las muchas hipótesis que podrían plantearse para abordar las preguntas planteadas en los párrafos anteriores, es la que ha dado origen al trabajo experimental cuyos resultados se expondrán en una sección siguiente de esta tesis. El problema particular abordado será descrito en detalle en el Planteamiento del Problema. Baste, por ahora, con hacer un pequeño esbozo de éste. Se conocen cinco subtipos clonados de subunidades $G\beta$. Dos subtipos de subunidades $G\beta$ ($G\beta_1$ y $G\beta_2$) han probado ser igualmente efectivas en combinación con diferentes subtipos de $G\gamma$ ($G\gamma_2$, $G\gamma_3$ y $G\gamma_7$; Ikeda, 1996; Herlitze et al., 1996) y de hecho han probado tener capacidad inhibitoria cuando han sido sobreexpresados aisladamente (Herlitze et al., 1996). Sin embargo, ¿Qué hay de los demás subtipos $G\beta$?, ¿Son todos igualmente capaces de inducir una inhibición VD?, ¿Se encontrarán algunos subtipos preferentemente acoplados a la inducción de una inhibición VI?

El abordaje de estas últimas preguntas ha de aguardar todavía un poco. Como se ha descrito en la Introducción, la regulación negativa de $CCDV_N$ no es la única forma de modulación posible de éstos canales. Aunque, *“Mucho menos es lo que se conoce respecto de la manera en que los canales de Ca^{2+} activados por voltaje neuronales podrían ser estimulados por neurotransmisores y vías de señalización intracelular que acerca de la manera en la que son inhibidos”* (Yang y Tsien, 1993), existen reportes de efectos estimuladores de algunos NT sobre $CCDV_N$ en ciertas preparaciones neuronales (Bley y Tsien, 1990; Elmslie, 1992; Mironov y Lux, 1992; Surmeier et al., 1995; Frank et al., 1996), y en sistemas de expresión (Kasai, 1991; Morikawa et al., 1999). Sin embargo, como se hizo notar en la

Introducción, existe gran confusión respecto de si dichos efectos reflejan alteraciones cinéticas de los canales (Yang y Tsien, 1993) o si se reducen a la remoción de una forma de inhibición tónicamente presente en condiciones basales en algunas neuronas (Swartz, 1993).

3.2. MODULACIÓN POSITIVA DE $CCDV_N$

Los experimentos dedicados a la búsqueda de segundos mensajeros involucrados en la inhibición de $CCDV_N$ (ver 3.1.1.1 y 3.1.2.1) aportarían un fruto inesperado. En los intentos por tratar de descartar la función reguladora de la PKC, Lester y Jahr (1990) observaron que en algunas neuronas que habían sido expuestas a un éster de forbol (PDBu) por 1 a 2 min, el quisqualato - un agonista glutamatérgico que inhibe las corrientes de Ca^{2+} en neuronas hipocampales - no deprimía las corrientes hasta que un período de tiempo se había dejado pasar. Los autores describieron al fenómeno como inhibición a corto plazo de la depresión por NT, vinculándolo con un posible mecanismo de retroalimentación negativo por PKC sobre los receptores, y no le prestaron mayor atención. Sin embargo, tres años más tarde, K. S. Swartz y col. (Swartz et al., 1993) retoman y expanden esta observación: la activación de la PKC no sólo interfiere sistemáticamente con la inhibición inducida por NT, sino que, además, lleva a un pronunciado incremento en la amplitud de corrientes de $CCDV_N$. La confirmación de ambas observaciones por una serie de reportes subsecuentes habría de cambiar drásticamente la manera de concebir el papel de la PKC en el complejo escenario de modulación de los $CCDV_N$: esta cinasa no sólo no participa en la inhibición de $CCDV_N$, sino que “inhibe la inhibición” y estimula las corrientes a través de ellos (Ilustr. 11).

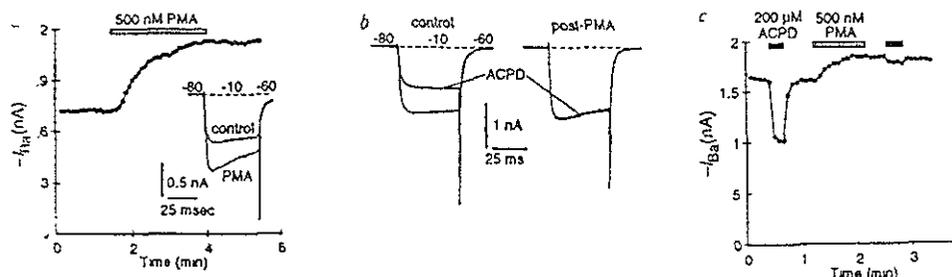
3.2.1. Convergencia e Interferencia entre Vías Moduladoras de $CCDV_N$

La observación de que los activadores de la PKC en neuronas hipocampales desorganizan la inhibición dependiente de PG inducida por activación de RHH glutamatérgicos (Ilustr. 11; Swartz et al., 1993) constituyó el primer planteamiento formal de que la inhibición por NT de $CCDV_N$ neuronales puede ser a su vez modulada, y de que esta “modulación de la modulación” (Bean, 2000) involucra la estimulación de la PKC (Swartz, 1993; Swartz et al., 1993). Investigaciones subsecuentes utilizando neuronas simpáticas de rata mostraron que la PKC interfiere con múltiples vías de inhibición delimitadas a membrana (en las que están involucradas al menos tres diferentes tipos de PG; Golard et al., 1993; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994;

Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca^{2+} channels and synaptic transmission

NATURE · VOL 361 14 JANUARY 1993

Kenton J. Swartz*, Andrew Merritt†, Bruce P. Bean* & David M. Lovinger†



Ilustr. 11 Estimulación de corrientes de CCDV_N y prevención de la inhibición inducida por neurotransmisores tras la activación directa de la PKC. **A** Curso temporal del establecimiento de los efectos de un activador de la PKC sobre las corrientes totales de CCDV_N de una neurona central en cultivo proveniente de la región CA3 del hipocampo de rata. Los números que se encuentran en la parte superior de los trazos en **a** y **b** representan los valores del voltaje del protocolo empleado para evocar la corriente. **b**, trazos de corriente superpuestos registrados antes y durante la aplicación de un agonista glutamatérgico (ACPD). **c**, curso temporal de los efectos del ACPD antes y después de la perfusión con PMA.

Shapiro et al., 1996), pero no otra vía que utiliza un mensajero citoplasmático (Shapiro et al., 1996), y que puede remover la inhibición tónicamente inducida por $\text{GTP}\gamma\text{S}$, siempre y cuando se utilicen protocolos de registro que incluyan *prepulsos* sumamente largos y despolarizantes (Swartz, 1993).

El descubrimiento de que existen secuencias consenso para fosforilación por PKC en la estructura primaria de ciertas subunidades α_1 (Dubel et al., 1992; Williams et al., 1992), y que, de hecho, esta subunidad sea fosforilada *in vitro* por la PKC (Ahlijanian et al., 1991), llevó rápidamente a proponer que un fenómeno similar pudiera estar ocurriendo *in vivo* (Yang y Tsien, 1993). En particular, la subunidad α_1 de los CCDV_N (α_{1B}) contiene varios sitios potenciales de fosforilación por PKC (Williams et al., 1992; Zamponi et al., 1997) y es fosforilada *in vitro* por dicha enzima (Ahlijanian et al., 1991; Hell et al., 1994; Zamponi et al., 1997).

El sustrato molecular que media tanto los efectos sobre la amplitud de la corriente, como aquéllos sobre la modulación por PG reportados parece estar localizado en el *loop I-II* de la subunidad α_{1B} (Ilustr. 12; Stea et al., 1995; Zamponi et al., 1997; Hamid et al., 1999). Justamente, esta misma región es uno de los sitios críticos de dicha subunidad para la unión de $\text{G}\beta\gamma$, visto

como el sustrato molecular de la inhibición VD (Ilustr. 12; Zhang et al., 1996a; De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997; Furukawa et al., 1998a,b; Dolphin et al., 1999): péptidos derivados de la secuencia del *loop I-II* son capaces de revertir la inhibición VD inducida por subunidades $G\beta\gamma$ en canales reconstituidos (ver 3.1.1.1; Zamponi et al., 1997; Furukawa et al., 1998b). Uno de los péptidos es sustrato de fosforilación *in vitro* por PKC y, cuando dicha fosforilación es llevada a cabo antes del experimento anterior, pierde su habilidad de interferir con la modulación por PG (Zamponi et al., 1997). Más aún, la sustitución dirigida de un solo residuo de aminoácido en esta región (Thr422; Ilustr. 12) con un residuo de glutamato, para crear una forma “permanentemente fosforilada”, genera corrientes resistentes tanto al incremento en amplitud resultado de la activación de la PKC, como a la inhibición inducida por PG (Hamid et al., 1999).

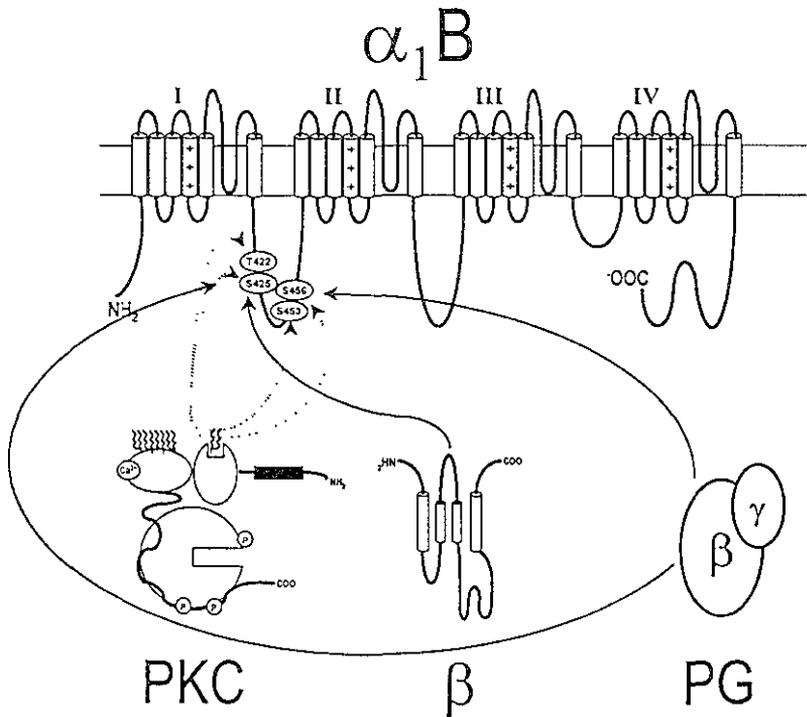
Los resultados mencionados llevaron al establecimiento de la idea que sostiene que una región del *loop I-II* constituye un “centro de integración para la interferencia entre modulaciones inducidas por PKC y por PG de CCDV tipo N” (Ilustr. 12; Dunlap, 1997; Hamid et al., 1999). Este concepto parece aportar explicación suficiente al fenómeno de prevención de la inhibición originalmente reportado por Swartz y cols. (1993).

Algunos hechos, aún más notables, aguardan explicación. El *loop I-II* es sólo parcialmente responsable de la inhibición inducida por PG (Ilustr. 4), ¿Se debe por ello que la reducción en inhibición subsecuente también sea parcial? De hecho, ¿Se reduce parcial y homogéneamente la inhibición? O, como es sugerido por el grupo de B. Hille (Shapiro et al., 1996) ¿Existe selectividad en la prevención sobre distintas vías inhibitorias que convergen en estos canales? Estos tres últimos cuestionamientos, serán abordados en la Discusión tras analizar algunas de las observaciones experimentales que se expondrán más adelante.

3.2.2. Incremento en la Amplitud de Corrientes de CCDV_N Inducido por PKC.

¿Regulación Positiva o Des-Inhibición Tónica?

El aumento en las corrientes de CCDV_N por PKC que observaron K. Swartz y cols. (1993; Ilustr. 11) no era un fenómeno novedoso entre los CCDV neuronales: había sido inicialmente observado en neuronas de *Aplysia* (DeRiemer et al., 1985; Strong et al., 1987) y de sapo (Bley y Tsien, 1990; Yang y Tsien, 1993), y se había reportado que su estimulación aumentaba las corrientes de CCDV en ovocitos de *Xenopus* inyectados con mRNA derivado de cerebro de rata



Ilustr. 12 Convergencia de vías moduladoras en el loop I-II de la subunidad α_1 de $CCDV_N$. Se encuentran marcados los residuos de serina (S) y treonina (T) del loop I-II que son sujeto de fosforilación *in vitro* por PKC. Nótese que estos aminoácidos se encuentran contenidos dentro de algunas de las regiones postuladas de interacción entre las subunidades α_1 y β de los $CCDV_N$ y $\beta\gamma$ de las PG.

(Leonard et al., 1987; Sigel y Baur, 1988). Aquello que sí habría de resultar novedoso sería la propuesta planteada por K. Swartz (1993), en un trabajo inmediatamente posterior, para explicar el fenómeno: “La estimulación de la PKC con ésteres de forbol aumentó consistentemente las corrientes de canales de calcio basales y desorganizó su inhibición por un número de diferentes agonistas a receptores de transmisores... La PKC también desorganizó la inhibición mediada por proteínas G ya sea cuando fue inducida por $GTP\gamma S$ o cuando se encontraba presente tónicamente. Al desorganizar la inhibición mediada por proteínas G de los canales de calcio, la estimulación de la PKC puede tanto aumentar las corrientes de canales de calcio como disminuir la inhibición posterior por neurotransmisores”. De hecho, se ha reportado que, el aumento en la corriente de $CCDV_N$ por PKC es dependiente de voltaje, y las corrientes aumentadas muestran cinéticas alteradas de manera *grosso modo* consistente con cambios esperados por remoción de inhibición tónica por PG, como es la eliminación de la facilitación basal por *prepulsos* (Swartz, 1993).

Llevada al extremo por el grupo de A. Rittenhouse (Barrett y Rittenhouse, 2000), esta postura implicaría que “*la PKC no tiene otro efecto sobre el comportamiento de los CCDV más que el de prevenir la inhibición mediada por PG*” (*sic*). La hipótesis es atractiva por la sencillez de su lógica: una sola causa podría explicar dos efectos. Sin embargo, no constituye una explicación suficiente para una serie de resultados presentados por otros grupos.

Dos observaciones llevaron al grupo de R. W. Tsien (Yang y Tsien, 1993) a sugerir que la estimulación de $CCDV_N$ por PKC en neuronas simpáticas de rana no respondía a ese mecanismo. En primer lugar, la magnitud del aumento en las corrientes por PKC (35%) era siempre mayor que la cantidad de inhibición tónica que podía ser liberada por un *prepulso* despolarizante (~10 a 15%). En segundo lugar, encontraron que la magnitud del incremento es independiente de la magnitud de la inhibición tónica por PG. En concordancia con esto, encontraron que el aumento de la corriente fue similar cuando la inhibición tónica fue removida al desactivar las PG con GDP β S o aumentada con GTP γ S.

Estas observaciones son congruentes con aquéllas realizadas en sistemas de expresión, donde repetidamente se ha reportado la independencia y aditividad de ambos fenómenos (Stea et al., 1995; Zamponi et al., 1997; Hamid et al., 1999). Arriba se mencionó que la Thr422 parece ser el sitio de fosforilación por PKC en el que se lleva a cabo la convergencia de vías inhibitorias en $CCDV_N$. Un residuo extremadamente cercano (Ser425) es también sitio de fosforilación (Ilustr. 12) y, cuando es sustituido por un residuo de glutamato, la forma “permanente fosforilada” así obtenida es resistente a modulación por PKC pero sigue siendo sujeto de regulación por PG (Hamid et al., 1999). Esto quiere decir que la fosforilación de este residuo podría impedir la fosforilación del residuo cercano y que, aunque esto desencadenaría un aumento de corriente, la corriente sería aún modulable por PG. De hecho, es esperable que la fosforilación por PKC no prevenga toda la inhibición por PG ya que otras regiones de interacción entre las subunidades $G\beta\gamma$ y α_{1B} (la regiones *N*- y *C*-terminales) no contienen sitios de fosforilación por PKC (Ilustr. 12).

Por otra parte, hay otras evidencias de que la PKC pudiese tener efectos no relacionados con la remoción de inhibición tónica: la modulación de la corriente inducida por PKC involucra, en algunos casos, alteraciones tanto en la cinética de activación de las corrientes de $CCDV_N$ (Abrahams y Schofield, 1992; Stea et al., 1995) y, sobre todo, en la cinética de inactivación de las

mismas (Ilustr. 11A; Plummer et al., 1991; Abrahams y Schofield, 1992; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Stea et al., 1995).

Entonces, en contraste con la hipótesis de remoción de inhibición tónica, los datos referidos en los últimos tres párrafos indicarían que la PKC ejerce una acción de regulación positiva directa sobre las corrientes de $CCDV_N$. ¿Cuál sería entonces el mecanismo responsable del aumento en la amplitud de la corriente? En neuronas de invertebrados, el fenómeno parece estar relacionado con el reclutamiento de canales de gran conductancia previamente silentes (Strong et al., 1987). No hay evidencias de que en neuronas de vertebrados opere un mecanismo similar. En el trabajo de Yang y Tsien (1993), el aumento en las corrientes de $CCDV_N$ se encontró asociado con un fuerte incremento en la probabilidad de apertura de los canales, que se origina principalmente de un agudo decremento en los intervalos cerrados entre aperturas sucesivas. Encontraron muy pocos efectos en la corriente unitaria o en el tiempo de apertura promedio. El mecanismo que subyace a incremento en la p_o permanece desconocido.

Es evidente que el conocimiento relativo a la modulación positiva de $CCDV_N$ es muy limitado en comparación con aquél que se tiene respecto de la modulación negativa. En particular, hay dos preguntas medulares que aún no han sido respondidas, y cuyas respuestas son cruciales para el desarrollo de esta área.

En primer lugar se encuentra la disyuntiva planteada por las dos hipótesis posibles para explicar el aumento en corrientes por PKC: (1) Remueve la inhibición tónica y previene la inhibición subsecuente, sin tener efectos adicionales sobre la misma (Swartz, 1993); (2) Tiene efectos independientes (Yang y Tsien, 1993). En el primer caso, la modulación positiva de $CCDV_N$ se reduciría a un mecanismo de desinhibición tónica. En el segundo, constituye una verdadera vía de regulación antagónica y convergente. En breve, la existencia misma de la modulación positiva de $CCDV_N$ ha sido fuertemente cuestionada (Barrett y Rittenhouse, 2000)

En segundo lugar, *“Una pregunta aún más fundamental que no ha sido respondida es cómo y cuándo la proteína cinasa C es activada en células o en sinápsis particulares durante el funcionamiento normal del sistema nervioso.”* (Bean, 2000). En particular, los efectos que se han observado en el comportamiento de $CCDV_N$ tras la aplicación de estimuladores directos de la PKC, no han podido ser reproducidos por ninguno de los NT probados hasta el momento y cuya vía de transducción de señales

intracelular ha sido probada que está acoplada a la estimulación de esta cinasa en varias preparaciones (p.e., RHH colinérgicos y glutamatérgicos; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Bean, 2000). Finalmente, existe un sólo reporte (prácticamente no-citado) de la activación de la PKC – asociada a un incremento en corrientes de $CCDV_N$ – tras la diálisis intracelular con un activador directo de las PG (Zong y Lux, 1994).

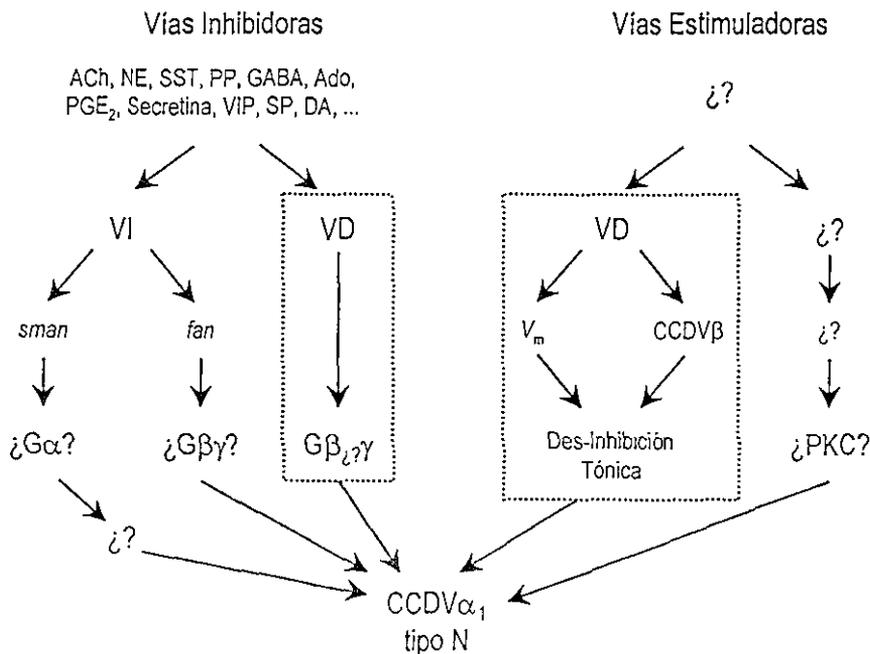
En la tesis que a continuación se presenta se discutirán algunas evidencias experimentales que sugieren fuertemente que la PKC podría ser activada simultáneamente con la activación de vías inhibitoras de $CCDV_N$ delimitadas a membrana, y que sus efectos pueden no haber sido evidentes por encontrarse “enmascarados” por los efectos inhibitorios normalmente registrados. En la siguiente sección se expondrá de dónde surge el interés por estudiar esta vía de estimulación de la corriente, habiendo comenzado, como ya ha sido expuesto (ver 3.1.3), en la búsqueda de una solución a uno de los problemas ligados a la selectividad de efectos entre las múltiples vías inhibitoras. El modelo experimental empleado en todos los casos (neuronas simpáticas del SCG de rata), ha constituido, históricamente, uno de los modelos *par excellence* en el estudio de la modulación de $CCDV_N$ *in situ* (Hille, 1994).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

"As for many other aspects of ion channel function, our increasing understanding of complex molecular mechanisms has surpassed our knowledge of how those mechanisms are actually used."

B. P. Bean, 2000

El diagrama siguiente resume el estado actual del conocimiento pertinente a las distintas vías de modulación que convergen en CCDV_N en neuronas simpáticas, en el marco interpretativo de regulación bidireccional planteado en la Introducción.



Ilustr. 13 Vías de señalización intracelular que convergen en la subunidad α_1 de los CCDV_N en neuronas simpáticas. Las líneas punteadas remarcán las vías más estudiadas la inhibición VD y su postulada contraparte fisiológica. Abreviaturas: ACh, acetilcolina; SST, somatostatina; PP, polipéptido pancreático; GABA, ácido gamma amino butírico; Ado, adenosina; PGE₂, prostaglandina E₂; VIP, péptido intestinal vasoactivo; SP, sustancia P, DA, dopamina; V_m, potencial de membrana

Se mostrará a continuación en qué contexto nace el interés por conformar un escenario de este tipo. En la Ilustr. 13 se encuentra implícito lo siguiente: el grado de especificidad que guarde un NT con un patrón inhibitorio particular está determinado por el grado relativo de acoplamiento selectivo con un número limitado de vías inhibitorias. Anteriormente se expuso que la reducción en la actividad de $CCDV_N$ podía ir acompañada de alteraciones en la dependencia de voltaje y en el curso temporal del desarrollo de la corriente (inhibición VD), o manifestarse como una reducción porcentual neta que no involucra estos cambios (inhibición VI). A su vez, dos patrones inhibitorios VI pueden distinguirse en términos de la velocidad de establecimiento de sus efectos (rápidos y lentos) y de la ruta intracelular que sigue la vía de señalización intracelular (delimitada a la membrana o a través de segundos mensajeros solubles, vías *fan* y *smn*, respectivamente).

En consecuencia, las características propias de patrones inhibitorios inducidos tras la activación de distintos RHH pueden ser similares o distintas entre sí dependiendo de la proporción relativa con la que estimulen una o más de estas tres vías moduladoras. De esta manera, la especificidad de una vía $RHH \rightarrow CCDV_N$ puede establecerse a dos niveles:

(1) $RHH \rightarrow$ Intermediario

(2) Intermediario $\rightarrow CCDV_N$

Todos los NT que se presentan en la Ilustr. 13 actúan sobre RHH acoplados a PG. Por lo tanto, estas últimas son el intermediario necesario mínimo en todos los casos.

Tomemos un ejemplo de la literatura para ilustrar el problema que se desea plantear. En el conjunto de NT que estudió el grupo de B. Hille en la primera mitad de los años 90's, pueden identificarse dos casos que parecen ocupar posiciones extremas en términos de la especificidad de efectos que inducen sobre las corrientes de $CCDV_N$ en neuronas simpáticas. La NE induce un patrón de inhibición que involucra vías VD y *fan*, en el que $VD > fan$. Por su parte, la activación de RHH muscarínicos induce un patrón mixto compuesto de tanto VD como *fan* y *smn*, pero en el que $smn > fan \gg \gg VD$ (Beech et al., 1992). Parte de la divergencia en las particularidades de las acciones de ambos NT puede explicarse en términos del nivel (1) planteado: se ha demostrado que los distintos RHH involucrados están acoplados a distintos tipos de PG. La selectividad de esta interacción está determinada por el subtipo de subunidad $G\alpha$ implicada, con

una contribución menor de la subunidad $G\gamma$. Por lo tanto, podría sostenerse que la activación selectiva de la vía *smm* por agonistas muscarínicos responde a la estimulación de un subtipo particular de $G\alpha$ (Hille, 1994).

Sin embargo, este último razonamiento no explica las demás diferencias entre los patrones inhibitorios inducidos por RHH adrenérgicos y muscarínicos. Los efectos de la vía VD se establecen en el nivel (2) planteado, en particular, en la interacción $G\beta \rightarrow \text{CCDV}_N$ (Ford et al., 1998). Si la activación de cualesquiera de los subtipos de $G\alpha$ es seguida de la liberación de subunidades $G\beta\gamma$, entonces, ¿De qué depende que la inhibición VD se active en distinta proporción en los dos casos expuestos?

Es hipótesis de este trabajo que distintos subtipos de subunidades $G\beta$ difieren en términos de la capacidad que tiene cada uno de ellos para inducir una inhibición VD y/o *fan*. Existen experimentos que hacen pensar que esto es posible. En términos de potencia moduladora relativa, el siguiente diagrama presenta un resumen de los hallazgos realizados en la investigación de la especificidad con la que otros efectores son regulados por dos o más de los cinco subtipos de subunidades $G\beta$ que han sido identificados y clonados hasta el momento.

Especificidad	Efactor	Referencia
$\beta_1 > \beta_2 > \beta_3 = \beta_5 > \beta_4$	AC II	Bayewitch et al., 1998
$\beta_1 = \beta_5$	AC I	
$\beta_1 > \beta_5$	Cinasa MAP	Zhang et al, 1996b
$\beta_1 = \beta_5$	PLC β_2	
$\beta_1 = \beta_2 \neq \beta_3$	GRK2	Daaka et al., 1997
$\beta_1 = \beta_2 = \beta_3$	GRK3	
$\beta_1 = \beta_2 > \beta_5 > \beta_3 = \beta_4$	GIRK	Yan y Gautam, 1996

En CCDV_N , únicamente la actividad de dos de estos subtipos ha sido examinada. Tanto $G\beta_1$ como $G\beta_2$ han mostrado capacidad para inducir una inhibición altamente sensible al voltaje que se acompaña de un enlentecimiento pronunciado en la cinética de activación de la corriente

(Herlitze et al., 1996; Ikeda et al., 1996). No se ha investigado ni la participación de alguna de ellos en la vía *fan* ni papel alguno de los subtipos restantes ($G\beta_3$, $G\beta_4$ y $G\beta_5$).

Con el objetivo de poner a prueba la hipótesis mencionada se puso en marcha el proyecto de investigación en el que se gestó esta tesis. No obstante, los experimentos habrían de tomar rápidamente un rumbo que los alejaba del dominio de los fenómenos ligados a los sistemas de regulación inhibitoria de $CCDV_N$.

En el curso de los experimentos que se detallará más adelante, se dará cuenta de un fenómeno ligado a la última columna derecha del diagrama de la Ilustr. 13, esto es, enmarcado en el poco explorado terreno de la modulación estimuladora que converge, junto a la inhibitoria, en estos canales.

La pregunta abordada en este campo se basa en lo siguiente. El hecho de que los activadores de la PKC tengan efectos rápidos y específicos sobre $CCDV_N$, implica que esta enzima se encuentra disponible para ser fisiológicamente activada en condiciones basales. Como ya ha sido discutido en los Antecedentes, algunos de los NT, que se mencionan como inhibidores en la Ilustr. 13, han probado capacidad para activar a la PKC en otras preparaciones. De hecho, toda la maquinaria intracelular requerida para el funcionamiento de esta vía se encuentra presente en neuronas simpáticas. Entonces, ¿A qué se debe que no haya podido encontrarse un NT que mimetice los efectos de los activadores directos de la PKC?

La búsqueda de una respuesta a la pregunta anterior, sin embargo, ha de partir del análisis de una cuestión aún más básica y no resuelta: ¿Qué tipos de efectos hay que buscar?. En términos de interferencia con las vías inhibitorias, ¿A qué se debe la variabilidad de interferencia que induce la PKC sobre distintas vías inhibitorias? ¿Son todos sus efectos reducibles a un fenómeno de des-inhibición?

Las hipótesis que orientaron los trabajos que encontraron en las preguntas precedentes su origen, sostienen que: (1) La vía de regulación mediada por activación de la PKC constituye una vía de modulación positiva que tiene efectos independientes de la presencia de inhibición sobre los canales; y (2) La interferencia con las vías inhibitorias es selectiva y no-excluyente.

Es por la concurrencia de problemas ligados tanto a los fenómenos inhibidores como a los estimuladores que se han expuesto que, el plantear un esquema de regulación bidireccional coordinada, pasó a ser el objetivo final de esta tesis.

5. HIPÓTESIS

HÉLICÓN: El razonamiento tiene coherencia.

*Pero, en términos generales,
No puede llevarse hasta sus últimas consecuencias.*

*CALÍGULA: Qué sabrás tú. Precisamente
por no llevarlo hasta sus últimas consecuencias
nunca se logra nada.*

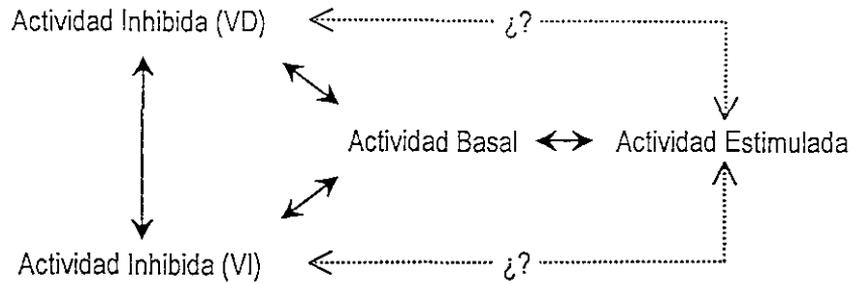
Pero quizá baste con que sea lógico hasta el final."

A. Camus

5.1. HIPÓTESIS GENERAL

Los $CCDV_N$ son sujeto de modulación bidireccional por vías de señalización intracelular en neuronas simpáticas. Si existe una vía de modulación positiva de $CCDV_N$, el modelo *willing-reluctant*, que contempla sólo dos estados posibles de los mismos, explica sólo una parte del cuadro completo de modulación de estos canales (ver Ilustr. 13). La interferencia parcial entre las vías de estimulación e inhibición de los canales indica que cada estado de modulación puede excluir el establecimiento de la modulación opuesta. Dado que la modulación negativa no puede explicarse por un único proceso homogéneo, la parcialidad de la interferencia puede reflejar una selectividad frente a distintos patrones de inhibición. En consecuencia, se asumirá que el patrón basal de respuesta al voltaje de los $CCDV_N$ puede ser tanto inhibido como estimulado, y que la inhibición comprende dos fenómenos independientes, posiblemente interrelacionados.

Bajo estas suposiciones, cuatro modos operativos de los $CCDV_N$ son esperables:



El comportamiento poblacional de los CCDV_N , en un momento particular, refleja el balance entre el grado de actividad relativa de las distintas vías moduladoras. La proporción de estos canales, en cada modo, depende del orden temporal con el que se suceda la activación de cada vía. Esto es, se supone que existe una interferencia alostérica selectiva entre las distintas vías moduladoras.

5.2. HIPÓTESIS PARTICULARES

Primera. Subtipos particulares de subunidades $G\beta$ inducen modulaciones inhibitorias distintas en los CCDV_N en neuronas simpáticas. Tal especificidad está relacionada con la potencia relativa con la que cada una induce inhibiciones VD y/o VI.

Segunda. Existe una vía de modulación positiva para estos CCDV_N , que induce un modo operativo distinto del modo operativo basal (no-modulado). Por lo tanto, los efectos que ésta induzca deben ser claramente distintos de aquéllos que resulten de la eliminación de la inhibición tónica.

Tercera. La parcialidad de la interferencia de la vía de modulación positiva frente a la modulación negativa de los CCDV_N , puede explicarse en términos de una interferencia selectiva frente a las distintas vías de modulación negativa.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVOS GENERALES

Primero. Establecer si los distintos subtipos de $G\beta$ difieren en términos de capacidad para inducir inhibiciones VD y/o VI de $CCDV_N$.

Segundo. Determinar si existe modulación positiva de $CCDV_N$ por PKC.

Tercero. Investigar el patrón de interferencia que establece la activación de la PKC sobre la inhibición inducida por activación de un RHH.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Primero. Identificar, por sobreexpresión heteróloga, los subtipos $G\beta\gamma$ capaces de inducir inhibición dependiente de voltaje de corrientes macroscópicas tipo N en neuronas del SCG de la rata.

Segundo. Caracterizar los efectos que tiene la remoción de inhibición tónica sobre las corrientes macroscópicas tipo N en condiciones basales.

Tercero. Caracterizar los efectos que tiene un estimulador probado de la PKC sobre las corrientes macroscópicas tipo N en condiciones basales.

Cuarto. Determinar en qué casos los efectos que tenga la activación de la PKC sobre $CCDV_N$ son reductibles a un fenómeno de des-inhibición.

Quinto. Estudiar el patrón inhibitorio inducido por un NT cuya transducción ocurra a través de vías delimitadas a membrana.

Sexto. Determinar qué características de la inhibición son preservadas o prevenidas tras la activación de la PKC.

7. MÉTODOS

7.1. CULTIVOS NEURONALES

*"If we tear neurons from the mother tissue,
sever or digest away their axons,
then force them to lie naked and amputated
on a hard plastic or glass surface
in a sea of alien substances,
how can we expect their behavior
to tell us anything useful about the nervous system?"*

D. Bray, 1992

La respuesta, seguramente, es que siempre que la célula en cultivo exhiba el fenómeno de interés, constituye un objeto legítimo de estudio, incluso si es atípica en otros aspectos (Bray, 1992). El fenómeno que nos interesa, la regulación de la actividad de $CCDV_N$ por sistemas de señalización intracelular, no sólo está presente en las SCGs en cultivo, sino que, tal vez, no exista otro modelo neuronal en los vertebrados en el que haya sido más estudiado y caracterizado (Hille, 1994).

Las neuronas simpáticas tienen un lugar privilegiado entre las preparaciones neuronales provenientes de vertebrados: no sólo proveen de una de las preparaciones más homogéneas en términos morfológicos (Wakshull et al., 1979; Banker y Goslin, 1992; Higgins et al., 1992), bioquímicos (Hawrot y Patterson, 1979; Higgins et al., 1992) y electrofisiológicos (Perri et al., 1970; Schofield e Ikeda, 1988; Higgins et al., 1992), sino que, además, son de muy fácil acceso, tan pronto el investigador se familiariza con la práctica del cultivo.

Los ganglios simpáticos, y muy especialmente el ganglio cervical superior, son entidades anatómicas discretas, bien definidas, de un tamaño razonable, que pueden ser disecadas de manera sistemática y muy reproducible, sin dejar lugar a ambigüedades en la definición precisa de los límites del tejido, y cuyas células pueden ser disgregadas fácilmente y mantenidas durante

los límites del tejido, y cuyas células pueden ser disgregadas fácilmente y mantenidas durante largo tiempo en cultivo, reproduciendo, en éstos, buena parte de las características morfofisiológicas de los órganos que las contienen *in situ* (Gurney et al., 1986; Marrion et al., 1987; Schofield e Ikeda, 1988; Nerbonne y Gurney, 1989).

No sólo estas características hacen posible la extrapolación de los resultados obtenidos *in vitro* con aquéllos que podrían presentarse *in situ*, sino que, finalmente, la posibilidad de obtener cultivos exitosos a partir de organismos adultos y plenamente desarrollados hace posible romper con las restricciones interpretativas que se imponen en otros sistemas que dependen, en mayor o menor medida, de la utilización de tejidos de origen embrionario (Scott, 1982).

Los cultivos primarios de neuronas simpáticas disociadas han sido utilizados por casi cuatro décadas desde que Levi-Montalcini y Angeletti (1963) demostraron que, neuronas simpáticas aisladas a partir embriones de pollo por tratamiento con la enzima proteolítica tripsina, pueden sobrevivir y crecer en cultivo en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF; nerve growth factor). A principios de los años 70's, Bray (1970) y Mains y Patterson (1973) describieron las condiciones para el establecimiento de cultivos duraderos de neuronas primarias disociadas del ganglio cervical superior (SCG; superior cervical ganglion) de la rata. A partir de entonces, esta preparación se ha convertido en una de las predilectas para estudiar todo tipo de procesos neuronales: hacia principios de los años 90 existían ya más de 100 publicaciones que describían el comportamiento de neuronas simpáticas de mamíferos y especialmente del SCG de la rata en cultivo de tejidos (Higgins et al., 1992), y el número de publicaciones en estos últimos diez años casi se ha triplicado.

Desde el primer reporte del cultivo de neuronas simpáticas aisladas (Levi-Montalcini and Angeletti, 1963), los autores notaron: "*Una singular observación fue la escasez de células satélite u otros tipos celulares, lo cual contrasta con el cuadro ofrecido por los ganglios sensoriales disociados*". Por lo tanto, una de las más importantes razones de la popularidad de esta preparación es que las neuronas principales del SCG pueden ser cultivadas en aislamiento prácticamente total de otros tipos celulares (Wakshull et al., 1979), proveyendo una de las más homogéneas poblaciones neuronales disponibles en los vertebrados (Higgins et al., 1992).

El uso de neuronas adultas tiene varias ventajas principales comparado con el uso de células provenientes de tejidos embrionarios: (1) Las neuronas adultas son más grandes que las embrionarias y esto facilita enormemente la obtención de mediciones eléctricas válidas y confiables (Wakshull et al., 1979; Scott, 1982); (2) La formación y ramificación de procesos se encuentra retardada en neuronas adultas comparadas con las embrionarias (Wakshull et al., 1979; Johnson y Argiro, 1983), lo cual permite mantener por más tiempo a las neuronas en una geometría más adecuada para la fijación de voltaje; (3) La tasa de supervivencia de neuronas adultas es mayor que las embrionarias, lo cual las hace ser una muestra más representativa de la población neuronal *in situ* y por tanto hace que las mediciones eléctricas sean más representativas (Scott, 1982); (4) Las neuronas disociadas a partir de organismos fetales o neonatales pueden no tener la misma fisiología que el adulto (Wakshull et al., 1979; Scott, 1982; Kriegstein et al., 1987; Schofield e Ikeda, 1988; Fedulova et al., 1991, 1994; Viana et al., 1994).

Más aún, existen fuertes evidencias de que, las SCGs disociadas en cultivo retienen, y expresan, las características electrofisiológicas y quimiosensibles principales de esta modulación que, originalmente, fue observada en neuronas *in situ* (Galvan y Adams, 1982).

Así que, al margen de que algún día se pueda contestar con certeza cuáles son las funciones que cumplen desde los RHH hasta los CCDV_N mismos y, sobretodo, la vía de señalización completa y funcional en somas de neuronas aisladas y en cultivo, el fenómeno que nos interesa es exhibido por estas células y es, por tanto, un objeto legítimo de estudio.

Existen, además, en el estudio de las vías modulatorias, algunas razones para preferir un cultivo primario y no una expresión exógena de los componentes en una línea celular. Los CCDV son heteromultímeros y por tanto requieren del ensamblado de múltiples subunidades para expresar su actividad funcional. Más aún, el conocimiento de la composición precisa de las subunidades y la estequiometría de estos canales se encuentra aún en evolución y por lo tanto, el efecto de estas variables en la modulación es desconocido. Finalmente, algunos elementos de la señalización que pueden ser importantes para la modulación de canales iónicos neuronales, como el subtipo G_o de las PG, se encuentran a menudo ausentes en células no-neuronales comúnmente utilizadas como huéspedes de la expresión (Ikeda, 1997).

Para el registro de corrientes macroscópicas de Ca^{2+} se prefiere utilizar, generalmente, células recién aisladas o a las pocas horas de haber sido sembradas (tiempo que, entre otras cosas, sirve para que reabsorban la mayor parte de sus procesos y adquieran una geometría cuasi-esférica) a células cultivadas (Bean, 1992). Muchos descubrimientos importantes han sido realizados utilizando células en cultivo, incluyendo aquellas que forman neuritas, pero se corre el riesgo de artefactos insidiosos debidos a la pobre fijación espacial del voltaje (Bean, 1992). La medición de la cinética de las corrientes y de los potenciales de inversión son especialmente riesgosas en células en cultivo que pueden encontrarse fijadas imperfectamente (Bean, 1992).

Finalmente, el tratamiento con enzimas durante la disociación podría, potencialmente, alterar las propiedades de los CCDV. Sin embargo, al menos hasta ahora, no existen evidencias de dichas alteraciones (Bean, 1992), debido a que las neuronas aisladas del SCG parecen retener las características de las neuronas de los ganglios intactos (Galvan y Adams, 1982; Galvan y Sedlmeir, 1983; Gurney et al., 1986; Marrion et al., 1987; Schofield e Ikeda, 1988; Nerbonne y Gurney, 1989).

7.1.1. Preparación de Cultivos Primarios de Neuronas Simpáticas del SCG

*"I can't imagine how could be a neurons garden,
when we said cell culture,
these little flowers needs,
temperature, best foods , water,
better care than in a simple field of a little sympathetic neurons."*

J. E. Freschi y S. H. Hitarogoku SH, 1965

Ratas Wistar macho de 5 semanas postnatales son sacrificadas en una atmósfera saturada de cloroformo o de CO_2 . Los SCG obtenidos a partir de ratas de esta edad han alcanzado la madurez sináptica y bioquímica (Black, 1977). Inmediatamente después del paro respiratorio, la rata es decapitada y la cabeza es inmovilizada con la parte ventral hacia arriba. La disección procede a través de una serie de cortes longitudinales en la línea media que separan, sucesivamente, la piel y la musculatura del cuello hasta exponer la tráquea. Una vez localizada, ésta es retraída hacia la parte rostral. Este procedimiento permite exponer el área cervical a ambos lados de la cual son fácilmente identificables las arterias carótidas. El ganglio cervical superior se encuentra en la porción medial de la bifurcación de las carótidas, en la parte dorsal de

la carótida interna. Ambos ganglios son disecados y colocados en solución salina de Hanks libre de Ca^{2+} y magnesio (solución de Hanks modificada). Existen dos razones básicas para la elección de este tipo de solución. La primera es que, a diferencia de otras soluciones salinas (e.g. la de Earle) que utilizan un amortiguador de pH basado en bicarbonato y que requieren equilibrarse en una atmósfera con 5% de CO_2 , la solución de Hanks incluye concentraciones bajas de NaHCO_3 y PO_4 que permiten que el pH se equilibre en aire (Banker y Goslin, 1992). La segunda es que, la exclusión del Ca^{2+} y magnesio facilita enormemente la disociación ya que estos cationes divalentes son requeridos para algunos tipos de adhesiones intercelulares (Bashor, 1979; Lewin y Cheret, 1989; Banker y Goslin, 1992). De hecho, en algunas otras preparaciones, la eliminación del Ca^{2+} y magnesio, mediante el uso de una solución libre de estos o alta en quelantes (e.g. EGTA, EDTA), es suficiente como para debilitar lo suficiente las interacciones celulares como para que el tejido se disperse fácilmente utilizando una ligera agitación mecánica (Bashor, 1979). Este no es el caso en el SCG adulto: el gran número de interconexiones celulares hace necesaria la utilización de métodos adicionales.

Los ganglios tienen una cápsula de tejido conectivo bien definida que es removida mecánicamente. La eliminación de la cápsula incrementa el número de neuronas viables que se obtienen y disminuye el número de células no neuronales (especialmente fibroblastos) inicialmente presentes en el cultivo. Después de remover la cápsula, se realizan una serie de cortes transversales que fragmentan el tejido en pequeños pedazos de $\sim 1 \text{ mm}^3$. Dado que la disociación del tejido se lleva a cabo a través de una serie de incubaciones con enzimas proteolíticas, este último paso permite aumentar la superficie del ganglio accesible a las enzimas y una digestión más uniforme del mismo (Bashor, 1979).

La importancia de la utilización de métodos enzimáticos en la disociación de tejidos nerviosos adultos fue evidente después del primer cultivo exitoso conseguido por B. S. Scott en 1977 gracias a la utilización de largos tiempos de incubación con colagenasa en ganglios de la raíz dorsal de ratones adultos.

Con ligeras variaciones, el método utilizado en los experimentos realizados en esta tesis sigue una técnica desarrollada por el grupo de Hille (Beech et al., 1991; Bernheim et al., 1991). Esta metodología emplea una dispersión enzimática secuencial múltiple con proteasas con diversos

grados de especificidad: una primera incubación se hace con 20 U/ml de papaína, y dos incubaciones con 1 mg/ml de colagenasa y 10 mg/ml de dispasa.

Cada incubación se realiza por 20 min a 37°C, y la disociación final del tejido se consigue mecánicamente. Esto se obtiene haciendo pasar varias veces los fragmentos a través de una pipeta de boca fina y de bordes romos. La turbulencia provocada provee de la fuerza mecánica suficiente como para disociar el tejido. Los fragmentos de ganglio se vuelven entonces cada vez más pequeños, y el medio se vuelve turbio por la dispersión de la luz que produce la suspensión celular. Una vez que la mayor parte de los fragmentos se han separado, la digestión por proteasa es detenida por competencia con suero. La actividad enzimática es detenida por adición de medio de cultivo L-15 de Leibowitz adicionado con 10% (v/v) de suero fetal bovino. La principal razón para utilizar L-15 es que mantiene un pH de 7.6 en intercambio gaseoso con atmósfera natural y es, por tanto, más conveniente que aquellos amortiguados con solución de bicarbonatos y que requieren una atmósfera enriquecida en CO₂ (Banker y Goslin, 1992). El medio L-15 es una fórmula que contiene una concentración de aminoácidos más alta de lo normal, los cuales, *per se* contribuyen a una buena parte de su capacidad amortiguadora. Por otra parte, en lugar de glucosa como fuente primaria de carbono, el L-15 contiene galactosa, piruvato y alanina, una combinación que se ha encontrado que produce niveles mínimos de ácido láctico y que, por tanto, reduce la necesidad de una alta capacidad amortiguadora del pH (Banker y Goslin, 1992).

Las células son entonces centrifugadas (100 g durante 7 min) y resuspendidas dos veces con el mismo medio. Después de la última centrifugada, las células son resuspendidas en un volumen pequeño (~0.5 ml), y 70 µl de esta suspensión son sembrados en Cajas de Petri de 35 mm para cultivo de tejidos, previamente cubiertas con poli-L-lisina. El uso de la poli-L-lisina tiene varios propósitos. El más importante de ellos es el de proveer un sustrato adecuado para la adhesión celular puesto que las neuronas no se adhieren al plástico utilizado para cultivo de tejidos (Higgins et al., 1992; Blair et al., 1999). En segundo lugar, los polímeros de aminoácidos básicos (como los de lisina) forman una monocapa translúcida en la que es más fácil visualizar los procesos neuronales en contraposición con el gel fibroso tridimensional que forman otros sustratos como la colágena.

Dos sustratos han demostrado permitir su mantenimiento a largo plazo: colágeno I y polilisina. Existen tres razones para elegir la polilisina en vez del colágeno: (1) La naturaleza química de la polilisina está más rigurosamente definida de lo que lo es la colágena parcialmente purificada obtenida de colas de rata; (2) Las moléculas promotoras de adhesión como la laminina se adhieren más fuertemente a la polilisina que a la colágena; (3) Es más fácil visualizar los procesos neuronales en una monocapa clara de polilisina en contraposición con el algo fibroso y casi, tridimensional gel de la colágena (Yavin y Yavin, 1974; Higgins et al., 1992).

El medio que se utiliza en el sembrado es la modificación de Dulbecco del medio mínimo esencial de Eagle (D-MEM –Dulbecco's Modified Eagle Medium) con una alta concentración de glucosa. El D-MEM contiene básicamente los mismos nutrientes que el MEM (13 aminoácidos esenciales y 8 vitaminas) pero a concentraciones 2 a 4 veces superiores. Por otra parte, contiene una concentración más alta de NaHCO_3 que el MEM, por lo que está diseñado para equilibrarse a una atmósfera que contenga 10% de CO_2 (a diferencia del 5% que necesita el MEM). El medio es suplementado con 10% de suero fetal bovino para proveer de los micronutrientes y factores de crecimiento necesarios para la supervivencia celular. Se utiliza suero inactivado por calor ("*heat inactivated*"), procedimiento que destruye el complemento. Una de las principales ventajas al utilizar suero es que las neuronas pueden ser mantenidas a baja densidad (Higgins et al., 1992).

Para mantener a las neuronas centradas en el plato de cultivo (indispensable para que no haya dispersión lateral de la limitada población celular que aporta cada cultivo), un anillo de clonación de acrílico tratado con Sigmacote (Sigma) es colocado en el centro de cada plato de cultivo (de 35 mm de diámetro), sobre la base de poli-L-lisina y las neuronas son colocadas en él (Hawrot y Patterson, 1979; Deisz y Lux, 1985; Ikeda, 1997).

Los anillos de clonación son retirados al cabo de 40 min y las cajas son transferidas a un incubador a 37°C (10% CO_2). Al terminar la dispersión, las neuronas, con un soma que puede llegar a las 50 μm de diámetro y con grandes núcleos que contienen de dos a tres nucleolos, varían en apariencia, poseen algunas neuritas y se encuentran débilmente adheridas al sustrato. Sin embargo, al cabo de unas cuatro horas, la mayor parte de las neuronas han reabsorbido sus procesos, y el cuerpo celular, prácticamente esférico, se encuentra firmemente anclado a la base de la caja

7.2. REGISTRO DE LA CORRIENTE A TRAVÉS DE $CCDV_N$

"The patch-clamp technology [...] is most famous for its revelation that current across biological membranes really does flow through discrete ion channels. However, the ability to record from small, fragile cells in the whole-cell configuration may actually be its most significant contribution. Ten years ago, the number of cell types that could be accurately voltage clamped by existing methods was severely limited. Now nearly any cell, if it can be isolated or grown in cell culture, can be clamped. Electrophysiology is no longer a subdiscipline of neurobiology; That was merely an accident of the fact that some neurons are very large."

S.W. Jones, 1990

La totalidad de los resultados que se presentan en esta tesis se han derivado del estudio de corrientes macroscópicas de $CCDV_N$ obtenidos mediante la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula completa.

7.2.1. Aislamiento de la Corriente de $CCDV_N$

La posibilidad de estudiar la corriente que fluye a través de $CCDV_N$ en aislamiento depende de que se bloquee por completo la contribución a la corriente total proveniente de una variedad importante de canales iónicos activados en rangos de voltajes similares. En particular, importa eliminar las corrientes provenientes de la activación de canales de Na^+ , K^+ y una pequeña población de $CCDV$ tipo L. Para este propósito se requiere perfundir interna y externamente a la neurona bajo estudio con soluciones libres de cationes permeantes a través de otros canales y/o adicionada con bloqueadores farmacológicos de otras corrientes.

7.2.1.1. Solución Externa

Las neuronas fueron expuestas al flujo continuo (1-2 ml/min) de la siguiente solución (valores en mM excepto donde se indica) designada para aislar las corrientes que fluyen a través de $CCDV_N$.

162.5 TEA-Cl
 2.0 CaCl₂ ó BaCl₂
 10.0 HEPES
 8.0 C₆H₁₂O₆
 1.0 MgCl₂
 0.1 μM TTX
 5.0 μM nifedipina
 PH = 7.4 (TEA-OH)

La perfusión local continua de esta solución, así como recambios extremadamente veloces en la misma con variantes que incluían la adición de 10 μM de NE ó de 100 μM de Cd²⁺, es conseguida mediante la utilización de un arreglo de cuatro microcapilares de acero inoxidable (con un diámetro interno de ~ 300 μm) pegados entre sí con resina epóxica. Cada capilar es alimentado por un reservorio que localizado a unos 20 cm por encima del baño, y la elección de perfusión por cada uno de ellos se controla mediante una serie de válvulas solenoides operadas manualmente. El arreglo de microcapilares es colocado en el interior de un capilar de vidrio grueso. El diámetro de uno de los extremos de este último es reducido por calor hasta conseguir una apertura equivalente al diámetro de uno de los microcapilares de acero. Este procedimiento permite forzar la salida de cada solución por una salida común que evita el tener que desplazar el arreglo para conseguir la exposición de la neurona en estudio al flujo selectivo de cada una. El armado completo es colocado en el momento del registro cerca del fondo de la caja de cultivo a un ángulo de aproximadamente 45°. Este método consigue recambios locales de la solución en menos de un segundo.

La solución externa diseñada utiliza al TEA⁺ como catión externo principal en la totalidad de los casos. Además de ser impermeable tanto en canales de Na⁺ como de K⁺, el TEA⁺ bloquea muchos canales de K⁺ (Bean, 1992), y es tan bueno como cualquier otro catión para la formación y el mantenimiento de sellos de GΩ.

En los experimentos de las Figs. 2 a 8, se ha utilizado al Ca²⁺ como acarreador de carga. La elección de Ba²⁺, en el resto de los casos, responde a varias razones: (1) Permea tanto o más que el Ca²⁺ a través de CCDV upo N; (2) A diferencia del Ca²⁺ induce muy poca inactivación

dependiente de corriente; (3) Tanto las corrientes de *background* como las de fuga tienden a ser más pequeñas con Ba^{2+} que con Ca^{2+} .

Aunque el Ba^{2+} es menos permeante que el Ca^{2+} en canales de Na^+ (Bean, 1992), y a pesar de que la solución externa se encuentra libre de este último, un nivel adicional de bloqueo de canales por los que fluye este ión es conseguido por la adición de TTX. La corriente iónica a través de canales de Na^+ en neuronas del SCG, en contraste con aquella que se encuentra en algunas neuronas sensoriales (Ikeda y Schofield, 1987), es completamente bloqueada por dicha toxina (Belluzzi y Sacchi, 1986; Schofield e Ikeda, 1988; Ikeda, 1991).

Entre otros tipos de CCDV que pudiesen originar una potencial contaminación de los registros, existe un acuerdo prácticamente universal en que las corrientes transientes de bajo umbral, tipo T, no se encuentran presentes en neuronas simpáticas (Marrion et al., 1987; Hirning et al., 1988; Schofield e Ikeda, 1988; Jones y Marks, 1989a; Plummer et al., 1989; Ikeda, 1991). Por lo tanto, la totalidad de la corriente que fluye a través de CCDV en esta preparación lo hace a través de canales HVA. De ellos, existe enorme consenso en que la gran mayoría lo hace a través de canales tipo N: Entre el 65% (Ikeda, 1991) y el 95% (Plummer et al., 1989) de la corriente es bloqueada por ω -CgTx GVIA. El componente resistente a esta toxina está compuesto por tanto canales tipo L como por una población resistente a todas las toxinas conocidas (tipo R; Plummer et al., 1989; Ikeda, 1991). Dado que, por definición, no hay método farmacológico que permita eliminar la contribución de corrientes originadas por la activación de CCDV tipo R, esta contaminación se encuentra presente en todos los registros. Sin embargo, como se verá en los resultados, su contribución a la corriente total es mínima (no más del 15%). Por otra parte, se utilizó el clásico antagonista DHP, nifedipina como un potente bloqueador de CCDV tipo L. El bloqueo con DHP es muy robusto a potenciales de mantenimiento despolarizantes, con una K_d de 1 nM o menos. Sin embargo, a potenciales de mantenimiento negativos, el bloqueo es más débil y requiere de concentraciones de 2 a 10 μ M para bloquear las corrientes L completamente (Bean, 1992).

La solución externa con nifedipina fue preparada diariamente a partir de una solución stock 25 mM en etanol absoluta, y fue protegida de la luz en la medida de lo posible. Para la aplicación de toxina, la ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA) fue almacenada como una solución stock de

1 mM en agua destilada, y fue diluida a una concentración 10 μM en la solución de registro externa inmediatamente antes de ser usada. Fue aplicada por inyección por presión desde una pipeta de punta grande (diámetro de la punta aproximado de 3 a 5 μm) localizada a unas 20 a 50 μm de la célula en estudio.

Finalmente, el cadmio (Cd^{2+}) a concentraciones de alrededor de 100 μM bloquea, en general, las corrientes de Ca^{2+} en forma completa (Bean, 1992). Por ende, la corriente a través de CCDV_N fue definida como el componente de la corriente sensible a 100 μM Cd^{2+} en presencia de 5 μM de nifedipina. En la totalidad de los registros presentados, esta concentración de Cd^{2+} , bloqueó el 100% de la corriente entrante en estado estacionario y más del 80% de la corriente de cola tras despolarizaciones de entre +80 y +100 mV.

7.2.1.2. Solución Interna

Dos grupos de soluciones internas han sido utilizados. En los experimentos resumidos en las Figs. 2 a 8, dicha solución contenía (en mM):

- 125.0 Ácido metanosulfónico
- 20.0 TEA-Cl
- 10.0 HEPES
- 0.1 Tetracesiouro de BAPTA
- 4.0 MgCl_2
- 5.0 Na_2ATP
- 0.3 Na_2GTP
- 0.1 Leupeptina
- PH = 7.2 (CsOH)

En el resto de los experimentos, la siguiente solución interna fue empleada (en mM):

140.0 CsCl
 10.0 HEPES
 11.0 EGTA
 1.0 CaCl₂
 5.0 MgCl₂
 4.0 Na₂ATP
 0.3 Na₂GTP
 0.1 Leupeptina
 pH = 7.4 (CsOH)

El aislamiento de las corrientes a través de CCDV depende, en gran medida, del bloqueo desde el interior de las corrientes salientes transportadas a través de canales de K⁺. Por tanto, el catión interno principal debe ser impermeante a través de ellos. En general, tanto el Cs⁺ como el TEA⁺, el Tris y la *N*-metil-D-glucamina (NMDG) funcionan bien (Bean, 1992). A pesar de que el Cs⁺ puede dejar una pequeña corriente saliente dependiente de canales de K⁺ a potenciales sumamente positivos, su uso aporta dos ventajas sobre los demás cationes: (1) Transporta bastante bien corriente saliente a través de CCDV, permitiendo la definición de un verdadero potencial de inversión y el registro de corrientes salientes a través de éstos (Bean, 1992); (2) Por su baja movilidad, las soluciones basadas en TEA, el Tris y NMDG producen resistencias en serie mayores (en cerca del 30 al 50%) que las soluciones equivalentes con Cs⁺ (Bean, 1992). Estas razones subyacen en su utilización como catión interno principal en la mayor parte de los experimentos presentados.

Finalmente, y dado el interés del estudio de la modulación inducida por PG, la adición de GTP a la solución interna es indispensable. Sin GTP, los efectos de los NT que dependen de éste desaparecen en 5 a 15 min en células pequeñas y muy dializadas (Bean, 1992). Para evitar este efecto, se ha incluido 300 µM de GTP, lo cual puede ser más alto de lo necesario (Bean, 1992). En algunos experimentos, el GTP fue reemplazado por una concentración equivalente de GTPγS ó por 2 mM de GDPβS.

Para asegurar un nivel de diálisis intracelular homogéneo, todos los registros fueron iniciados no antes de 5 min tras la ruptura de la membrana contenida en la luz de la pipeta de *patch* que determina el momento de acceso a la configuración de célula completa (*whole cell*).

7.2.1.3. ‘Rundown’ de la Corriente de CCDV

*“The blessing and curse of whole-cell recording
is that small ions (and even proteins)
can diffuse from pipet to cell (or the reverse).”*

S.W. Jones, 1990

La configuración de célula completa de la técnica de *patch-clamp* permite el control del medio intracelular, pero, a su vez, requiere que cualquier sustancia soluble requerida para la actividad eléctrica normal de la célula sea provista por el experimentador. En particular, la corriente de Ca^{2+} de células internamente profundidas es bastante lábil. A medida que la perfusión procede, la corriente de Ca^{2+} se vuelve progresivamente más pequeña y finalmente desaparece, mientras que las corrientes de Na^+ y de K^+ en la misma membrana no muestran prácticamente ningún cambio.

La tasa de desaparición de la corriente es similar entre corrientes entrantes de cationes ni divalentes, ni monovalentes. (Forscher y Oxford, 1985). La desaparición de la corriente no es reversible (Doroshenko et al., 1982) y ha sido descrita en prácticamente cada estudio de corrientes macroscópicas de CCDV en neuronas profundidas internamente o dializadas. ha sido ascrita a la depleción de un componente citoplásmico soluble necesario para la actividad de los CCDV (Fenwick et al., 1982; Kostyuk et al., 1981; Forscher y Oxford, 1985). Esta hipótesis se apoya en la dependencia de la tasa de lavado de la tasa de perfusión (determinada por el tamaño de la apertura del electrodo de succión). La molécula intracelular requerida por la corriente de Ca^{2+} debe ser larga o parece difundir lentamente porque es generalmente más lenta que la tasa de intercambio de K^+ intracelular por cesio (Hagiwara y Byerly, 1983).

A pesar de la existencia de algunos trabajos en los que se reportan condiciones que llevan a la eliminación del fenómeno (e incluso a su ‘reversión’; Fedulova et al., 1981; Doroshenko et al., 1982), no existe, en general, un consenso sobre cómo deshacerse de él. Sin embargo, se han identificado algunos factores que ayudan a volverlo suficientemente lento como para permitir el estudio de la corriente de Ca^{2+} en una ventana de tiempo razonable.

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y es mezclado con un tercio de volumen de 40 mg/ml de dextrán/fluoresceína (peso molecular 10,000, Molecular Probes, Eugene, OR, disuelto en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 y filtrado a través de una membrana de 0.2 μm). La solución de DNA es centrifugada a alta velocidad para remover partículas que pudieran obturar la pipeta de inyección. La solución amarilla resultante de DNA-dextrán es transferida a una pipeta de microinyección.

Las pipetas de microinyección son manufacturadas a partir de capilares de borosilicato de paredes delgadas, en un estirador convencional de micropipetas para producir pipetas de un diámetro aproximado de 0.5 μm (Ahn et al. 1998).

La estación de microinyección utilizada (que es también utilizada como set-up de patch-clamp) consiste en un microscopio invertido (Axiovert 135, Zeiss) equipado con objetivos de contraste de fase; una unidad de epifluorescencia que consiste de una lámpara de mercurio de 100 W y un filtro cúbico Nikon B2A (filtro de excitación de 450-490 nm, espejo dicróico de 510 nm, y filtro de emisión de 520 nm); un sistema automatizado de microinyección que consiste de una unidad neumática de alta precisión capaz de resolver en el orden de femtolitros (Transjector 5246; Eppendorf); un sistema de micromanipulación que posee un movimiento especializado que permite dicha inyección (5171; Eppendorf). El microscopio y el equipo asociado se encuentran montados en una mesa anti-vibratoria.

Durante la microinyección se trató de mantener constantes las siguientes variables: (1) Una presión en la pipeta igual o ligeramente superior a la presión en el núcleo (entre 100 y 200 hPa, dependiendo del tamaño de la pipeta); (2) La profundidad de la penetración de la pipeta en el núcleo (la suficiente como para crear un agujero en la membrana nuclear); (3) El tiempo de contacto entre la pipeta y la membrana nuclear (0.3 a 0.4 seg). Estos valores son determinados empíricamente después de numerosos ensayos para encontrar condiciones que produzcan un moderado hinchamiento del núcleo sin causar explosiones nucleares catastróficas. Una célula inyectada exitosamente tiene un núcleo verde brillante con algo de coloración en el citoplasma ya que la mezcla dextrán-fluoresceína puede difundir a través de los poros nucleares. Por otra parte, un hinchamiento pronunciado de la célula generalmente indica una inyección citoplasmática.

Después de un período de incubación de 8 a 14 horas, las neuronas que recibieron inyecciones intranucleares exitosas son identificadas por la fluorescencia del heterológamente expresado S65T GFP ya que ellas brillan intensamente como “pequeños soles verdes”.

Finalmente, resta decir que el rendimiento de transformación positiva que tiene esta técnica es muy bajo: en promedio, 5 a 10 de 100 células que reciben inyección se marcan con dextran-fluoresceína. De éstas, una o dos expresan la proteína a niveles detectables. Esta es la limitación de la transfección de neuronas por microinyección. Sin embargo, para registros de patch, un par de decenas de células positivas al día son más que suficientes. Evidentemente, el método no sirve para producir grandes cantidades de proteína recombinante para ensayos bioquímicos.

7.4. PREINCUBACIÓN CON PMA

“First Law of Pharmacology:

All drugs have two effects,

the one you know,

and the one you don't know.”

S.W. Jones, 1998

Se ha reportado sistemáticamente que los análogos del diacilglicerol pueden tener efectos directos sobre las corrientes de CCDV, no relacionados con la activación de la fosforilación dependiente de PKC, cuando se encuentran presentes en la solución de registro externa (Hockberger et al., 1989; Doerner et al., 1990; Abrahams y Schofield, 1992). Tomando esto en cuenta y sacando provecho de que los efectos de los ésteres de forbol no sólo se desarrollan rápidamente (<5 min), sino que también son duraderos y prácticamente irreversibles (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Shapiro et al., 1996; Chen y Penington, 1997), las neuronas fueron incubadas en una solución que contenía PMA durante 7 min a 37 °C justo antes del registro. Este procedimiento por pretratamiento nos permitió excluir el PMA y el DMSO de la solución de registro, minimizando así la posibilidad de efectos directos o no específicos (Hockberger et al., 1989).

Dos controles adicionales, respecto de la especificidad de las acciones del PMA, fueron realizados. (1) Reemplazando el PMA con 4- α -forbol; (2) Incubando las neuronas por 10 min con el inhibidor de proteínas cinasas, estaurosporina (500 nM, disuelta en DMSO) y después por 7 min adicionales tanto con 500 nM de estaurosporina como con 500 nM de PMA. Todos los

efectos del PMA reportados aquí fueron observados en la enorme mayoría de las células evaluadas (>80 %, n = 40), e incluso después de periodos relativamente largos (hasta 1 h) posteriores a la incubación. La preincubación con PMA aseguró resultados consistentes, al juzgar por el hecho de que las corrientes a través de $CCDV_N$ en neuronas pretratadas con PMA presentaron cinéticas homogéneas y claramente distintivas (ver Resultados).

Las soluciones que contenían forbol 12-miristato, 13-acetato (PMA) fueron preparadas diariamente a partir de soluciones stock que contenían 1.6 mM de PMA en dimetil sulfóxido (DMSO) siendo disueltas en solución de Ringer a una concentración final de 500 nM de PMA y 0.03 % (v/v) de DMSO. El PMA y el 4- α -forbol se obtuvieron de Calbiochem (La Jolla, CA, USA), la ω -conotoxina GVIA de Alomone Labs (Jerusalem, Israel) y todos los demás reactivos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

8. RESULTADOS

8.1. CARACTERÍSTICAS DE LA CORRIENTE DE $CCDV_N$ EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS SIMPÁTICAS DEL SCG DE RATAS ADULTAS JÓVENES

La Fig. 1 ha sido incluida, en primer término, para ilustrar dos puntos principales: (1) La caracterización farmacológica de la corriente aislada en nuestras condiciones de registro; (2) La presencia de inhibición tónica específica de $CCDV_N$.

Los trazos en la Fig. 1A ilustran un registro típico de corrientes macroscópicas, obtenidas mediante la técnica de *patch-clamp* (Hamill et al., 1981) en configuración de célula completa (*whole cell*), de una neurona proveniente de un cultivo primario de neuronas simpáticas del ganglio cervical superior (SCG) de la rata. Las características electrofisiológicas de la corriente estimulada por el protocolo de voltaje ilustrado en la Fig. 1C serán ampliamente tratadas a lo largo de esta presentación de resultados. Aquello en lo que aquí se pretende hacer énfasis es en la sensibilidad farmacológica de esta corriente.

La Fig. 1B demuestra que la mayor parte de la corriente registrada fluye a través de $CCDV_N$. Cerca del 85% de la corriente entrante máxima es bloqueada irreversiblemente por la toxina peptídica ω -CgTx GVIA, lo cual establece un criterio farmacológico universalmente aceptado que la define como corriente a través de $CCDV_N$. El bloqueo que induce esta toxina es irreversible, al menos en la ventana de tiempo más larga probada: la perfusión continua por más de 20 min con solución de registro libre de esta toxina no revierte de manera apreciable el bloqueo. El hecho de que el remanente de la corriente, tras la aplicación de ω -CgTx GVIA sea bloqueado por completo por 100 μ M de Cd^{2+} (Fig. 1D), indica que fluye también a través de $CCDV$. Tanto su insensibilidad a toxinas como su curva I-V ligeramente corrida hacia

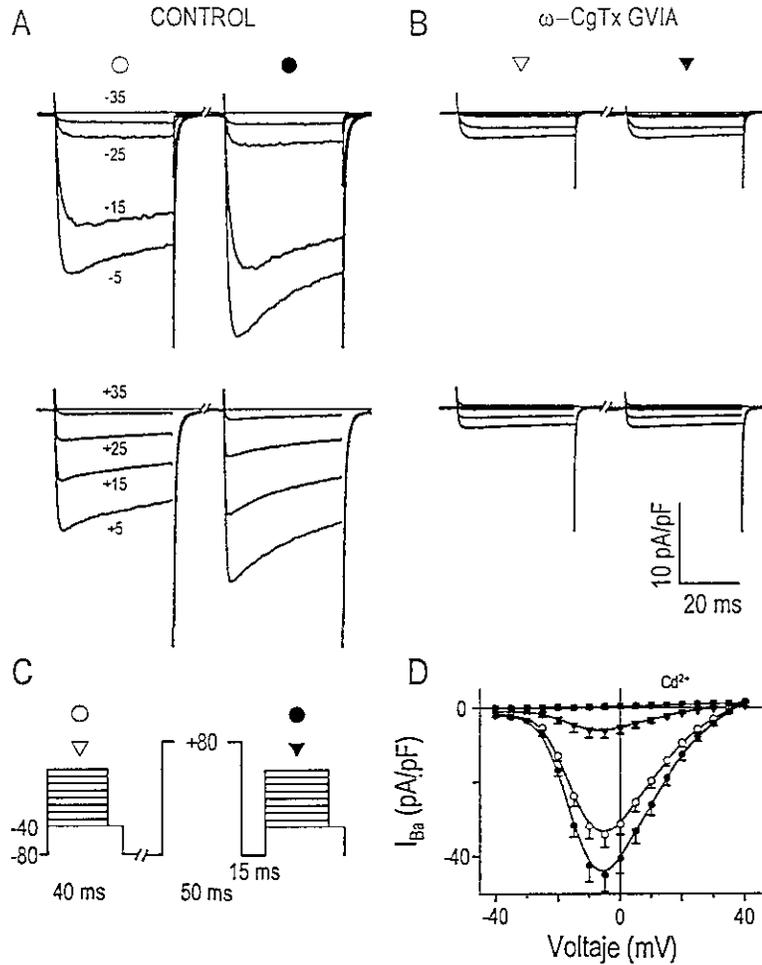


Fig. 1A-D *Caracterización farmacológica de la corriente estudiada.* A Corrientes macroscópicas de bario (I_{Ba}) estimuladas con el protocolo de fijación de voltaje ilustrado en C. Los números próximos a cada registro de la columna izquierda indican el potencial del pulso de voltaje utilizado en cada caso. B I_{Ba} en presencia de $10 \mu\text{M}$ de $\omega\text{-CgTx GVIA}$. La barra de calibración en la parte inferior de la Fig B, aplica a todos los trazos en A y B. El protocolo de fijación de voltaje (C) consistió en dos pulsos idénticos de 40 ms con despolarizaciones crecientes en 5 mV, seguidas por una repolarización parcial de 10 ms a -40 mV. Un intervalo de un segundo separó a ambos pulsos y un *prepulso* antecedió por 15 ms al segundo de ellos. D Relación I-V de valores promedio de densidad de I_{Ba} para las neuronas en A y B, y tras la aplicación de $100 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} ($n = 7$, mismas neuronas en todos los casos).

potenciales hiperpolarizantes (Fig. 1D), permiten identificar a ésta última como una corriente de CCDV tipo R (ver Apéndice I.2).

El segundo aspecto que importa es el efecto que tiene un *prepulso* breve (50 ms), sumamente despolarizante ($+80$ mV) sobre las características de las corrientes. Como se observa en la Fig. 1D, la corriente tras dicho *prepulso* crece en amplitud de una manera dependiente del potencial de prueba. Este fenómeno es conocido como “facilitación”, y es universalmente interpretado como

indicativo de la presencia de inhibición tónica mediada por PG, sistemáticamente observada en neuronas simpáticas en condiciones basales (Ikeda, 1991; Swartz, 1993; Yang y Tsien, 1993). Nótese en los trazos de la Fig. 1A que la interrupción por *prepulsos* de esta inhibición va acompañada de un incremento en la inactivación en estado estacionario del voltaje.

8.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES $G\beta$ CAPACES DE INDUCIR INHIBICIÓN DE $CCDV_N$

Los trazos de corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) que se ilustran en el panel derecho (P1) de la Fig. 2A, muestran la típica respuesta de las corrientes de $CCDV_N$ ante la presencia de una concentración saturante de NE (10 μ M; Schofield, 1990; Chen y Schofield, 1993; Delmas et al., 1999) en la solución de registro. La corriente sufre una fuerte disminución en su amplitud - en más del 50% (Fig. 3G) - y alteraciones en su curso temporal. La previa inactivación de estado estacionario que se presenta en condiciones basales durante un pulso de voltaje (Fig. 2A, trazos inferiores) se ve completamente enmascarada por un proceso de lenta activación de los canales inhibidos que vuelve, además, claramente bifásica la cinética de activación de la corriente (Fig. 2A, trazos superiores). Este característico “*enlentecimiento cinético*” es una de las propiedades distintivas que definen a la inhibición dependiente de voltaje (VD).

La dependencia del voltaje característica de la inhibición inducida por NE es también evidenciada por su sensibilidad a un *prepulso*. Los trazos del panel derecho (P2) de la Fig. 2A fueron registrados un segundo después que aquellos del panel izquierdo (P1) durante un pulso de voltaje idéntico pero precedido en 25 ms por un *prepulso* breve (25 ms) y sumamente despolarizante (+125 mV). En condiciones basales (Fig. 2A, trazos inferiores), la facilitación que éste induce es pequeña, comparada con aquella que se registra en presencia de NE (Fig. 2A, trazos superiores). Nótese en la Fig. 2A, que la facilitación en presencia de NE conlleva a que también se reviertan los efectos de ésta sobre la cinética de la corriente. El índice de facilitación constituye, por tanto, una medida directa de la proporción de $CCDV_N$ inhibidos de una manera VD en cada condición.

Todas las alteraciones en el comportamiento de la corriente, que resultan de la aplicación extracelular de NE, son reproducidas, en condiciones basales, 14 horas después de la inyección intranuclear del cDNA para la subunidad $G\beta_2$. Es decir, dicho procedimiento de

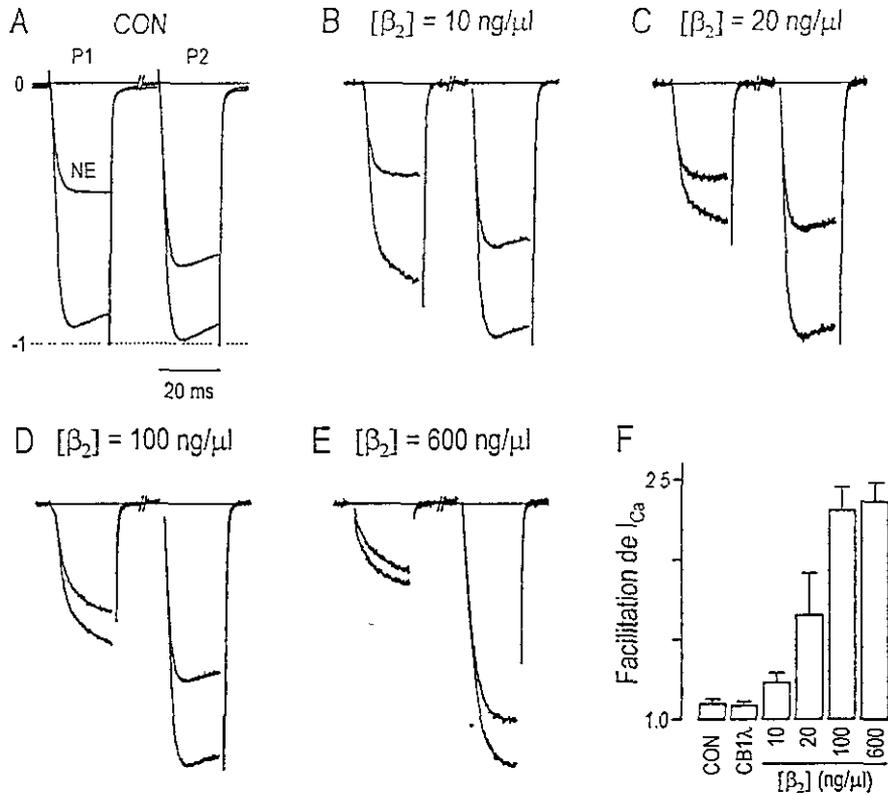


Fig. 2A-F Alteraciones en la facilitación basal inducida por la inyección intranuclear del DNA codificante para la subunidad $G\beta_2$. A-E Trazos superpuestos de corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}) registradas durante despolarizaciones de 20 ms (P1, P2) a +10 mV desde un V_h de -80 mV, en ausencia (trazos inferiores) o presencia (trazos superiores) de NE (10 μM), antes (P1) o después (P2) de un prepulso de 25 ms a +125 mV. Los paneles sucesivos muestran las corrientes de células no inyectadas (A) y de células inyectadas con concentraciones crecientes del cDNA para la subunidad $G\beta_2$ (B-E), coinyectado en todos los casos con una concentración de 100 ng/ μl de $G\gamma_3$. F Índice de facilitación promedio de I_{Ca} para las neuronas en A-E (P2/P1). Se encuentran agregados también los datos obtenidos tras la inyección de un cDNA irrelevante (Una forma truncada del receptor a cannabinoides de la rata, CB1 λ ; n = 23, 7, 4, 6, 19, 3, para neuronas control, inyectadas con CB1 λ , 10, 20, 100 ó 600 ng/ μl del cDNA para $G\beta_2$, respectivamente).

sobreconcentración intracelular de este subtipo $G\beta$ lleva a que se registren corrientes tónicamente inhibidas de manera VD. Lo anterior no es solamente evidente por las *enlentecidas* cinéticas de activación en condiciones basales y por la aceleración en las mismas y el incremento en la amplitud inducido por *prepulsos*, sino también por una fuerte reducción en la responsividad de las corrientes ante la aplicación de NE. Esto es, $G\beta_2$ mimetiza y ocluye los efectos de este NT (y por ende los efectos de otros que comparten este fenotipo inhibitorio).

La magnitud de los efectos anteriores depende del grado de inhibición de la corriente. Puede inferirse por tanto, que depende también de la concentración absoluta de subunidades $G\beta$ libres.

Según los datos presentados en la Fig. 2, ésta última guarda algún tipo de correlación con la concentración de cDNA presente en la solución de inyección intranuclear. Las Figs. 2B a F muestran que, concentraciones crecientes del cDNA para $G\beta_2$, dan como resultado grados de inhibición tónica progresivamente mayores. En la Fig. 2F puede observarse que una concentración de 100 ng/ μ l de dicho DNA induce efectos máximos sobre el índice de facilitación basal: el sextuplicar dicha concentración (Fig. 2E) lleva consigo pocos cambios adicionales (Fig. 2F).

No se pretende derivar de los datos anteriores la tentadora conclusión de una correlación estrecha entre la concentración del cDNA presente en la pipeta de inyección y la concentración intracelular de subunidades $G\beta_2$ libres 14 horas después. Hasta ahora, ninguna técnica de sobreexpresión heteróloga permite establecer este tipo de correlaciones causales. Sin embargo, los datos que se presentan en la Fig. 2 cumplen con las siguientes expectativas: (1) Permiten establecer una concentración estándar mínima para la obtención de efectos máximos con la cual poder investigar el efecto de otros subtipos de subunidades $G\beta$; (2) Muestran que el incremento en el índice de facilitación basal es un efecto que resulta de la sobreconcentración de subtipos $G\beta$ con potencialidad inhibitoria; (3) Evidencian que esta medida es fiable en cuanto a que no es producto de la manipulación experimental: la inyección intranuclear de un cDNA irrelevante (CB1 λ , una forma truncada del receptor a cannabinoides de la rata) no reproduce ninguno de los efectos que inducen las subunidades $G\beta$ (Fig. 2F y 3E-G).

Todos los subtipos restantes de subunidades $G\beta$ clonadas y conocidas hasta el momento reproducen, cualitativamente, los efectos descritos para el subtipo 2. Es decir, todos ellos provocan una reducción en la densidad de corriente (Fig. 3E), aumentan el índice de facilitación (Fig. 3F) y ocluyen la modulación inducida por NE (Fig. 3G) en condiciones basales. Sin embargo, difieren cuantitativamente en dos aspectos fundamentales.

La primer distinción se establece en términos de la potencia inhibitoria relativa de cada subtipo. En este caso, y como puede apreciarse claramente de los registros presentados en la Fig. 3D, el subtipo $G\beta_5$ puede separarse del resto por sus débiles efectos sobre la densidad de corriente (Fig. 3E) y, concomitantemente, sobre el índice de facilitación basal (Fig. 3F). Claramente, aparece entonces como el subtipo que tiene la menor potencialidad inhibitoria. En

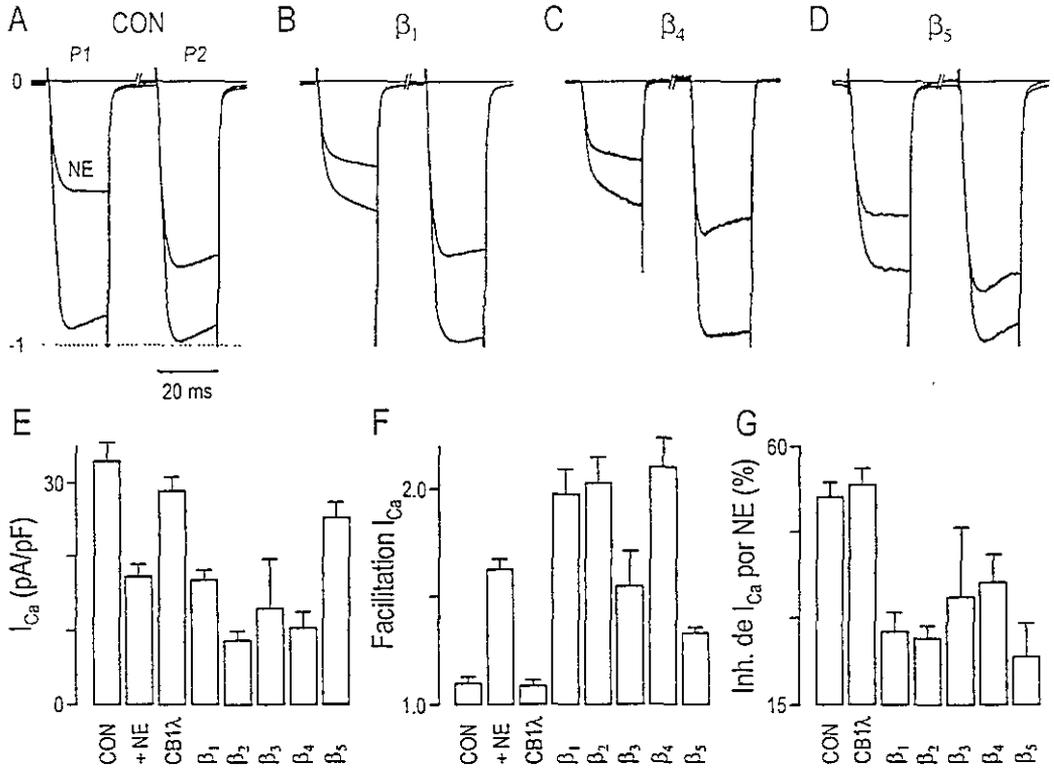


Fig. 3A-G Identificación de los subtipos de subunidades $G\beta$ que causan modulación dependiente de voltaje de las corrientes de Ca^{2+} . A-D Corrientes de Ca^{2+} promedio de células no inyectadas ($n = 11$), (A) en comparación con aquella de células inyectadas intranuclearmente con el cDNA para $G\beta_1$, $G\beta_4$, y $G\beta_5$ (B, C y D, respectivamente). E-G Resumen de valores promedio para índices de facilitación (E), inhibición por NE durante P1 (F), y densidad de corriente durante P1 en ausencia de NE. $G\beta_1$ ($n = 17$), $G\beta_2$ ($n = 17$), $G\beta_3$ ($n = 2$) y $G\beta_5$ ($n = 9$) fueron coinyectados con una concentración de 100 ng/ μ l de $G\gamma_3$. $G\beta_4$ ($n = 7$) fue coinyectado con la misma concentración de $G\gamma_3$.

este contexto la fuerte reducción en la inhibición de la corriente inducida por NE en células en las que $G\beta_3$ se encuentra sobreconcentrada, puede interpretarse en términos de un desplazamiento de las subunidades $G\beta$ endógenas encargadas de mediar dicha inhibición, más que de un efecto específico sobre los $CCDV_N$ (aunque caben otros tipos de interpretación que, al igual que ésta, no serán exploradas).

Entre los demás subtipos, la potencia inhibitoria es relativamente equivalente en términos de los índices explorados en las Figs. 3E a G. Sin embargo, existen algunas diferencias entre ellos: (1) La reducción en la densidad de corriente basal es máxima con $G\beta_2$ y $G\beta_4$; (2) La facilitación es máxima con $G\beta_4$; (3) La oclusión de la inhibición inducida por NE es máxima en neuronas inyectadas con $G\beta_1$ y $G\beta_2$; y (4) $G\beta_3$ parece tener efectos intermedios en todos casos.

De todos los parámetros evaluados, claramente el índice de facilitación (Fig. 3F) es el más representativo de la capacidad para inducir una inhibición VD de los CCDV_N: por definición, la inhibición VD es aquella que puede ser transitoriamente revertida por despolarizaciones extremas de la membrana (Jones y Elsmilie, 1997). Por lo tanto, el subtipo Gβ₄ es aquel que presenta la mayor potencia para inducir efectos inhibitorios VD. Por otra parte, en términos de su similitud de efectos sobre la facilitación basal y sobre la inhibición inducida por NE, los subtipos Gβ₁ y Gβ₂ parecen tener capacidad inhibitoria VD similar. Finalmente, Gβ₃ parece tener los menores - y más variables - efectos VD. Con base en estas consideraciones, la potencialidad de los distintos subtipos de Gβ para inducir una inhibición VD puede establecerse como: Gβ₄ ≥ Gβ₁ ≈ Gβ₂ > Gβ₃ >>> Gβ₅.

La segunda distinción entre los efectos de los subtipos se desprende de un análisis menos frecuentemente presentado en la literatura que el anteriormente expuesto. Los trazos de corriente de las Figs. 2 y 3, se encuentran escalados a la magnitud de corriente máxima registrada en el pulso de prueba (P2) que sucede a un *prepulso*. Este tipo de representación busca remarcar los efectos inhibitorios VD: las alteraciones en la cinética de activación y el grado de facilitación. Pero, ¿Qué sucede, justamente, con la densidad de corriente durante P2?, ¿Alcanza valores control? En otros términos, ¿Es toda la modulación inducida por subunidades Gβ exclusivamente VD?

La Fig. 4 pretende establecer una distinción entre los subtipos Gβ en términos de las preguntas anteriores. En las Figs. 3F y 3G se hizo notar la similitud de los efectos de Gβ₁ y Gβ₂ en términos de facilitación basal (Fig. 3F) y de oclusión de la inhibición inducida por NE (Fig. 3G). Sin embargo, Gβ₁ y Gβ₂ difieren enormemente en la capacidad de cada una para inducir una forma de inhibición de la densidad de corriente no reversible por *prepulsos* (Fig. 4).

Los trazos en las Figs. 4A a C representan el promedio de los trazos de densidad de corriente de todas las neuronas registradas en cada condición indicada. La diferencia fundamental entre las inhibiciones inducidas por Gβ₁ y Gβ₂ saltan a la vista. Un grado de facilitación equivalente (Fig. 3F) lleva, en el caso de Gβ₁, a que la densidad de corriente en P2 crezca hasta alcanzar valores similares al control (Fig. 4D) En claro contraste, el mismo grado de facilitación, en el caso de Gβ₂, se asocia con una marcada reducción en la densidad de corriente tras los *prepulsos* (Fig. 4D).

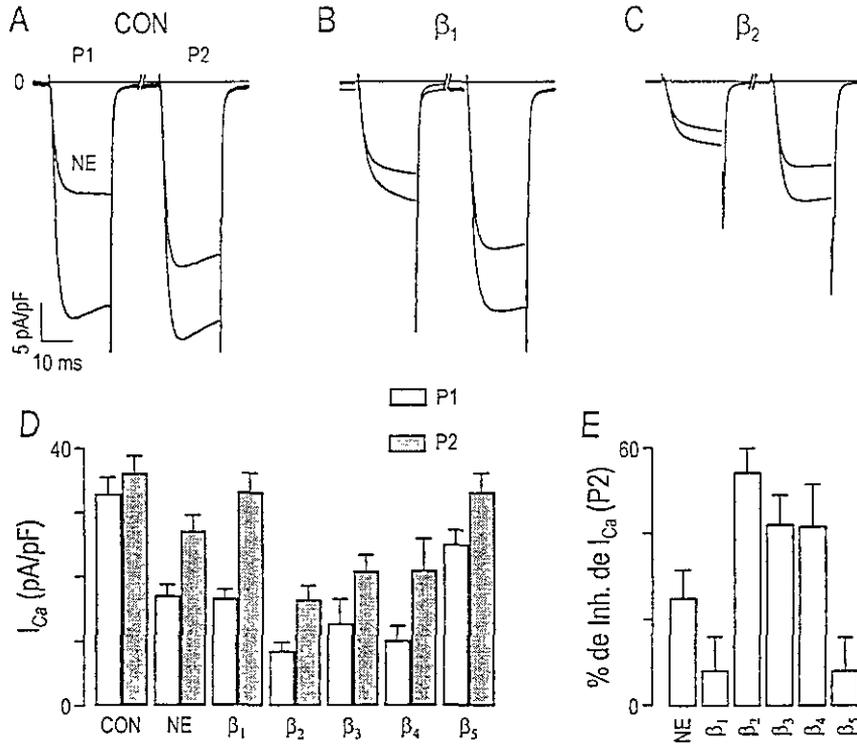


Fig. 4A-F Inhibición de la densidad de corriente independiente de voltaje inducida por subunidades $G\beta$. A-C Trazos de densidad de corriente de calcio promedio para todas las neuronas control (A; $n = 11$), neuronas inyectadas con cDNA para $G\beta_1$ (B; $n = 9$) y $G\beta_2$ (C; $n = 9$). Mismo protocolo de voltaje descrito para la Fig. 2. D Densidad de corriente antes (P1) o después (P2) de un prepulso. E Porcentaje de inhibición de I_{Ca} después de un *prepulso*, tomando el valor de densidad de corriente control promedio en P2 como referencia. Mismas neuronas de la Fig. 3.

Como resultado, el porcentaje de inhibición que permanece en P2 de las inhibiciones inducidas por cada subtipo es marcadamente diferente (Fig. 4E). De manera interesante, la inhibición inducida por NE en el control (Fig. 4A), provoca efectos intermedios a los de $G\beta_1$ y $G\beta_2$ sobre la densidad de corriente en P2 (Figs. 4D y E).

Los datos anteriores permiten diferenciar los efectos de ambos subtipos de subunidades $G\beta$ en términos de la sensibilidad al voltaje de su inhibición total. La inhibición de la corriente inducida por $G\beta_1$ es casi completamente revertida por un *prepulso* (Fig. 4E) y es, por tanto, definible como “puramente VD”. El subtipo $G\beta_2$, en cambio, induce un patrón inhibitorio “mixto”, que comprende tanto un componente VD como efectos adicionales insensibles al potencial (Fig. 4E). Hay dos interpretaciones posibles para estos efectos adicionales: (1) Que los $CCDV_N$ se encuentren tónicamente inhibidos por un mecanismo independiente de voltaje (VI);

ó (2) Que haya una reducción neta en el número de $CCDV_N$ presentes en la membrana, resultado de algún fenómeno desconocido y selectivamente activado por los subtipos $G\beta_2$, $G\beta_3$, y $G\beta_4$ (Fig. 4D y E). Según se detallará en la Discusión, y por las razones que entonces se mencionarán, la interpretación que aquí se favorece es la primera. Sin embargo, no se aportará evidencia conclusiva alguna que la sustente.

En los trazos de la Fig. 4A puede apreciarse que la NE induce, también, una inhibición mixta con componentes tanto VD como VI. La separación electrofisiológica entre ambos será tratada en más detalle más adelante. También será interesante especular que los efectos intermedios entre las subunidades $G\beta$ que se observan en presencia de NE pudiesen estar asociados con que la transducción de su señal utilice una mezcla de subtipos $G\beta$. Por ahora, baste subrayar que ciertos subtipos de estas subunidades ($G\beta_2$, $G\beta_3$ y $G\beta_4$) inducen patrones inhibitorios mixtos, mientras que otras ($G\beta_1$ y $G\beta_5$) provocan inhibiciones puramente VD (Fig. 4D y E). A partir de los datos presentados en la Fig. 4E, puede inferirse un orden de potencia relativa, para inducir una inhibición VI, entre los distintos subtipos de $G\beta$ que seguiría un orden $G\beta_2 > G\beta_3 \approx G\beta_4 \gg G\beta_1 \approx G\beta_5$.

8.3. EFECTOS PARADÓJICOS DE LAS SUBUNIDADES $G\beta$

Las Figs. 2 a 4 ilustran los efectos inhibitorios “típicos” asociados a la sobreconcentración intracelular de subunidades $G\beta$ (Herlitz et al., 1996; Ikeda, 1996). Sin embargo, ¿Son éstos los únicos efectos que induce este procedimiento experimental? En otras palabras, ¿Las células que recibieron una inyección intranuclear de cDNA, y que no expresaron el clásico fenotipo de corriente tónicamente inhibida, son **todas indistinguibles** del grupo control? Una respuesta negativa para ambos interrogantes tiene como base las siguientes consideraciones.

Los trazos de la Fig. 5 muestran el promedio de la densidad de corriente en tres grupos de células inyectadas con cDNA para subunidades $G\beta$ inhibitoriamente activas, agrupados, no en términos del subtipo inyectado - cada grupo contiene neuronas inyectadas con el cDNA de los subtipos $G\beta_1$, $G\beta_2$ y $G\beta_4$ -, sino en términos del efecto obtenido. El primer grupo (G1; Fig. 5B) presenta el efecto inhibitorio promedio que se ha descrito en las Figs. 2 a 4. El segundo grupo (G2; Fig. 5C) representa a un grupo de neuronas inyectadas pero con fenotipo de corriente

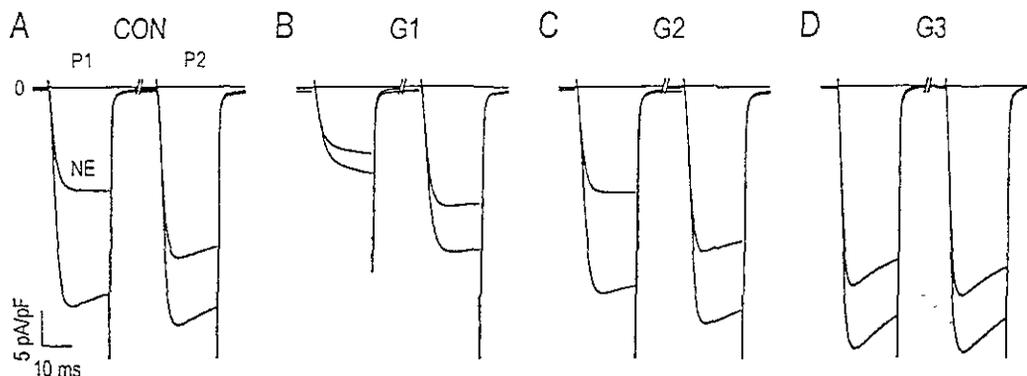


Fig. 5A-D *Diferentes fenotipos modulatorios inducidos por sobreconcentración de subunidades G β* . A Células de la Fig. 4A. B-D Tres grupos de neuronas inyectadas con al cDNA para subunidades G β activas pueden discriminarse visualmente en términos del fenotipo de corriente registrada: Células con el efecto inhibitorio típico descrito en las Figs. 2-4 (B; n = 33), células indiscriminables del control (C; n = 25), y células inclasificables en cada grupo anterior (D; n = 23).

indistinguible del control (Fig. 5A). El tercer grupo (G3; Fig. 5D) es el que ha motivado el título del presente apartado: tras una manipulación experimental idéntica, tanto el fenotipo basal de la corriente como su patrón de respuesta a la NE no son tan sólo claramente distintos a los observados en G1 y en G2, sino que son, además, antagónicos a los que se presentan en G1.

En clara oposición al patrón inhibitorio en G1, la densidad de corriente y las cinéticas de activación e inactivación aumentan en G3, mientras que, tanto la facilitación basal como aquella en presencia de NE disminuyen en este grupo. Es, además, notorio que la NE aún es capaz de inhibir parte de la corriente de G3, pero que el patrón inhibitorio cambie sustancialmente respecto del que se presenta en los demás grupos: no sólo muestra insensibilidad a los *prepulsos* sino que no altera las cinéticas basales de la corriente.

¿Permite, esta clasificación visual previa, realmente identificar grupos discretos?, ¿Se encuentran interrelacionadas las características fenotípicas de la corriente y su patrón de respuesta a NE en este grupo?, ¿Son todas éstas características representativas de un patrón de actividad modulada **distinto** inducido por subunidades G β activas?

En la Fig. 6, la respuesta al primer y tercer interrogante se ha buscado en términos de la segunda pregunta. La eliminación de la facilitación basal en G3 covaría con una disminución a la respuesta a NE (Fig. 6A), con una eliminación de la sensibilidad al voltaje de la inhibición remanente (Fig. 6B), con un aumento en la densidad de corriente (Fig. 6C) y un muy prominente

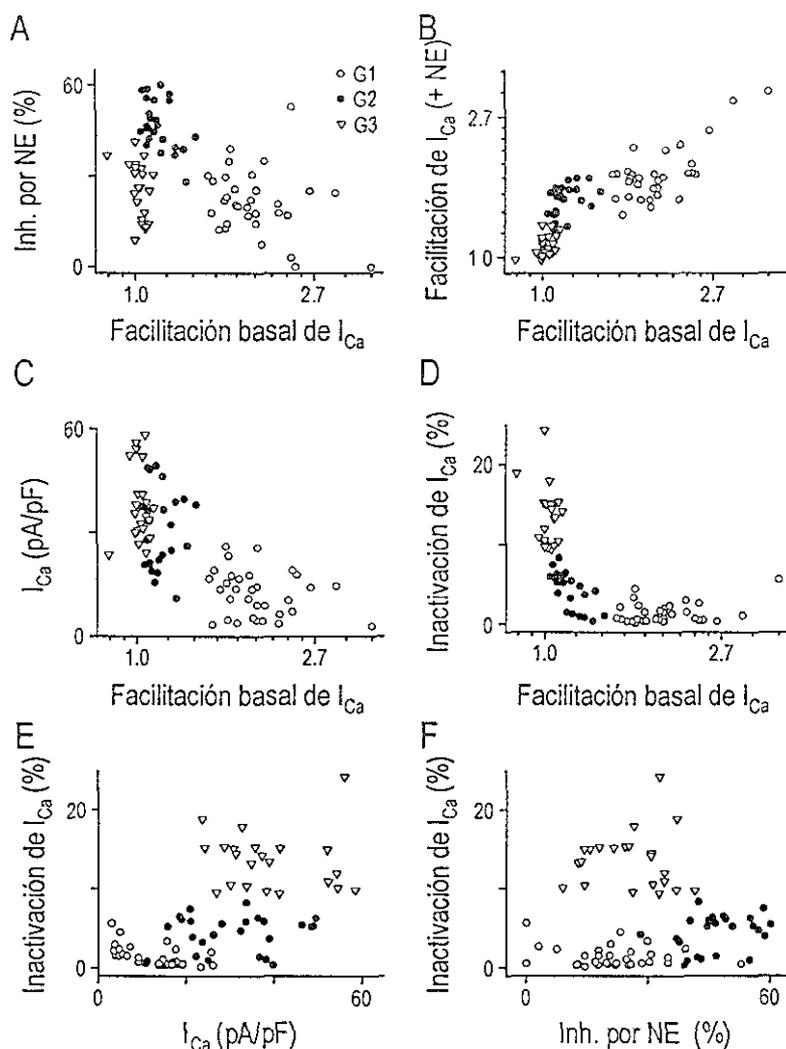


Fig. 6A-F Covariación de las características fenotípicas distintas de cada grupo de neuronas de la Fig. 5. A-D Relaciones entre el índice de facilitación basal (en escala logarítmica natural) *versus* el porcentaje de inhibición por NE (A), el índice de facilitación en presencia de NE (B), la densidad de corriente en P1 (C) y el porcentaje de inactivación en P1 (D), determinado como la relación de I_{Ca} máxima en P1 entre el promedio de I_{Ca} en el último ms de dicho pulso de prueba). E Relación entre la densidad de corriente y el porcentaje de inactivación en P1. F Relación entre el porcentaje de inhibición por NE y el porcentaje de inactivación en P1. Mismas células de la Fig. 5.

aumento en la inactivación de corriente en estado estacionario (Fig. 6D). La densidad de corriente de las neuronas del grupo G3 se superpone ligeramente con aquella del grupo G2 pero ambos son claramente distintos en la magnitud de la inactivación que exhiben durante el pulso de prueba (Fig. 6E). Correspondientemente, altos índices de inactivación en G3 covarían con bajos índices de inhibición por NE (Fig. 6F). Patrones de covariación similares se observaron entre las relaciones densidad de corriente *versus* porcentaje de inhibición por NE, y entre este último y la facilitación en presencia de este NT

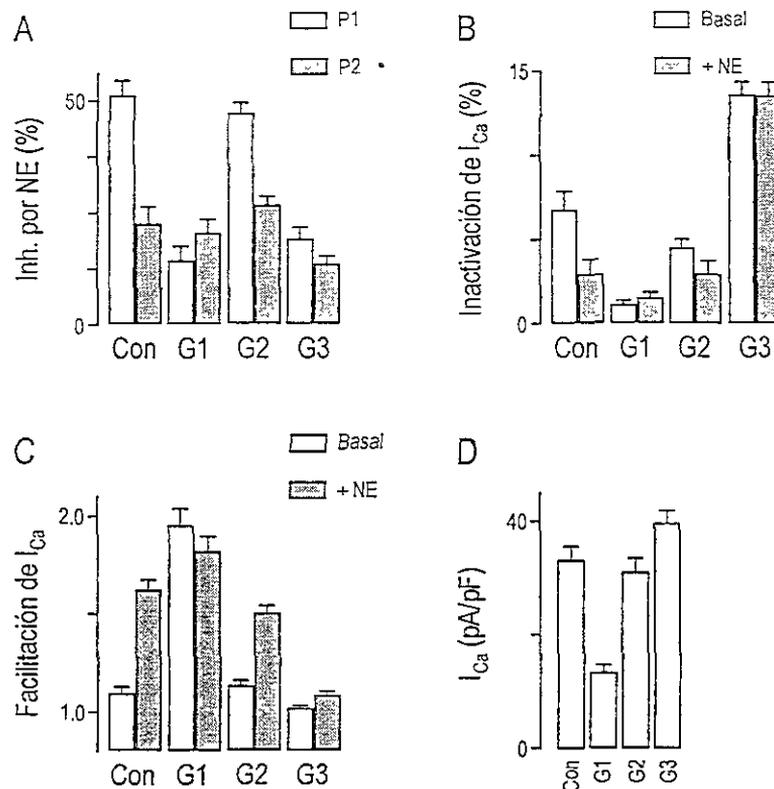


Fig. 7A-D Los grupos 1 y 3, representan características extremas de modulación por subunidades $G\beta$. A Promedios del porcentaje de inhibición inducido por NE en P1 y P2. B Porcentaje de inactivación durante P1 en ausencia y presencia de NE. C Índices de facilitación basal y facilitación en presencia de NE. D Densidad de corriente durante P1. Mismas células de las Figs. 5 y 6.

En resumen, la falta de facilitación basal, el aumento en inactivación durante el pulso de prueba, la reducción en la sensibilidad a NE y el hecho de que la inhibición remanente no presente sensibilidad al voltaje, son todas características que covarían entre sí y que, por tanto, sugieren la existencia de un estado modulado particular y distinto de los $CCDV_N$.

La Fig. 7 muestra la tendencia central de los valores de cada una de las variables examinadas para cada grupo aislado a partir del análisis de la Fig. 6. Nótese que los valores promedio del grupo G2 son muy similares a los de las neuronas control, y que en términos de inactivación de estado estacionario (Fig. 7B), índice de facilitación (Fig. 7C) y de densidad de corriente (Fig. 7D), los grupos G1 y G3 presentan comportamientos no solamente distintos al del control y al del grupo G2, sino opuestos entre sí. Estas observaciones sugieren las siguientes interpretaciones: (1) El grupo G2 representa células que no expresaron la subunidad $G\beta$ con cuyo cDNA fueron inyectadas; (2) Los grupos G1 y G3 expresaron, ambos, la proteína deseada; (3) Las subunidades

G β activas pueden dar lugar a una señal divergente que active dos patrones moduladores diametralmente opuestos; (4) El grupo G1 contiene células en las que un efecto inhibitorio de G β es dominante, mientras que G3 identifica un efecto estimulador mediado por las mismas.

Si todo lo anterior es correcto, la disminución en la magnitud de la respuesta a NE en G1 y G3 (Fig. 7A) es el resultado de dos procesos distintos: de una oclusión a los efectos de la misma en G1, y de una reducción en la responsividad en G3. Esto es, la convergencia de efectos sobre la inhibición inducida por NE es análoga más no homóloga.

Finalmente, y tal vez lo más importante, si una interacción directa entre G β y los CCDV_N es la responsable del efecto de G1 (De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997), entonces, es posible que exista un segundo intermediario que medie los efectos observados en G3. Si esto es cierto, tiene que haber una vía de señalización intracelular que sea activada por las subunidades G β y que converja junto a estas en los CCDV_N.

8.4. LA ACTIVACIÓN DE LA PKC MIMETIZA LOS EFECTOS ESTIMULADORES INDUCIDOS POR SUBUNIDADES G β

Dos sistemas de segundos mensajeros son regulados por subunidades G $\beta\gamma$: la ruta del cAMP, a través de la inducción de la actividad de la adenilato ciclasa (Chen et al., 1995), y la vía de la PKC, que es activada indirectamente tras la estimulación de la fosfolipasa C β (Katz et al., 1992). Como ha sido expuesto en los Antecedentes, a pesar de que existen reportes sobre regulación de CCDV_N por PKA en ciertas preparaciones (p.e., Gross y Macdonald, 1988, 1989; Surmeier et al., 1995), la mayor parte de la literatura ha descartado su participación en la misma en neuronas simpáticas. Por el contrario, la segunda vía ha sido repetidamente involucrada en dicho proceso y, en neuronas simpáticas, existen evidencias publicadas que la vuelven un buen candidato para mediar los efectos observados en el G3 (Swartz, 1993; Yang y Tsien, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Shapiro et al., 1996).

La Fig. 8 muestra la factibilidad de la hipótesis anterior. En neuronas que han recibido un tratamiento con un activador de la PKC - el éster de fofbol, PMA - previo al registro (Fig. 8C), la amplitud de la corriente registrada no solo tiende a ser significativamente más grande que en

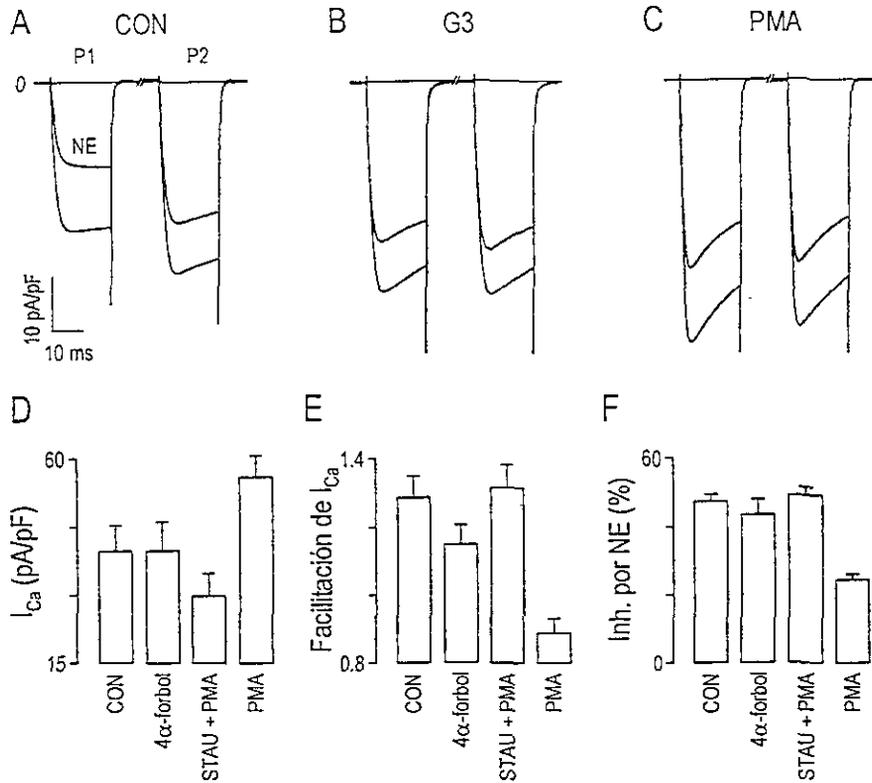


Fig. 8A-F El activador de la PKC, PMA, reproduce y magnifica las características estimuladoras observadas en el grupo 3. A-C Promedio de trazos de I_{Ca} control (A; $n = 8$), de neuronas del grupo 3 (B; mismas células de la Fig. 5D) y de neuronas pretratadas con PMA (C; $n = 13$). D-F Promedios de densidad de corriente (D), índice de facilitación basal (E) e inhibición de NE durante P1 (F) para las neuronas control y aquellas tratadas con PMA, en comparación con neuronas que recibieron un tratamiento con 4 α -forbol ($n = 5$) y neuronas tratadas con estaurosporina (STAU), previo al tratamiento con PMA ($n = 6$).

neuronas control (Fig. 8A) - e incluso superior a aquella registrada tras la aplicación de un *prepulso* en estas neuronas - sino que presenta, aún más marcadas, las características cinéticas de activación e inactivación, y la eliminación total de la facilitación basal observada en las neuronas de G3 (Fig. 8B). Más aún, en estas neuronas se reproduce el cambio en el patrón de respuesta a la inhibición inducida por NE. Aunque disminuida en magnitud (Fig. 8F), la inhibición por NE sigue presente, pero se manifiesta ahora como una reducción porcentual insensible a *prepulsos* en la amplitud de la corriente que no altera en absoluto las cinéticas observadas antes de su aplicación, de manera extremadamente similar al fenómeno observado en el grupo G3 de neuronas inyectadas con el cDNA para subunidades $G\beta$ activas.

A pesar de que la similitud fenotípica entre las corrientes del grupo G3 y aquellas de neuronas pretratadas con PMA no aporta evidencia concluyente sobre una relación causal que vincule a la PKC en la modulación estimuladora inducida por subunidades $G\beta$, es claramente sugestiva de la misma y no es el aportar mayor evidencia al respecto lo que ha motivado la serie de experimentos que se presentarán a continuación. Antes que eso, se ha intentado contestar una pregunta aún más básica: ¿Son los fenómenos observados un reflejo de la existencia de una vía de modulación positiva de los $CCDV_N$ ó simplemente consecuencia de un proceso de desinhibición tónica y prevención de inhibición subsiguiente? En menos palabras, ¿Existe modulación positiva de $CCDV_N$?

Indudablemente pueden identificarse dos fenómenos, seguramente interrelacionados, inducidos tanto por subunidades $G\beta$ como por el pretratamiento con PMA: (1) Aquellos relativos a las alteraciones en el comportamiento basal de la corriente (trazos inferiores en las Figs. 8B y C); (2) El cambio en el patrón de respuesta de esta corriente frente a la NE (trazos superiores en las Figs. 8B y C). La búsqueda de una respuesta sobre el origen de ambos fenómenos ha sido el tema central propulsor de esta tesis. Ambos serán tratados de manera independiente. Además, por simplificación experimental, el pretratamiento con PMA ha sido utilizado en reemplazo de la inyección intranuclear de cDNA por tres razones: (1) No sólo reproduce cualitativamente el mismo fenómeno, sino que lo magnifica cuantitativamente; (2) Como puede observarse en la Fig. 6, el grupo G3 es una subpoblación de las neuronas que expresan subunidades $G\beta$, que es a su vez una subpoblación de las neuronas que sobreviven a la inyección intranuclear de cDNA, que es a su vez una subpoblación de las neuronas inyectadas, etc.; (3) El tiempo necesario para que las neuronas expresen la proteína deseada se superpone con el tiempo en el cual las neuronas en cultivo pierden la forma esférica característica a las pocas horas del sembrado, y comienzan a extender prolongaciones, comprometiendo, por tanto, la fijación espacio-temporal de voltaje, que impide la aplicación de protocolos más extensos y de medidas más rigurosas.

Las Figs. 8D a F muestran otro aspecto de los efectos inducidos por el PMA. Si bien es cierto que poca es la aportación en el terreno de la farmacología que puede desprenderse de este trabajo - por la sencilla razón de que no estaba dentro de sus objetivos una investigación de este tipo - algo puede decirse respecto del sustrato bioquímico que media las acciones del pretratamiento

con PMA. Es poco probable que acciones directas o no específicas de los ésteres de forbol sobre $CCDV_N$ expliquen los efectos observados por cuatro razones: (1) Los efectos inespecíficos que se han reportado son inhibitorios (Fig. 5; Hockberger et al., 1989; Doerner et al., 1990; Abrahams y Schofield, 1992) y aquéllos aquí expuestos son estimuladores; (2) Dichos efectos son dependientes de la presencia extracelular del compuesto (Hockberger et al., 1989). El método de pretratamiento empleado permite excluir al PMA de la solución de registro, minimizando cualquier efecto extracelular de los ésteres de forbol; (3) El mismo pretratamiento con el análogo inactivo 4- α -forbol no reproduce las acciones del PMA (Fig. 8D-F); (4) Preincubaciones con el inhibidor de cinasas, estaurosporina (Ruegg y Burgess, 1989), antes y durante el pretratamiento con PMA, bloquean todos los efectos inducidos por el PMA. Las corrientes a través de $CCDV_N$ en estas neuronas fueron indistinguibles del control (Fig. 8D-F).

Tomados juntos, los resultados con 4- α -forbol y estaurosporina apoyan la interpretación de que los efectos inducidos por el PMA resultan de la fosforilación de proteínas. Varias evidencias favorecen la idea de que esta fosforilación puede ser mediada por activación de la PKC. (1) El PMA es un éster de forbol bien conocido y ampliamente utilizado, con actividad probada para activar específica y selectivamente a la PKC en neuronas del SCG cuando es usado a una concentración de 500 nM (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Shapiro et al., 1996; Barrett y Rittenhouse, 2000). (2) El 4- α -forbol no activa a la PKC (Castagna et al., 1982). (3) La estaurosporina es un inhibidor potente pero no selectivo de la PKC (Ruegg y Burgess, 1989). (4) Hay evidencia que sugiere que corrientes de $CCDV_N$ reconstituidas son estimuladas por el PMA a través de un mecanismo todavía desconocido (Hamid et al., 1999) que involucra la fosforilación dependiente de PKC de la subunidad α_1 de estos canales (α_{1B} ; Stea et al., 1995; Hamid et al., 1999).

Con base en lo anterior, se hará uso indistinto de las frases "activación de la PKC" como sinónimo de "inducido por PMA". De cualquier manera, el que se llegara a demostrar que no es ésta sino otra la enzima involucrada, pocos cambios sustanciales induciría en las conclusiones que aquí se obtengan.

8.5. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE PKC SOBRE EL COMPORTAMIENTO BASAL DE LAS CORRIENTES DE $CCDV_N$.

Como ha sido establecido en el planteamiento del problema, interesa aquí la discriminación entre dos posibles explicaciones para el aumento en la amplitud (Fig. 8D) y las alteraciones en las cinéticas de las corrientes tras el pretratamiento con PMA (Fig. 8C y E): (1) Que se deba a la remoción de inhibición tónica; (2) Que represente a un fenómeno independiente de esta. Queda sobreentendido que una combinación de ambos fenómenos no es excluida *a priori*.

El abordaje del problema se basa en un estudio comparativo entre los efectos inducidos por el éster de forbol PMA y aquellos resultantes de la diálisis intracelular con el inhibidor no selectivo de PG, GDPβS. Ambos efectos se comparan, en todos los casos en que ha sido posible, con aquellos inducidos por un *prepulso* en condiciones control, pues es este el procedimiento experimental que originalmente llevó a la demostración y caracterización de la inhibición tónica (Fenwick et al., 1982; Hoshi et al., 1984; Scott y Dolphin, 1990; Kasai, 1991; Ikeda, 1991; Swartz, 1993).

8.5.1. Efectos del PMA y el GDPβS en la Amplitud y Curso Temporal de Corrientes en Estado Estacionario del Voltaje

La diálisis interna con GDPβS aumenta la amplitud de corrientes totales de Ba^{2+} y elimina la facilitación basal inducida por *prepulsos* (Fig. 9A-D). Los efectos del GDPβS son comparables con aquellos inducidos por un *prepulso* en control, y son, por tanto, atribuibles a la remoción de inhibición tónica (Ikeda, 1991). Ambos procedimientos producen un aumento de la corriente que es más pronunciado para potenciales de prueba negativos (Fig. 9A y B) que para potenciales positivos (Fig. 9C y D) alrededor del máximo de la I-V (Fig. 9E). Esto lleva a que el incremento proporcional en la amplitud de la corriente inducido por remoción de inhibición tónica sea inversamente proporcional al valor del potencial utilizado para evocarla (Fig. 10A). Esto es, el aumento es dependiente de voltaje (Ikeda, 1991).

De manera similar a los efectos de los *prepulsos* o del GDPβS, breves preincubaciones con PMA eliminan la facilitación basal (Fig. 9A-D y 10B) y producen un incremento dependiente de voltaje en la densidad de la corriente (Fig. 9E y 10A). La amplitud de la corriente durante

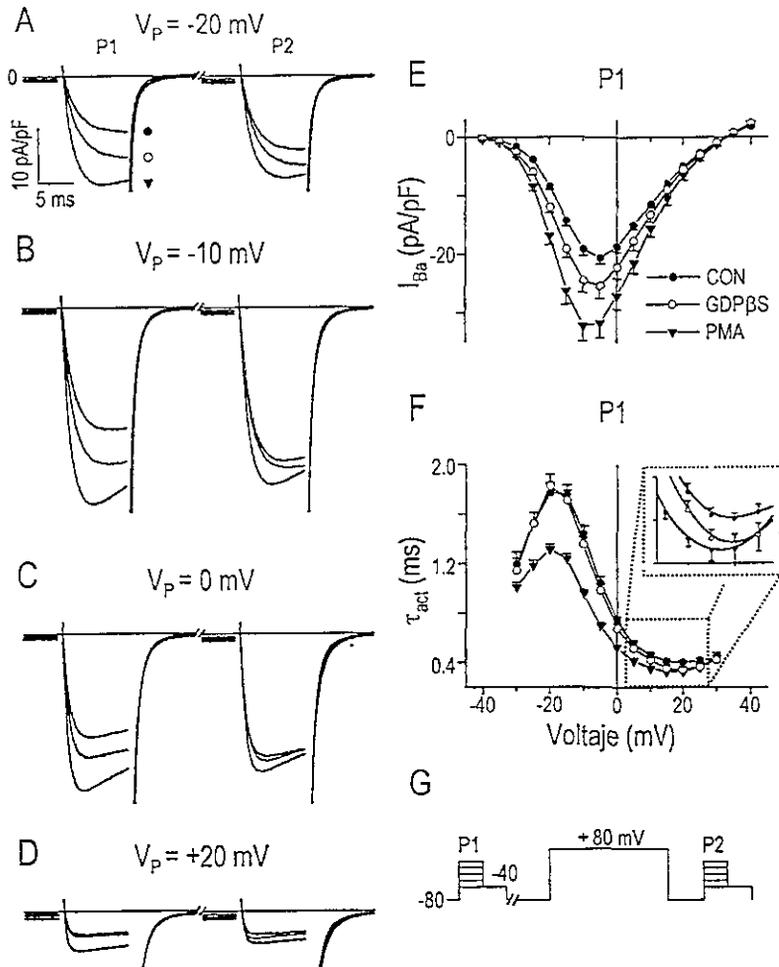


Fig. 9A-G Efectos del PMA y del GDP β S en la relación corriente-voltaje y en la cinética de activación de corrientes totales de CCDV_N. A-D I_{Ba} evocada por pulsos cuadrados de voltajes a los potenciales indicados en cada gráfica (V_p), utilizando el protocolo de fijación de voltaje ilustrado en G. Los trazos de I_{Ba} superpuestos representan el promedio de I_{Ba} de neuronas control ($n = 16$), neuronas dializadas con GDP β S ($n = 11$) y neuronas pretratadas con PMA ($n = 17$). La misma barra de calibración aplica para A-D. El protocolo de fijación de voltaje (G) consistió en dos pulsos idénticos de 10 ms (P1, P2) con despolarizaciones crecientes, seguidas por una repolarización parcial de 10 ms. P1 y P2 fueron separados por 1 segundo, y P2 fue precedido (15 ms) por un prepulso de 50 ms. E Relación I-V para neuronas A-D durante P1. La densidad de corriente se calculó como valor medio de la corriente entre 3 y 4 ms tras el inicio del pulso. F Constante de tiempo (τ_{act}) de un decaimiento exponencial simple ajustado a la fase de activación de la corriente una vez que la corriente transitoria positiva ha cruzado la línea basal (200-300 μ s, después del inicio del pulso de prueba).

despolarizaciones pequeñas (Fig. 9A y B) se incrementa más que la corriente que se registra durante despolarizaciones más grandes (Fig. 9C y D). Estas similitudes en los efectos sobre la facilitación basal y en la dependencia del voltaje que guardan el incremento inducido por PMA con aquel producido por *prepulsos* o GDP β S han sido sostenidas como evidencias a favor de la

remoción de inhibición tónica en ambos casos (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994). Se intentará mostrar más adelante que esta no es necesariamente la única interpretación posible.

Al margen de las similitudes notadas anteriormente, existen dos diferencias notables entre los efectos del PMA y aquellos de los *prepulsos* y el GDPβS. Primero, el PMA recluta más corriente de lo que lo hacen los *prepulsos* y el GDPβS (Fig. 9E y 10A). Segundo, el aumento de la corriente inducido por estos últimos, a potenciales de prueba negativos, no está acompañado de ningún cambio significativo en la cinética de activación (Fig. 9F), y, en contraste, el aumento inducido por PMA está acompañado por cambios marcados en la cinética de la corriente. Como es posible observar en los registros de las Figs. 9A-D, después del pretratamiento con PMA, la corriente se activa más rápido con pulsos de prueba negativos.

El curso temporal de la fase de activación de la corriente se ajusta a una función exponencial con una sola constante de tiempo (τ_{act} ; Jones y Marks, 1989a; Ikeda, 1991). La relación de τ_{act} versus voltaje registrada tiene la forma de campana descrita para la activación de corrientes de $CCDV_N$ en neuronas simpáticas (Jones y Marks, 1989a; Ikeda, 1991), alcanzando un máximo alrededor de -20 mV y decreciendo tanto a potenciales más negativos como más positivos (Fig. 9F).

De manera similar a lo reportado por Ikeda (Ikeda, 1991), los *prepulsos* tienen un efecto sobre τ_{act} , pero dicho efecto se circunscribe a una reducción significativa a potenciales más positivos que aquellos que generan corriente entrante máxima, sin que tengan ningún efecto a potenciales más negativos (Fig. 11F). Un efecto similar se observa tras el tratamiento con GDPβS (inserto en la Fig. 9F). En contraste, τ_{act} es significativamente reducida ($P < 0.05$) en un rango de voltaje de -30 a +5 mV por el PMA (Fig. 9F), con una reducción de ~26% en el valor máximo de τ_{act} (a -20 mV). Nótese que este no es el único cambio en la cinética de las corrientes inducido por PMA. Los trazos de las Figs. 9A-D muestran una aceleración en las cinéticas de inactivación en estado estacionario que tampoco es reproducida por GDPβS, y que se hará mucho más evidente en el curso de despolarizaciones más largas (500 ms; Fig. 16).

En suma, cambios significativos en la cinética de la corriente son vistos tras la incubación con PMA pero no con diálisis de GDPβS.

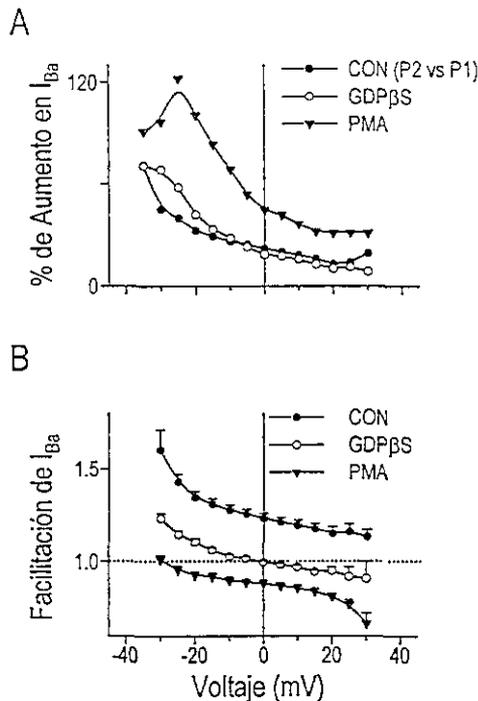


Fig. 10A-B *Aumento dependiente de voltaje y eliminación de la facilitación basal inducidos por PMA y GDPβS.* A Porcentaje de aumento de la corriente calculado a partir de los valores promedios ilustrados en la Fig. 9E para neuronas pretratadas con PMA y dializadas con GDPβS, y en la Fig. 11E para el efecto de los prepulsos en condiciones control. B Facilitación basal en el rango de potenciales que inducen corriente entrante. Mismas neuronas de la Fig. 9.

8.5.2. Efectos del Incremento en la Inhibición Tónica sobre la Cinética de Activación de la Corriente

Conviene en este momento hacer una pausa en el análisis de los efectos que induce el PMA para explorar un hecho notable que ayudará a fundamentar algunas de las conclusiones que se establecerán más adelante.

Los resultados anteriores tienen la siguiente connotación. En el rango de voltaje donde se presentan efectos máximos de la inhibición por PG sobre la amplitud de la corriente (Fig. 9E), las alteraciones en la cinética de activación son mínimas (Fig. 9F). Viceversa, los *prepulsos* tienen efectos sobre la cinética de activación de la corriente (Fig. 11F) a potenciales en los que recluta poca corriente adicional (Fig. 11E). Esto, que se desprende del análisis de corrientes con un nivel bajo de activación de PG, debería probar ser cierto en condiciones en las que se registre un nivel más elevado de inhibición basal.

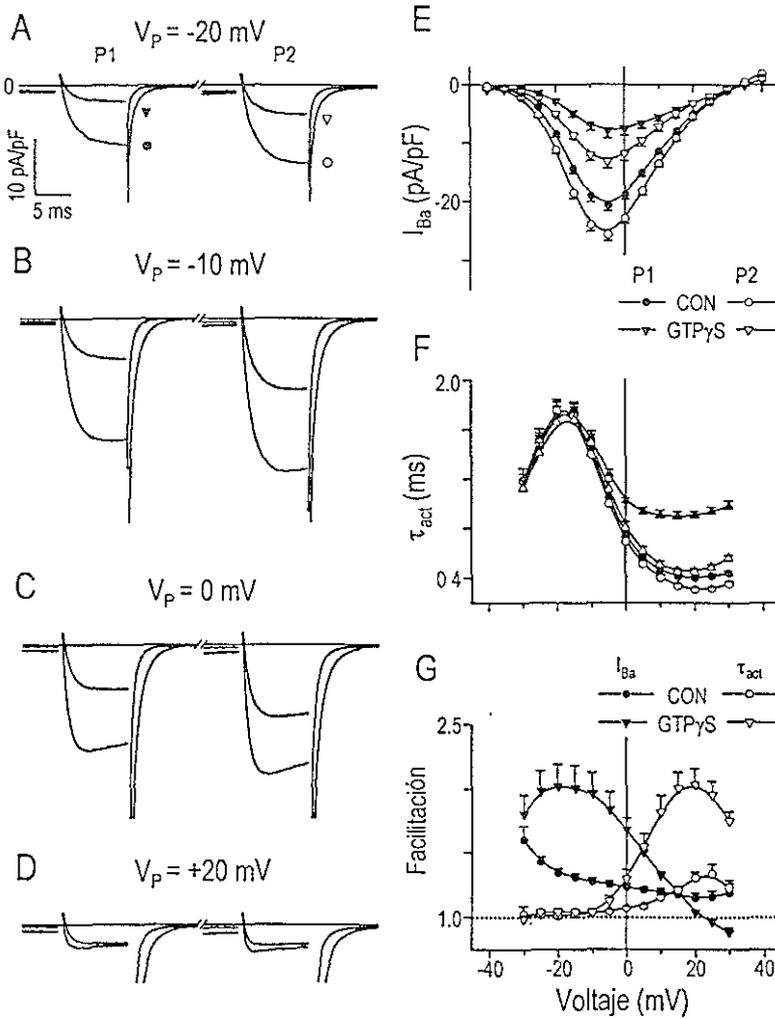


Fig. 11A-G Efectos del aumento en el nivel de inhibición tónica, inducida por GTP γ S, en la relación corriente-voltaje y en la cinética de activación de corrientes totales de CCDV_N. A-D I_{Ba} evocada por pulsos a los voltajes indicados en cada gráfica (V_p), utilizando el protocolo de fijación de voltaje ilustrado en la Fig. 9G. Los trazos de I_{Ba} superpuestos representan el promedio de I_{Ba} de neuronas control (mismas neuronas de la Fig. 9) y neuronas dializadas con GTP γ S ($n = 12$). La misma barra de calibración aplica para A-D. E Relación I-V para las neuronas de A-D durante P1 y P2. F Constante de tiempo (τ_{act}) de un decaimiento exponencial simple ajustado a la fase de activación de la corriente según lo descrito para la Fig. 9F. G Relación de facilitación de la corriente (P2/P1) y de facilitación en la cinética de activación (P1/P2) versus voltaje

El grado de inhibición tónica de las corrientes puede ser experimentalmente incrementado por sustitución del GTP en la solución interna por su análogo no hidrolizable, GTP γ S (Ikeda, 1991; Swartz, 1993; Yang y Tsien, 1993). En estas condiciones, la densidad de corriente que se registra es notablemente inferior a la que se registra en condiciones control (Fig. 11A-D) y muestra una dependencia del voltaje ligeramente corrida hacia potenciales despolarizantes (Fig. 11E), que se traduce en un grado de inhibición claramente dependiente de voltaje (Fig. 11E).

Nótese que el fenómeno va aparejado de un incremento en la sensibilidad frente a *prepulsos* (Figs. 11A-D), que aumentan al doble la amplitud de la corriente registrada a potenciales negativos (Fig. 11G) y corren en sentido hiperpolarizante la dependencia de voltaje de su activación (Fig. 11E). Estos efectos son típicos de la inhibición VD y son análogos, pero magnificados, a los que se observan en presencia de GTP.

Ahora, obsérvese la dependencia de voltaje que guardan las alteraciones en la cinética de activación de la corriente (Fig. 11F). Para ser posible la comparación con los resultados de la Fig. 9F, el curso temporal de la fase de activación de la corriente en presencia de GTP γ S ha sido ajustado a un decaimiento exponencial simple. Debe hacerse notar que esta aproximación no pretende ser estrictamente cuantitativa, pues, como se detallará más adelante, una descripción de este tipo requiere de un decaimiento biexponencial (Fig. 24). Sin embargo, funciona adecuadamente para hacer una descripción cualitativa del *entlentecimiento cinético* que induce la activación de PG en el curso de los primeros milisegundos. Nótese en la Fig. 11F que los principales efectos que induce el GTP γ S sobre el comportamiento de τ_{act} se encuentran básicamente restringidos al rango de potenciales positivos al que induce corriente entrante máxima (Fig. 11E), y que los *prepulsos* revierten este efecto casi por completo (Fig. 11F).

Una posible explicación de la marcada separación en la dependencia del voltaje que tiene el efecto de los *prepulsos* sobre la amplitud de la corriente *versus* aquéllos que inducen sobre la cinética de activación de la misma (Fig. 11G) será expuesta en la Discusión. Por ahora, estos resultados permiten reforzar la observación de la Fig. 9F: queda claro que, si un gran aumento en la magnitud de la inhibición tónica (Fig. 11E) se traduce en cambios marginales en la cinética de activación de la corriente a potenciales más negativos que aquellos que inducen corriente entrante máxima (Fig. 11F), entonces la marcada reducción en τ_{act} que induce el PMA, en este rango de potenciales (Fig. 9F), no puede explicarse por remoción del moderado nivel de inhibición tónica registrado en el control (Fig. 9E).

8.5.3. Efectos del PMA y el GDP β S en el Comportamiento Poblacional de los CCDV_N

Los resultados anteriores sugieren que el PMA puede inducir algunos cambios en la cinética de las corrientes que no son explicables por la remoción de inhibición tónica. Sin embargo, no permiten inferir gran cosa sobre la naturaleza que subyace al aumento de la corriente. En última

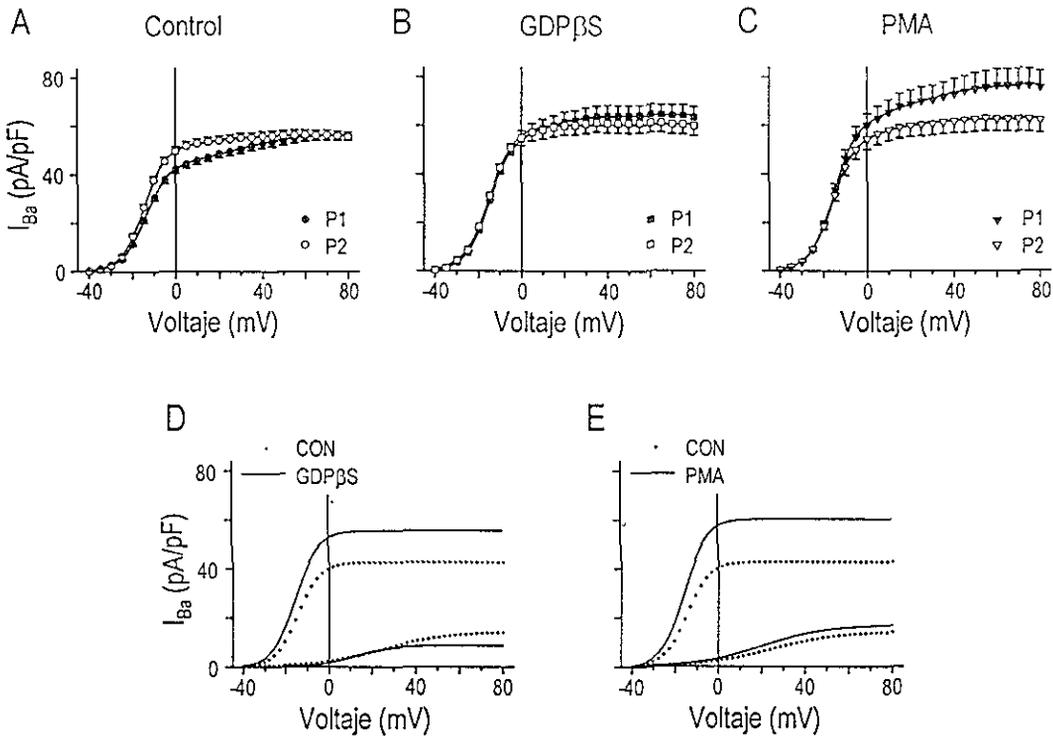


Fig. 12A-E Efectos del PMA y del GDP β S en las curvas de activación de corrientes de CCDV $_N$. A-C Relación del promedio de I_{Ba} de cola versus voltaje para las neuronas de la Fig. 9. La densidad de corriente de cola fue determinada como la densidad de corriente promedio en un período de 100 μ s iniciados 400 μ s después del fin del pulso de prueba durante la repolarización parcial a -40 mV (protocolo en la Fig. 9G). Las líneas suaves que conectan los puntos representan el mejor ajuste a la suma de dos funciones de Boltzmann (ver texto). D-E Gráfica de los componentes individuales de cada ajuste de Boltzmann para los datos de P1 (parámetros en la Tabla 1)

instancia, bien podrían ser cambios adicionales a la remoción de dicha inhibición. En particular, dos de las observaciones hasta ahora presentadas han sido tomadas previamente (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994) como razón suficiente para sustentar la idea de que la inhibición tónica de CCDV $_N$ sea removida como consecuencia de la activación de la PKC: (1) La ausencia de facilitación basal (Fig. 10B); (2) La dependencia de voltaje del aumento en la amplitud de las corrientes (Fig. 10A). Sin embargo, también ha sido sugerido que un aumento en la cinética de inactivación, como aquel observado tras el PMA (Fig. 8C y Fig. 9 A-D), puede oscurecer en algunos casos los efectos de los *prepulsos* de manera que no puedan ser tomados ya como un índice de la actividad de PG (Elmslie et al., 1993).

Lo anterior sugiere la necesidad de buscar más evidencias sobre la presencia o no de inhibición tónica antes de inferir sobre la posible dependencia de ésta de los efectos observados en neuronas pretratadas con PMA

El efecto de la inhibición dependiente de voltaje, mediada por PG sobre las curvas de activación de la corriente ha sido extensamente documentado (Bean, 1989b; Ikeda, 1991). Por lo tanto, se buscaron evidencias de la remoción de la inhibición tónica analizando las corrientes de cola registradas a un potencial de -40 mV, tras el regreso de un pulso de prueba de amplitud variable (protocolo en Fig. 9G). Esta repolarización parcial no tiene otro objetivo que el de *enlentecer* la cinética de desactivación de la corriente y disminuir la amplitud de la misma, con la finalidad de evitar las oscilaciones en la fijación que suelen inducir las enormes corrientes de cola que se producen tras una repolarización total al potencial de mantenimiento utilizado (-80 mV).

La relación entre las amplitudes promedio de las corrientes de cola y el potencial del pulso de prueba, para las neuronas de la Fig. 9, se encuentra ilustrada en las Figs. 12A-C. En acuerdo con la descripción de Ikeda (Ikeda, 1991), la inhibición tónica en el control dio como resultado curvas de activación asimétricas alrededor del punto medio de activación máxima (Fig. 12A; círculos cerrados) que se ajustan pobremente a una función sigmoidal simple. Sin embargo, las curvas de activación son descritas particularmente bien por la suma de dos funciones de Boltzmann (las curvas suaves muestran el ajuste), como ha sido extensamente documentado en trabajos previos (Bean, 1989b; Ikeda, 1991; Zhu e Ikeda, 1994):

$$I(V) = \frac{I_1}{1 + e^{(V_{h1}-V)/k_1}} + \frac{I_2}{1 + e^{(V_{h2}-V)/k_2}}$$

donde $I(V)$ es la densidad de corriente de cola como función del potencial de prueba V . Para cada componente, I , V_h y k son la amplitud, potencial de activación media y factor de pendiente, respectivamente (ver Tabla 1).

En términos del modelo *willing-reluctant*, el componente de voltaje de Boltzmann con V_h más negativo (primero) y aquel con V_h más positivo (segundo) corresponden a la activación de grupos de canales no modulados e inhibidos por PG, respectivamente. Acorde a esta interpretación, la amplitud fraccional del segundo componente en condiciones control sugiere que ~24% de la corriente máxima de $CCDV_N$ se encuentra bajo inhibición tónica (ver Tabla 1). Los *prepulsos* afectan la amplitud relativa de ambos componentes de Boltzmann, pero no los parámetros de pendiente, punto medio de activación o corriente máxima reclutable tras despolarizaciones extremas (esto es, $I_1 + I_2$; ver Tabla 1). De esta manera, el que la amplitud

		I_1 (pA/pF)	I_2 (pA/pF)	V_{h1} (mV)	V_{h2} (mV)	k_1 (mV)	k_2 (mV)
Control	(P1)	42.6	14.3	-14.3	24.8	5.2	15.4
Control	(P2)	51.9	4.4	-15.1	17.7	4.4	10.0
GDP β S	(P1)	55.5	8.7	-15.5	12.4	5.3	8.5
GDP β S	(P2)	60.4	-	-15.1	-	5.9	-
PMA	(P1)	60.2	16.9	-15.6	20.6	5.2	14.8
PMA	(P2)	54.4	8.6	-16.2	12.5	5.3	13.2

Tabla 1 Parámetros derivados del ajuste a la suma de dos funciones de Boltzmann (ver ecuación en el texto) de las relaciones de corriente de cola promedio *versus* voltaje de los datos presentados en la Fig. 12A-C.

fraccional del primer componente se incrementa a >92% en condiciones control tras los *prepulsos*, es interpretado como el resultado de la reordenación *reluctant* \rightarrow *willing* dependiente de voltaje (Bean, 1989b; Elmslie et al., 1990; Ikeda, 1991).

El modelo anterior queda apoyado por los efectos que induce el GDP β S (Fig. 12B). En presencia de éste, el componente atribuido a la inhibición tónica es reducido a menos del 15% de la amplitud fraccional máxima, y los *prepulsos* inducen prácticamente su eliminación (Tabla 1). De hecho, después de los *prepulsos*, la curva de activación de las corrientes de cola con GDP β S es prácticamente simétrica y, por tanto, describible por una función de Boltzmann simple (Fig. 12B; cuadros abiertos). Por tanto, la liberación de inhibición tónica por *prepulsos* (Fig. 12A; círculos abiertos) o por GDP β S (Fig. 12B) está característicamente tipificada por una “simetrización” en las curvas de activación (Ikeda, 1991), lo cual es consistente con la noción de la activación de una población más homogénea de canales mayoritariamente no modulados.

A partir de los datos de la Tabla 1 es posible descomponer la función doble de Boltzmann, que describe el comportamiento global de la corriente, en cada uno de sus componentes, lo cual permite visualizar los procesos antes descritos. La gráfica de cada componente aislado (Fig. 12D) muestra que el incremento en la amplitud en el primer componente causado por el GDP β S está asociado con un decremento en el segundo componente. Un escenario similar puede explicar los efectos de los *prepulsos* (Fig. 20). La amplitud de la corriente aumentada a potenciales de prueba

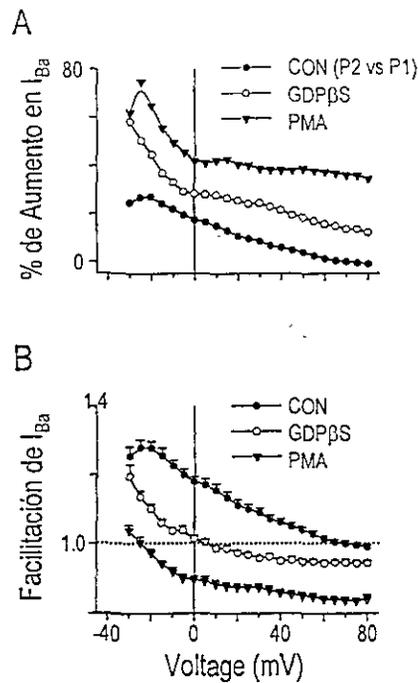


Fig. 13A-B Aumento dependiente de potencial y eliminación de la facilitación basal en corrientes de cola inducidos por PMA y por GDPβS. A Porcentaje de aumento de la corriente calculado a partir de los valores promedios ilustrados en la Fig. 12. B Índice de facilitación basal (P2/P1). Mismas neuronas de la Fig. 9.

medianamente despolarizantes después del GDPβS (Figs. 9E y 10A) o de los *prepulsos* (Fig. 11E y 10A) puede por tanto ser explicada por cambios en la amplitud fraccional de la corriente de los dos componentes de Boltzmann (Ikeda, 1991).

La densidad de las corrientes de cola registradas en neuronas pretratadas con PMA es significativamente mayor que aquellas registradas en el control en la mayor parte del rango de voltaje analizado (Fig. 12C). Si el PMA incrementa la amplitud de las corrientes mediante la remoción de inhibición tónica, sería esperable encontrar efectos similares al de los *prepulsos* o el GDPβS sobre las curvas de activación de la corriente, sobre todo, en vista de la dependencia de voltaje que guarda dicho incremento a potenciales medianamente despolarizantes (Fig. 13A). Sorprendentemente, las curvas de activación de las corrientes de cola probaron ser tan asimétricas alrededor del punto medio de activación máxima como aquellas del control. El ajuste a una Boltzmann doble muestra que el voltaje de activación medio y la pendiente de cada componente no están sustancialmente alterados respecto del control (Tabla 1).

De manera similar a los *prepulsos* o al GDP β S, el PMA induce un marcado incremento en la amplitud del primer componente. Sin embargo, este incremento no se encuentra correlacionado con un decremento en la amplitud del segundo. Al contrario, la amplitud de dicho componente es inesperadamente similar a aquél que se registra en condiciones control (Fig. 12E). Así, a pesar de que la magnitud del aumento en el primer componente es similar a aquél visto tras los *prepulsos* en neuronas dializadas con GDP β S, es notorio que la amplitud relativa de cada componente (aproximadamente 78 y 22%, respectivamente) no se encuentra significativamente alterada con respecto del control. En consecuencia, el incremento inducido por PMA en la amplitud de las corrientes de CCDV_N no puede ser explicado por cambios en la amplitud relativa de cada componente de Boltzmann como en el caso de los *prepulsos* y del GDP β S.

Según lo anterior, el hecho de que el aumento inducido por PMA guarde cierta dependencia de voltaje a potenciales moderadamente despolarizantes (Fig. 13A) indica que la amplitud absoluta de la corriente acarreada por canales no modulados se incrementa, pero no implica necesariamente que lo hace a expensas de una reducción en la población modulada como ha sido interpretado en un trabajo anterior (Zhu e Ikeda, 1994). Por otra parte, el hecho de que al menos parte del aumento responda a un fenómeno que no involucre interconversión *reluctant* \rightarrow *willing* de canales es la única manera de explicar la meseta de incremento independiente de potencial que sistemáticamente se ha reportado que induce el PMA en éstas células y que puede variar en importancia entre menos del 10% y hasta un 40% (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994).

8.5.4. Efectos del PMA en Células Dializadas con GDP β S

El segundo componente de Boltzmann en las curvas de activación registradas en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 12E) podría indicar la presencia de canales tónicamente inhibidos en estas condiciones. Esto llevaría a pensar que ni el incremento en la amplitud ni las alteraciones en las cinéticas inducidas por PMA se encuentran relacionadas con la remoción de dicha inhibición. Aceptando lo anterior, ambos efectos deberían ser independientes sobre la población no modulada y deberían persistir, por tanto, en condiciones en las que la inhibición tónica haya sido previamente removida.

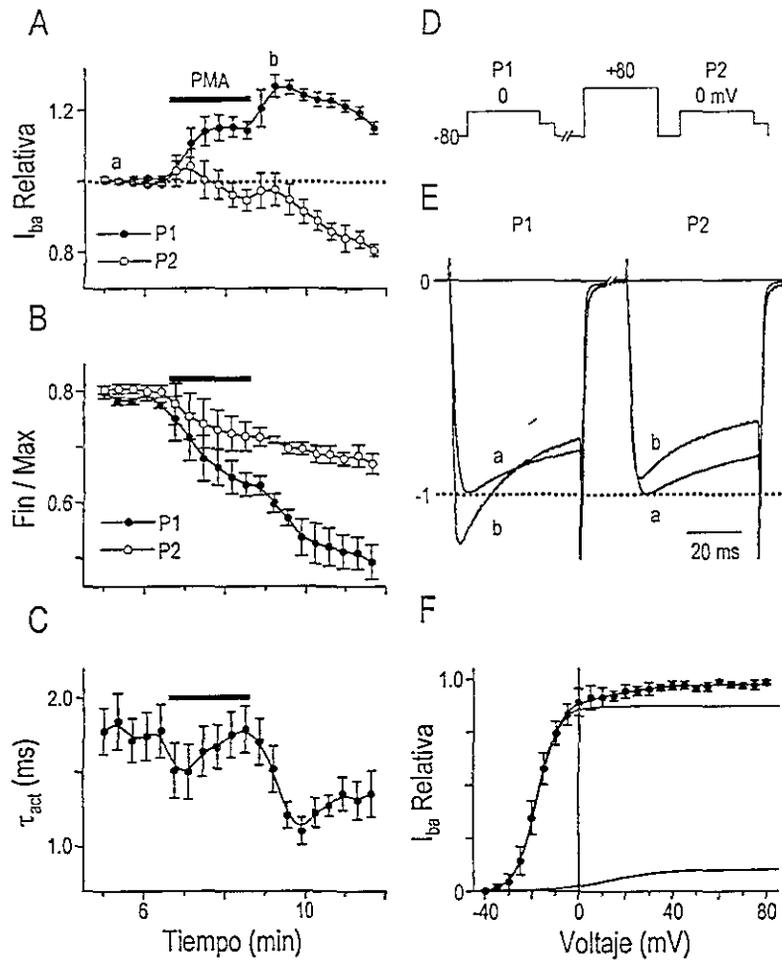


Fig. 14A-F Efectos del PMA sobre las corrientes de $CCDV_N$ en células dializadas con $GDP\beta S$. A Curso temporal de las acciones del PMA sobre la corriente máxima registrada durante un pulso de prueba de 50 ms, en neuronas dializadas con $GDP\beta S$ ($n = 6$). El protocolo de fijación de voltaje ilustrado (D), aplicado con una frecuencia de 0.05 Htz, fue similar al de la Fig. 9G, excepto que P1 y P2 fueron de 50 ms cada uno. El PMA (500 nM) fue disuelto en la solución externa y directamente aplicado en la neurona estudiada en los tiempos indicados por la barra sólida. La amplitud de corriente se presenta normalizada al valor de corriente máxima obtenida antes de la aplicación del PMA. B Fracción de la corriente máxima (Max) que permanece al final de la despolarización de 50 ms (Fin). C Constante de tiempo de la fase de activación de la corriente (τ_{act}) calculada según lo descrito para la Fig. 9F. E Trazos de corriente promedio registrados a los tiempos marcados en A. F Curvas de activación de la corriente para las mismas neuronas en A-C, registradas al final del experimento, utilizando un protocolo de fijación de voltaje similar al de la Fig. 9G, con la excepción de que un solo pulso (P1) fue aplicado. Los datos fueron normalizados a la amplitud de corriente registrada tras un pulso a +80 mV. La línea continua que une los puntos representa el mejor ajuste de una suma de dos funciones de Boltzmann. Las curvas agregadas representan la gráfica de cada uno de los componentes individuales de esta doble función (ver parámetros en el texto).

La Fig. 14 muestra que la conjetura anterior es cierta en un curso temporal. En ausencia de facilitación basal, eliminada por diálisis con $GDP\beta S$, la perfusión externa de PMA durante 2 minutos aumenta la amplitud de las corrientes y altera sus cinéticas.

En el curso de la aplicación de PMA, la amplitud de la corriente se incrementa rápidamente alcanzando un valor asintótico del $\sim 14\%$ de aumento tras aproximadamente un minuto (Fig. 14A). Este efecto está temporalmente correlacionado con un marcado cambio en la tasa de inactivación en estado estacionario. La corriente pasa de inactivar un 20% en el curso de 50 milisegundos a más del 34% (Fig. 14B) en presencia de PMA, y los *prepulsos* pasan de no tener prácticamente efecto alguno a causar un pronunciado decremento en la amplitud de la corriente subsecuentemente estimulada (Fig. 14A).

Resulta notorio que estos efectos no solamente persistan tras el cese de la perfusión con PMA, sino que se vuelven aún más prominentes tras el regreso a la solución externa normal (Fig. 14E). La amplitud de la corriente se incrementa en un 8% adicional para alcanzar un 25% de aumento respecto de su valor inicial (Fig. 14A) y la magnitud de la inactivación se incrementa a más del $>40\%$ (Fig. 14B). Aún más llamativo es el hecho de que las alteraciones en la constante de activación de la corriente (τ_{act}) no sean estadísticamente significativas sino hasta el cese de la perfusión con PMA (Fig. 14C). Durante la exposición a éste, τ_{act} es reducida de 1.82 ± 0.38 ms a 1.74 ± 0.35 ms ($P > 0.05$) mientras que tras el fin de ésta, se reduce hasta 1.28 ± 0.25 ms ($P < 0.001$).

Las observaciones anteriores están posiblemente correlacionadas con un efecto inhibitorio de los ésteres de forbol sobre $CCDV_N$, no ligado a la activación de la PKC, cuando se encuentran presentes en el espacio extracelular (Hockberger et al., 1989). A pesar de que la K_i reportada para el efecto sobre la amplitud de la corriente ronda en el rango micromolar, los resultados presentados indican que algunos efectos pueden persistir incluso a las bajas concentraciones (500 nM) utilizadas en la solución de registro. Este efecto no fue investigado a fondo pero sirve para sustentar la conveniencia del uso de procedimientos con preincubaciones.

Finalmente, las curvas de activación de la corriente obtenidas al final del experimento (Fig. 14F) muestran una dependencia del voltaje claramente más simétrica alrededor del punto medio de activación máxima que aquellas registradas en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 12C). El ajuste a una suma de dos funciones de Boltzmann muestra que los valores del voltaje de activación media máxima (-17.7 mV y 12.1 mV, para V_{h1} y V_{h2} , respectivamente) y la pendiente (4.5 y 12.3 mV, para k_1 y k_2 , respectivamente) de cada componente son similares a aquéllos descritos en la Tabla 1 para neuronas pretratadas con PMA. Sin embargo, la amplitud porcentual

del segundo componenté se encuentra reducida a menos del 10% de la corriente máxima (Fig. 14F). Esto significa una reducción del 50% con respecto a la amplitud fraccional del segundo componente en neuronas pretratadas (Fig. 12E).

El conjunto de resultados anteriores muestra que la remoción de la inhibición tónica por el GDPβS no ocluye los efectos del PMA, y que, por tanto, ambos tratamientos no son equivalentes. De hecho, la observación siguiente no es concluyente pero sí fuertemente sugestiva de que la inhibición tónica se encuentra presente en neuronas tratadas con PMA antes del registro y ausente en aquéllas previamente dializadas con GDPβS: la facilitación “negativa” (esto es < 1.0 ; Zhu e Ikeda, 1994) registrada en este último experimento (0.75 ± 0.07 ; media \pm desviación estándar; Fig. 14E) es significativamente superior ($P \approx 0.01$) a la registrada en los experimentos con neuronas tratadas antes del registro, de las Figs. 8 y 9 (0.90 ± 0.06). Un resultado de este tipo sería esperable si, en estas últimas, parte de la inactivación inducida por *prepulsos* es compensada por una facilitación (“positiva”) de la población tónicamente inhibida. Esto podría indicar que, efectivamente, la acelerada tasa de inactivación de la corriente tras el PMA podría oscurecer un fenómeno de facilitación aún subyacente, como ha sido sugerido por el grupo de K. S. Elmslie (1993).

8.5.5. El Tratamiento con PMA Aumenta la Inactivación Dependiente de Voltaje

Repetidamente, se ha subrayado en párrafos anteriores el notorio efecto que induce el PMA sobre la cinética de inactivación de la corriente (Figs. 8, 9 y 14). Sin embargo, en la Fig. 1 se hizo notar que la liberación de inhibición tónica por *prepulsos* aumenta, también, el grado de inactivación que se registra durante un pulso de prueba. Esto se corresponde con los reportes de otros grupos, según los cuales tanto los *prepulsos* como el GDPβS pueden aumentar el grado de inactivación de la corriente (Ikeda, 1991; Swartz, 1993). Aunque nuestros registros durante pulsos de prueba breves (Fig. 8C, 9A-D y 14E) indican una inactivación aún más marcada tras el PMA, que podría estar asociada a la facilitación “negativa” causado por los *prepulsos* (Fig. 10B y 13B), el asunto merece consideración más profunda.

Los experimentos ilustrados en la Fig. 15 emplean una variación del protocolo de tres pulsos utilizado por Cox y Dunlap (Cox y Dunlap, 1994) para medir la inactivación de corrientes de

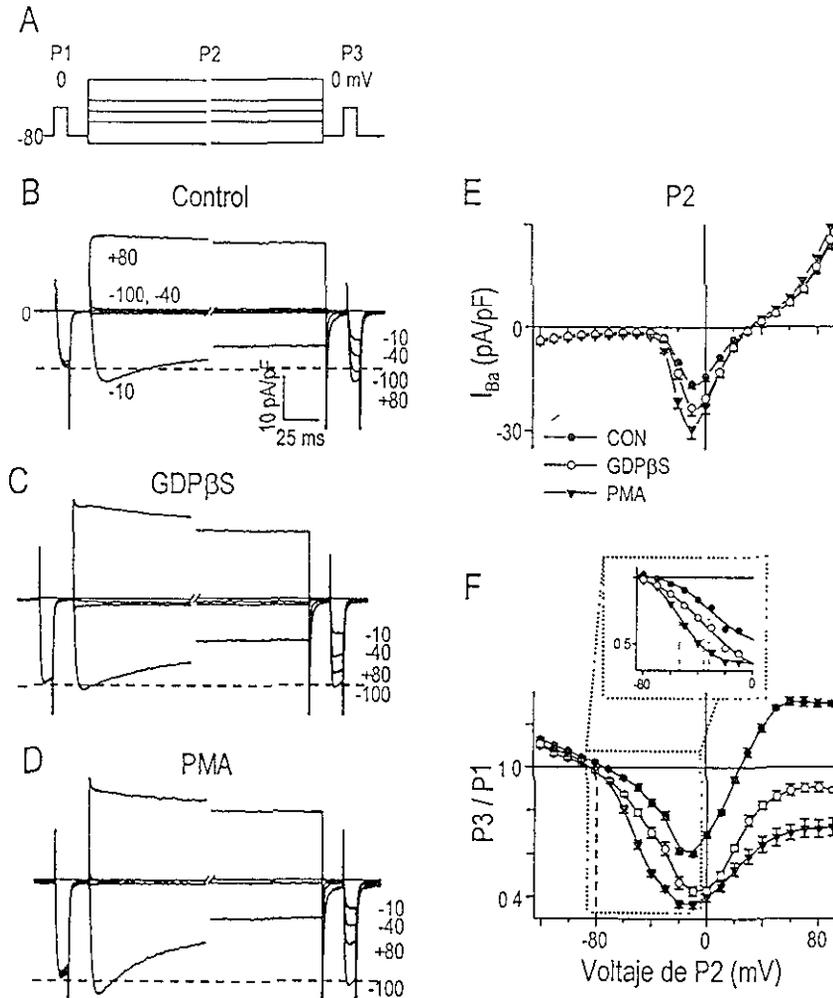


Fig. 15A-F Efectos del PMA y el GDP β S sobre la inactivación de estado estacionario de corrientes de CCDV $_N$. A Protocolo de voltaje. La densidad de I_{Ba} fue medida durante tres pulsos sucesivos de voltaje (P1, P2, P3) separados por intervalos de 15 ms. P1 y P3 fueron de 10 ms cada uno. P2 tuvo una duración de 500 ms y una amplitud variable. B-D Trazos superpuestos de la I_{Ba} promedio de neuronas control ($n = 6$), neuronas dializadas con GDP β S ($n = 12$), y neuronas pretratadas con PMA ($n = 13$), registradas con el protocolo de fijación de voltaje ilustrado en A, con los valores de potencial de P2 que se indican en B. Los mismos valores se aplican para C-D. Los números que se encuentran a la derecha de los trazos de P3, se refieren al valor de potencial de P2. La misma barra de calibración de B, aplica para C y D. Todos los trazos de corriente fueron escalados al valor de la máxima amplitud registrados en P1. E Curva I-V para la corriente pico registrada en P2. F Relación de corriente pico en P3/P1 como función del potencial de P2. La escala de voltaje de P2 en F, aplica a E. El inserto, muestra el ajuste de los valores promedio registrados en un rango de potenciales de P2, de -80 a -10 mV a una función simple de Boltzmann. Las líneas punteadas muestran el punto medio de inflexión de la curva

CCDV $_N$ en estado estacionario del voltaje, en DRGs de pollos. El protocolo de voltaje (Fig. 15A) consiste en dos pulsos de prueba idénticos de 10 ms a 0 mV dados antes y después de un pulso condicionante de 500 ms. La amplitud de la corriente durante el último pulso de prueba (P3) es utilizada como un indicador de la cantidad de inactivación producida por el pulso

condicionante (P2). La corriente durante el primer pulso de prueba (P1) es empleada como un indicador de la corriente evocable antes de cada corrida del protocolo, que sirve como para corregir las relaciones entre la corriente durante P3 y el potencial de P2 del *rundown* de la corriente y de un componente de la inactivación que se recupera lentamente, si es que algo, dentro de los 10 s de intervalo entre corridas.

La relación entre el potencial de P2 y la amplitud máxima de la corriente evocada por P3 dividida entre aquella evocada por P1 guarda la compleja dependencia de voltaje descrita para $CCDV_N$ en neuronas simpáticas del sapo (Jones y Marks, 1989b; Werz et al., 1993), en DRGs del pollo (Cox y Dunlap, 1994) y en células HEK293 transfectadas (Patil et al., 1998). El que la inactivación sea máxima alrededor del punto de corriente máxima en P2 (Fig. 15E) y que decrezca tanto a potenciales más negativos como más positivos hace que adquiera una característica forma de U (Fig. 15F; Cox y Dunlap, 1994; Patil et al., 1998).

Este tipo de comportamiento de la inactivación que sigue, *grasso modo*, el comportamiento de la corriente durante el potencial de mantenimiento (P2), sugiere que la inactivación es dependiente de corriente (Cox y Dunlap, 1994). Sin embargo, se ha demostrado que el mismo comportamiento puede ser derivado de un modelo cinético de inactivación estrictamente dependiente de potencial (Jones y Marks, 1989b; Patil et al., 1998), en el que la tasa más alta de inactivación se encuentre acoplada, preferentemente, a los estados cerrados del canal más próximos al estado abierto (Patil et al., 1998; Jones et al., 1999; ver apartado 9.5 de la Discusión). Este modelo no sólo explica que el grado de inactivación de la corriente sea menor conforme se alcancen potenciales en los que los canales se encuentran predominantemente abiertos (Fig. 15F), sino también, y es este uno de los puntos en los que encuentra mayor sustento, el que se presente inactivación apreciable (Fig. 15F) a potenciales del *prepulso* por debajo del umbral de activación de la corriente (Fig. 15E; ver Fig. 15B, potencial de P2 de -40 mV). Por otra parte, es poco probable que un modelo estrictamente dependiente de corriente (ó de “uso”) pueda ajustarse a los resultados aquí presentados, puesto que uno de los pilares de los modelos de inactivación de este tipo es su enorme sensibilidad frente a distintos cationes acarreadores de la corriente (Eckert y Chad, 1984), que implicaría una ausencia de inactivación en las corrientes de Ba^{2+} aquí estudiadas.

Las corrientes registradas en todas las condiciones inactivan de manera parcial en el curso de los 500 ms del *prepulso*. La inactivación de corrientes control alcanza valores máximos de

aproximadamente 41% tras despolarizaciones de P2 a -10 mV (Fig. 15F). Casi la mitad de este valor (18%) se alcanza con despolarizaciones de P2 a -40 mV que no producen corriente apreciable en P2 (Fig. 15E), apoyando un modelo de inactivación preferentemente voltaje dependiente para $CCDV_N$. Despolarizaciones superiores a los +30 mV facilitan las corrientes control, alcanzando una asíntota de ~27% de incremento a potenciales por encima de +50 mV (Fig. 15F). Esta facilitación muestra la misma dependencia de la inhibición tónica, puesto que se encuentra ausente en presencia de GDP β S (Fig. 15C).

Tras la diálisis con GDP β S, la corriente muestra cierta recuperación con despolarizaciones crecientes pero esta recuperación es incompleta, alcanzando una asíntota de inactivación de corriente de ~10% con *prepulsos* por encima de +60 mV (Fig. 15F). Este no es el único efecto inducido por el GDP β S. La inactivación máxima es incrementada a más del 57%, y la inactivación a potenciales más negativos que aquellos que inducen inactivación máxima es significativamente aumentada (Fig. 15F). Sin embargo, este incremento en la magnitud de la inactivación de la corriente no involucra ningún desplazamiento significativo en la dependencia de voltaje de la inactivación de la corriente ya que la inactivación media máxima (~30%) es alcanzada al mismo potencial que en el control (-40 mV). El ~24% de inhibición tónica en nuestras condiciones de registro (a partir de la Tabla 1) tiene por lo tanto dos efectos principales en la curva de inactivación: una reducción de ~28% en la inactivación máxima, y una sobre-recuperación de ~27% a potenciales positivos a +30 mV (Fig. 15F).

El patrón de inactivación tras el pretratamiento con PMA muestra tres efectos principales sobre el patrón control (Fig. 15F). Primero, la inactivación máxima alcanza valores cercanos al 60%. Esto representa un aumento del 50% respecto del control y es también significativamente mayor que tras la diálisis con GDP β S ($P < 0.05$). Segundo, el ajuste a una Boltzmann simple de la curva de inactivación a potenciales negativos (entre -80 y -10 mV; inserto de la Fig. 15F) muestra un punto medio de -53 mV para las neuronas tratadas con PMA, que contrasta con los valores de -31 y -36 mV para el control y GDP β S, respectivamente (líneas punteadas en el inserto de la Fig. 15F). El promedio de los valores derivados de un ajuste similar, llevado a cabo en cada una de las curvas de inactivación de todas las neuronas de cada grupo, es de -33.2 ± 2.8 ($n = 6$), -37.3 ± 1.9 ($n = 12$) y -53.2 ± 1.4 ($n = 13$), para las neuronas control, dializadas con GDP β S y tratadas con PMA, respectivamente. Los valores de los dos primeros grupos son

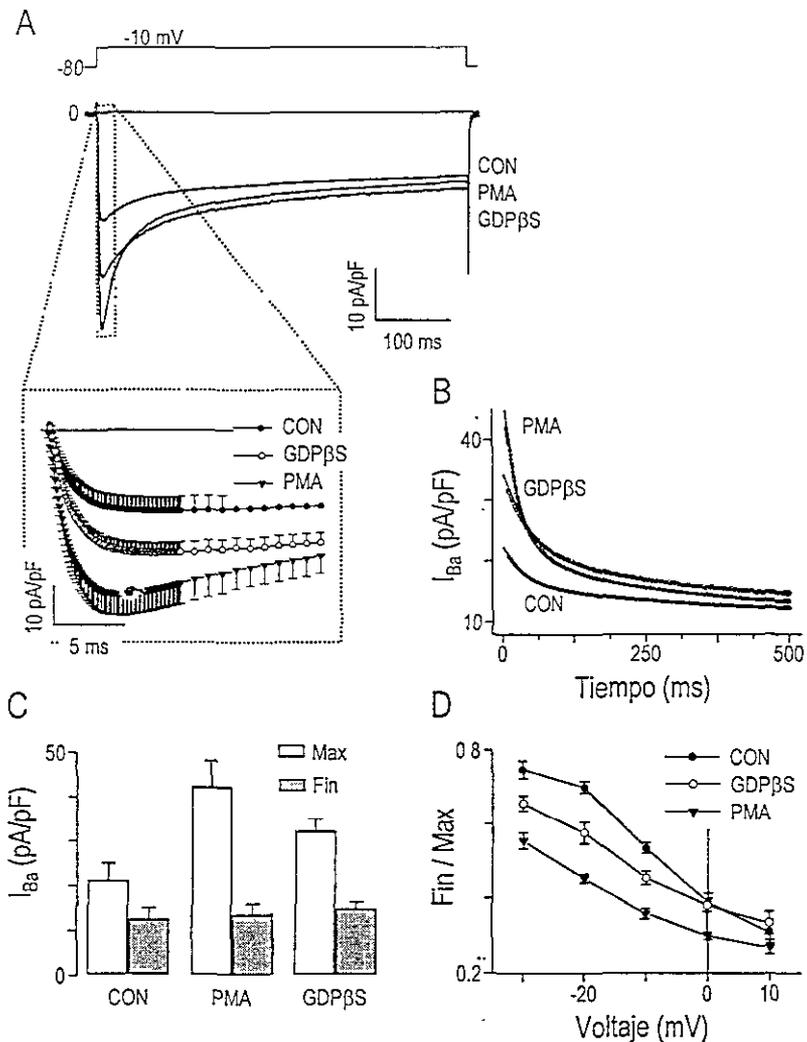


Fig. 16A-D Efectos del PMA y GDP β S en la inactivación de la corriente de CCDV_N en estado estacionario del voltaje. A Superposición de los trazos de I_{Ba} promedio de las neuronas control dializadas con GDP β S y pretratadas con PMA de la Fig. 15, registradas durante despolarizaciones de P2 a -10 mV. El inserto muestra los primeros 20 ms de los trazos de la corriente junto con las barras de error. B Curso temporal del decaimiento de la corriente. Las líneas continuas muestran una función doble exponencial (más un componente no inactivante) trazadas a partir de los datos de la Tabla 2). C Promedio de corriente máxima (Max) y de corriente registrada durante el último milisegundo de las despolarizaciones de 500 ms (Fin). D Relación Max/Fin como una función del potencial de P2 que en la Fig. 15E genera corriente entrante.

extremadamente similares ($P > 0.27$), mientras que aquéllos derivados de neuronas tratadas con PMA son significativamente diferentes de ambos ($P < 0.0004$). Por tanto, el PMA induce un corrimiento de -20 mV en la dependencia de voltaje de la inactivación. Este desplazamiento no se correlaciona con corrimientos en la curva de activación y, por tanto, no puede ser explicado en estos términos (Fig. 15E). En consecuencia, este resultado apunta a un aumento en la tasa de

inactivación de estado cerrado tras el PMA. Tercero, la recuperación de la curva de inactivación por *prepulsos* está fuertemente reducida a potenciales positivos, dando como resultado un $\sim 25\%$ de decremento en la asíntota de la curva de inactivación a potenciales positivos a $+50$ mV (Fig. 15F). Esto puede explicarse de dos maneras: (1) Como un incremento en la tasa de inactivación acoplada al estado abierto; ó (2) Que, tras el PMA, los canales inactivan desde el último estado cerrado, cuya transición con el estado abierto es independiente de voltaje y por lo tanto puede ser alcanzado desde un estado estacionario del voltaje (ver Apéndice I.1.4).

Tanto el GDP β S como el PMA aumentan la inactivación durante el pulso de prueba en el transcurso de despolarizaciones de 500 ms (Fig. 16). Sin embargo, dos diferencias principales apuntan a que sus efectos no son ni cuantitativa ni cualitativamente similares. Primero, la fracción de corriente máxima que permanece al final de la despolarización de 500 ms es fuertemente reducida por el PMA (relación Fin/Max en la Fig. 16D). Segundo, el PMA acelera marcadamente la cinética de la inactivación (Fig. 16A).

El curso temporal de la inactivación tras despolarizaciones al pico de corriente entrante se ajustó adecuadamente a la suma de dos exponenciales, más un componente no inactivante en esta escala de tiempo (500 ms; Fig. 16B). El aumento en la inactivación durante el pulso con GDP β S involucra principalmente cambios en la amplitud relativa de los componentes de la inactivación, con cambios menores en la segunda constante de tiempo (Tabla 2). En contraste, el PMA no sólo induce un cambio aún más marcado en la amplitud relativa de los componentes de la inactivación, sino que también induce un marcado decremento ($P < 0.05$ con respecto tanto al control como al GDP β S) en ambas constantes de tiempo (Tabla 2). El PMA por tanto induce cambios en la cantidad de inactivación durante el pulso, en su dependencia de voltaje (Fig. 15E y 16D), y en su curso temporal (Fig. 16B; Tabla 2).

La Fig. 16A resume las principales observaciones con respecto a la cinética de las corrientes durante el pulso. Primero, la corriente alcanza su valor máximo más rápido tras el pretratamiento con PMA. En el inserto de la Fig. 16A, el tiempo al pico a -10 mV es disminuido de 13 ± 3 ms en el control a 8 ± 2 ms tras el PMA, $P < 0.01$ (media \pm desviación estándar). Segundo, la amplitud de la corriente pico es aumentada por el PMA (Fig. 16C). Sin embargo, el decaimiento más rápido de la corriente durante la despolarización sostenida provoca que no haya diferencias

	Constantes de tiempo (ms)		Amplitudes (% de corriente total)		
	τ_1	τ_2	A_1	A_2	A_0
Control	33.8 ± 2.4	308.1 ± 33.5	17.6 ± 3.1	27.3 ± 3.1	55.1 ± 2.4
GDPβS	39.4 ± 2.7	252.3 ± 22.4	27.6 ± 4.1*	29.8 ± 2.3	42.6 ± 2.7*
PMA	23.9 ± 1.6**	202.5 ± 13.5*	45.5 ± 2.6**	23.3 ± 0.5	31.2 ± 2.7**

Tabla 2 Parámetros derivados del ajuste a la suma de dos funciones de exponenciales, mas un componente no inactivante (A_0) al curso temporal de la inactivación durante una despolarización a -10 mV. Neuronas de la Fig. 16. Los datos se presentan como media ± EE. Los valores marcados con * fueron significativamente diferentes del control ($P < 0.05$). Los valores de neuronas pretratadas con PMA marcados con ** fueron significativamente distintos tanto del control como de neuronas dializadas con GDPβS ($P < 0.05$).

al final de la despolarización de 500 milisegundos (Fig. 16C). Por lo tanto, como se sugirió anteriormente, el aumento en la amplitud de la corriente ejercido por el PMA es fuertemente dependiente de tiempo, de manera que la corriente reclutada, desde potenciales de mantenimiento razonablemente hiperpolarizantes (alrededor de -80 mV), se vea aumentada en amplitud en el curso de los primeros milisegundos (inserto en Fig. 16A), y que dicha diferencia inicial desaparezca a lo largo de despolarizaciones más grandes (Fig. 16B). El énfasis que se pone en la parte cinética de la corriente es intencional. A partir de la Fig. 15F puede inferirse que, a valores cercanos al potencial de reposo normal de la célula (entre -60 y -35 mV) pocos cambios en la amplitud de la corriente subsistirían mientras que las alteraciones cinéticas gobernarían el comportamiento de la corriente. Esta interpretación será tratada con mayor detalle en la Discusión.

8.5.6. Efectos Específicos del PMA en $CCDV_N$

Los resultados anteriores muestran claramente que el pretratamiento con PMA altera la cinética de los $CCDV$. La Fig. 17, por su parte, muestra que estos efectos son debidos a la modulación de $CCDV_N$ farmacológicamente caracterizados. Tanto en neuronas control (Fig. 17A) como en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 17B), el bloqueador específico de $CCDV_N$ ω -CgTx GVIA (10 μ M; ver Fig. 1) bloquea la mayor parte (>80 %) de la corriente a través de $CCDV$ en nuestras condiciones de registro (en presencia de 5 μ M de nifedipina). La amplitud del remanente de la corriente no cambia con el pretratamiento de PMA. Los efectos del PMA sobre

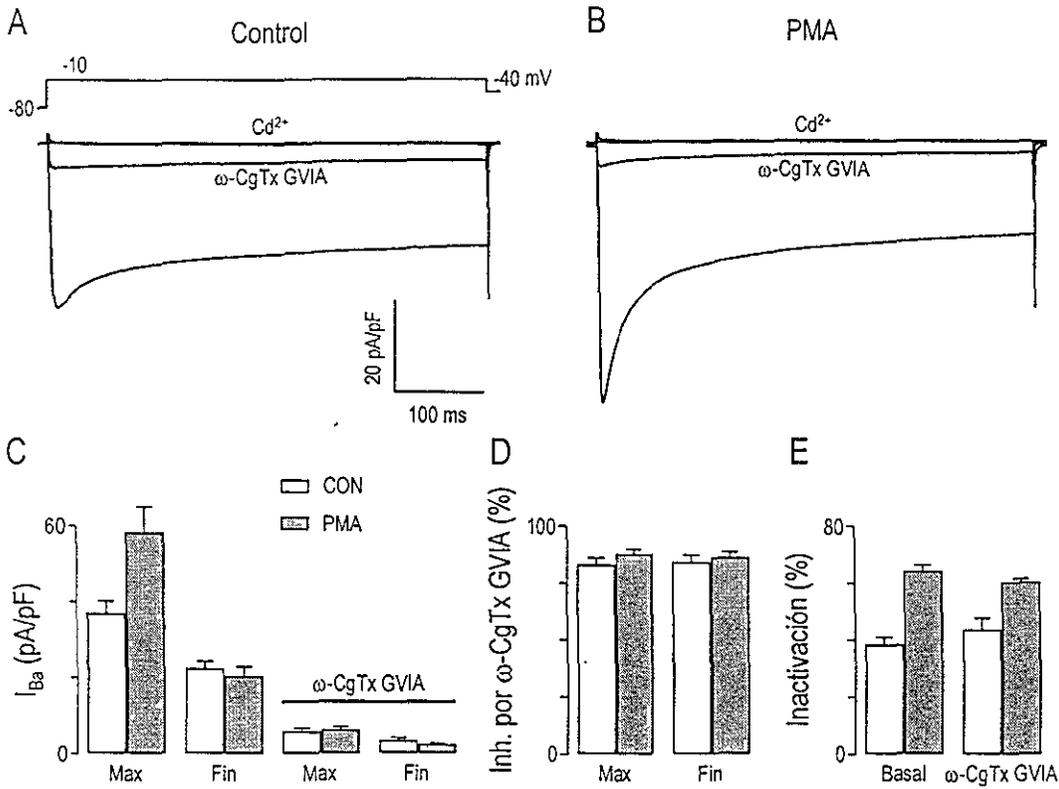


Fig. 17A-E La ω -CgTx GVIA bloquea la mayor parte de la corriente de CCDV. A-B Superposición de registros promedios de la I_{Ba} en condiciones control (A; $n = 7$) y en neuronas pretratadas con PMA (B; $n = 8$) registradas durante 500 ms de despolarización a -10 mV. Los trazos superiores muestran, respectivamente el bloqueo de la corriente por 10 μ M ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA) y 100 μ M de Cd^{2+} . C Promedio de corriente máxima (Max) y corriente media durante el último ms de la despolarización de 500 ms (Fin) en ausencia y presencia de ω -CgTx GVIA. D Porcentaje de corriente máxima y corriente final bloqueada por ω -CgTx GVIA. E Porcentaje de la corriente que inactiva durante los 500 ms de la despolarización.

la amplitud de la corriente pueden por tanto ser atribuidos a la modulación específica de $CCDV_N$.

De manera interesante, el remanente de la corriente después de la ω -CgTx GVIA en neuronas pretratadas con PMA muestra un aumento en la inactivación comparada con aquella que permanece en el control (Fig. 17E), sugiriendo que la corriente resistente a toxinas puede también ser modulada por el pretratamiento con PMA (Swartz et al., 1993; Zhu e Ikeda, 1994). Sin embargo, su contribución total a los efectos aquí reportados no supera al $\sim 15\%$ (Fig. 1).

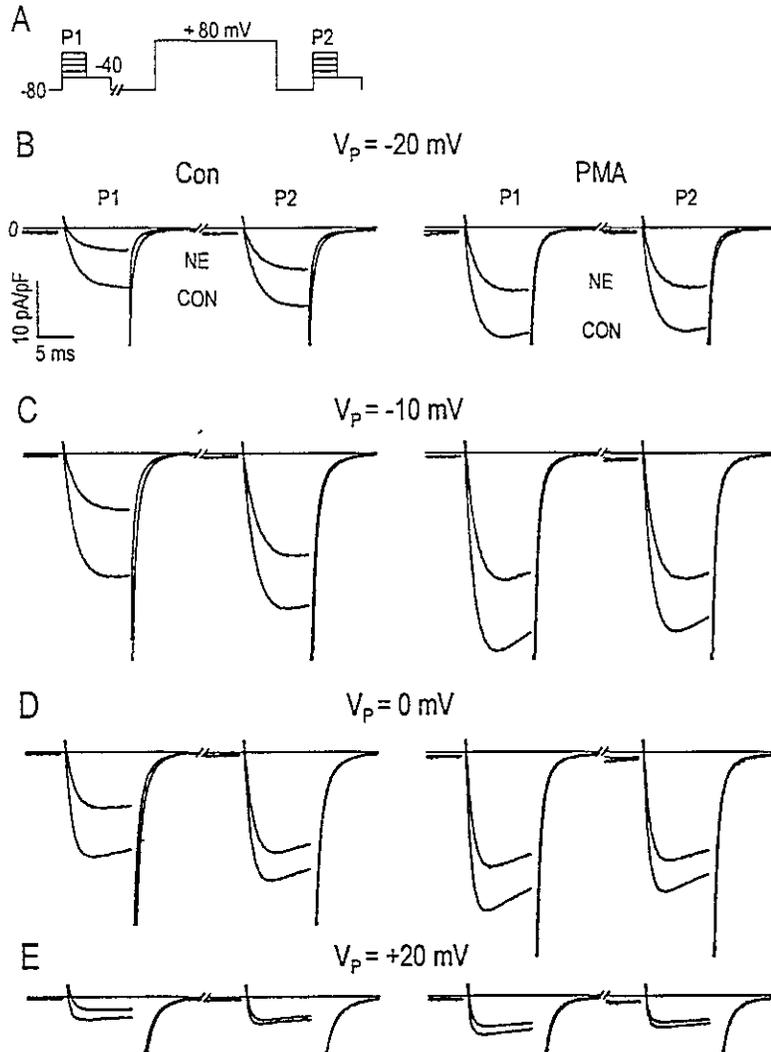


Fig. 18A-E Efecto de la NE en corrientes de estado estacionario de neuronas control y pretratadas con PMA. A Protocolo de fijación de voltaje idéntico al descrito en la Fig. 9G. B-E I_{Ba} evocada por pulsos cuadrados de voltajes a los potenciales indicados en cada gráfica (V_p), utilizando el protocolo de fijación de voltaje ilustrado en A. Los trazos de I_{Ba} superpuestos representan el promedio de I_{Ba} de neuronas control en ausencia ($n = 16$) ó presencia de $10\mu\text{M}$ de NE ($n = 14$) y de neuronas pretratadas con PMA en ausencia ($n = 17$) ó presencia de NE ($n = 9$). La misma barra de calibración aplica para A-D.

8.6. EFECTO DE LA NE EN NEURONAS CONTROL Y TRATADAS CON PMA

En la Fig. 8 se aprecia un cambio en el patrón inhibitorio de CCDV_N inducido por NE en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 8C), respecto de aquél que se presenta en el control (Fig. 8A). Esto es, la activación de la PKC interfiere parcialmente con la inhibición inducida por NE. La única hipótesis formal que se ha publicado para explicar un efecto de este tipo, sostiene que

este fenómeno refleja una interferencia selectiva de la PKC con las vías de inhibición que siguen rutas delimitadas a membrana, sin afectar aquéllas que involucran segundos mensajeros solubles (Shapiro et al., 1996). Esta no es explicación suficiente para los resultados aquí descritos: la inhibición inducida por NE sigue exclusivamente vías delimitadas a membrana (Delmas et al., 1998b, 1999). Por lo tanto, la interferencia entre ambas vías moduladoras ha de establecerse en otro nivel. La ausencia de alteraciones en la cinética de activación y de sensibilidad a los *prepulsos* de la corriente de $CCDV_N$ en presencia de NE, en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 8C), sugieren investigar la interferencia entre los efectos de ambos tratamientos en términos de un efecto diferencial sobre patrones inhibitorios VD y VI.

8.6.1. Efecto de la NE en la Amplitud y Curso Temporal de Corrientes en Estado Estacionario del Voltaje

Los trazos de la columna izquierda de la Fig. 18 muestran las típicas consecuencias que desencadena la inclusión de NE, y que, en términos generales, son cualitativamente similares a observadas tras la diálisis con GTP γ S en la Fig. 11. Esto es, una reducción pronunciada, pero incompleta, en la amplitud de la corriente que es más marcada para potenciales de prueba negativos (trazos de P1 en las Figs. 18B y C) que para potenciales positivos (Figs. 18D y E) alrededor del máximo de la I-V (Fig. 19A). Aquí también, puede observarse, aunque en menor escala, la marcada separación en el voltaje de estos efectos con los relativos a alteraciones en la cinética de activación de la corriente (Fig. 19C).

En neuronas pretratadas con PMA, el patrón inhibitorio de la NE cambia sustancialmente. La magnitud de la inhibición no muestra sensibilidad alguna frente a los *prepulsos* (trazos de la columna derecha en Figs. 18B-E), las curvas I-V no muestran ningún desplazamiento a la dependencia del voltaje. (Figs. 19D) y la cinética de activación de la corriente no es significativamente alterada, reteniendo los valores de neuronas pretratadas con PMA (Fig. 19E).

Del análisis de los trazos de la columna derecha de la Fig. 18A-D, se obtiene la impresión de que la NE ha pasado a inducir una inhibición de corrientes en neuronas pretratadas que semeja un escalonamiento hacia abajo en la corriente basal (Fig. 19D). Una manifestación de este tipo es característica de la inhibición VI (Luebke y Dunlap, 1994) que involucra a una proporción más o menos importante de la inhibición causada por distintos NT, y cuya contribución es evidente

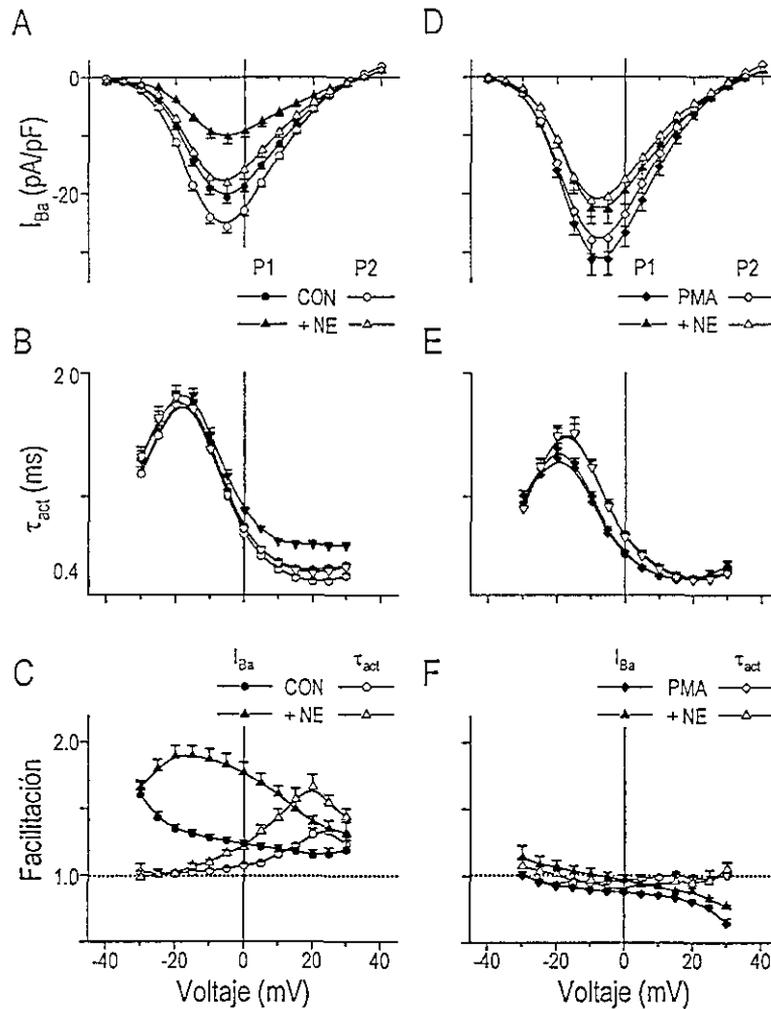


Fig. 19A-F Efecto de la NE en las relaciones I-V y en la cinética de activación de la corriente de neuronas control y pretratadas con PMA. A, D Relación I-V para las neuronas de la Fig. 20 durante P1 y P2. La densidad de corriente se calculó como valor medio de la corriente entre 3 y 4 ms tras el inicio del pulso. B, E Constante de tiempo (τ_{act}) de un decaimiento exponencial simple ajustado a la fase de activación de la corriente, calculado como se describe para la Fig. 9F. C, F Relaciones entre facilitación de la corriente (P2/P1; símbolos cerrados) y facilitación de τ_{act} (P1/P2; símbolos abiertos) inducidas por el prepulso versus voltaje. La escalas de voltaje en C y F aplican para A-E.

como la fracción de inhibición no revertida por *prepulsos* (Luebke y Dunlap, 1994). En este contexto, nótese entonces la similitud de características en la proporción de inhibición inducida por NE y no revertida por *prepulsos* en condiciones control (Fig. 19A), con el patrón inhibitorio que despliega en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 19D). Por tanto, podría especularse acerca del papel de disector molecular que juega la PKC sobre la inhibición inducida por NE, al prevenir, selectivamente, la inhibición VD.

8.6.2. Efecto de la NE sobre el Comportamiento Poblacional de los $CCDV_N$ en Neuronas Control y en Neuronas Tratadas con PMA

¿Qué implica en términos de comportamientos poblacionales una inhibición VI? De manera análoga a la Fig. 12, en la Fig. 20 se han trazado las curvas de activación de la corriente analizando las corrientes de cola registradas a un potencial de -40 mV tras la finalización de varios pulsos de prueba a potenciales crecientes a partir de este valor (protocolo en Fig. 9G). Los datos del control y del PMA están reproducidos a partir de aquellos presentados en la Fig. 12.

El ajuste de las curvas de activación a una doble función de Boltzmann permite distinguir claramente que dos efectos distintos son inducidos por la NE en neuronas control: (1) Parte de la inhibición a potenciales medianamente despolarizantes puede ser revertida por *prepulsos*, y por lo tanto, involucra alteraciones en la dependencia de voltaje de una porción de los $CCDV_N$; y (2) Una reducción en la cantidad de corriente máxima reclutable por despolarizaciones extremas (esto es $I_1 + I_2$; ver Tabla 3). El segundo efecto es definitorio de un componente VI, y es responsables de aproximadamente 15% de la inhibición inducida por NE (Fig. 20A). El primer efecto muestra las clásicas características que definen a la inhibición VD.

A partir de las Figs. 20D y E, en las que se muestran las gráficas por separado de cada componente de la doble función de Boltzmann, es posible apreciar que, en presencia de NE, el segundo componente es responsable de más del 57% de la corriente máxima reclutable en ausencia de un *prepulso*. Como el punto medio de activación de esta población modulada se encuentra unos 40 mV más positivo al valor del potencial que induce corriente entrante máxima (ver Tabla 3), el resultado neto del corrimiento en la dependencia de voltaje de activación de una buena proporción de los canales es una reducción en la amplitud de corriente durante pulsos de prueba que evocan corriente entrante (Fig. 19A). Los *prepulsos* no alteran la cantidad de corriente máxima disponible, pero causan un reacomodo importante *reluctant* \rightarrow *willing*, de manera que la amplitud fraccional del primer componente llegue al 75% (Fig. 20I).

¿De qué manera se explica el 17% restante de la inhibición inducida por NE? Tal vez una posible interpretación surge a partir del patrón de inhibición que ésta presenta en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 20B). La gráfica de los componentes separados de Boltzmann (Fig. 20F) permite aislar el mecanismo de acción rápidamente: neuronas pretratadas con PMA, y

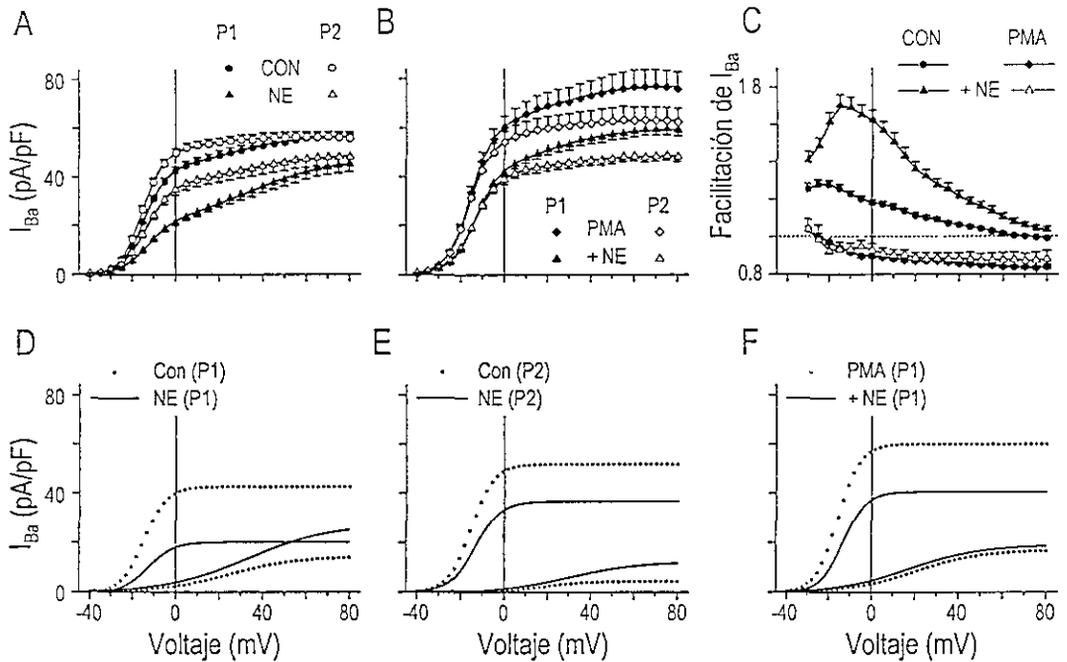


Fig. 20A-F Efecto de la NE en el comportamiento poblacional de $CCDV_N$ de neuronas control y pretratadas con PMA. A-B Relación del promedio de corrientes de cola *versus* voltaje para las neuronas de las Figs. 18 y 19. La densidad de corriente de cola fue determinada como es descrito para las Figs. 12A-C. Las líneas suaves que conectan los puntos representan el mejor ajuste a la suma de dos funciones de Boltzmann (ver texto). C Relación entre facilitación de corrientes de cola *versus* voltaje. D-F Gráfica de los componentes individuales de cada ajuste de Boltzmann (parámetros en la Tabla 3). Las escalas de voltaje en D-F aplican para A-C.

registradas en ausencia o presencia de NE, mostraron un segundo componente de amplitud casi idéntica (Fig. 20F) y que ha sido previamente atribuido a la inhibición tónica remanente (Fig. 12E). Por tanto, el efecto que induce la NE en estas células está caracterizado por una reducción del 32% en la magnitud del primer componente (Tabla 3), que no se traduce en un incremento proporcional del segundo (Fig. 20F). En consecuencia, puede asumirse que una fracción de los $CCDV_N$ pasa a un “estado no conductor”.

En el caso de la inhibición sobre corrientes control puede encontrarse un caso similar al anterior, aunque no tan evidente. La NE induce un ~53% de reducción en la magnitud del primer componente (Tabla 3). Sin embargo, de ese porcentaje, sólo un ~57% podría explicarse como una transición *willing* → *reluctant*. La cantidad restante equivale a un 17% de la corriente máxima reclutable y que, por analogía a lo antes expuesto, se presume que ha entrado en una conformación no conductora. Si este camino *willing* → *no-conductor* es una vía directa o involucra

		I_1 (pA/pf)	I_2 (pA/pf)	V_{h1} (mV)	V_{h2} (mV)	k_1 (mV)	k_2 (mV)
Control	(P1)	42.6	14.3	-14.3	24.8	5.2	15.4
+ NE	(P1)	20.1	27.2	-12.5	33.5	5.8	18.7
Control	(P2)	51.9	4.4	-15.1	17.7	4.4	10.0
+ NE	(P2)	36.7	12.2	-13.3	31.2	5.7	16.0
PMA	(P1)	60.2	16.9	-15.6	20.6	5.2	14.8
+ NE	(P1)	40.7	18.9	-13.1	17.8	5.3	16.3
PMA	(P2)	54.4	8.6	-16.2	12.5	5.3	13.2
+ NE	(P2)	39.2	9.4	-13.8	15.2	5.5	18.5

Tabla 3 Parámetros derivados del ajuste a la suma de dos funciones de Boltzmann de las relaciones de corriente de cola promedio *versus* voltaje de los datos presentados en la Fig. 20A-B.

el paso adicional *willing* \rightarrow *reluctant* \rightarrow *no-conductor*, es algo que no puede concluirse de los resultados mostrados.

Al margen, estas interpretaciones permiten proponer que una fracción de la inhibición inducida por NE podría utilizar mecanismos similares tanto en condiciones control como tras la activación de la PKC. Sin embargo, en el primer caso se encuentran sumados a mecanismos de inhibición VD, y en el segundo estos han sido prevenidos (Fig. 21B). Se sostendrá que lo anterior es cierto aún si la inhibición remanente muestra cierta “dependencia de voltaje” a potenciales negativos (Fig. 21A y B). En particular, según se expondrá en la Discusión, una reducción VI que afecte selectivamente la magnitud del primer componente (esto es, que no se traduzca en un incremento en la magnitud del segundo) genera una curva de porcentaje de inhibición de la corriente total que muestra un mayor efecto a potenciales negativos (por debajo del umbral de activación del segundo componente), que a positivos, como en el caso de la Figs. 21A y B.

Según la discusión anterior, el PMA induce un incremento VI en la amplitud de corrientes basales tempranas (Fig. 13A), y sobre éste, la NE induce un decremento VI en las mismas (Fig. 21B).

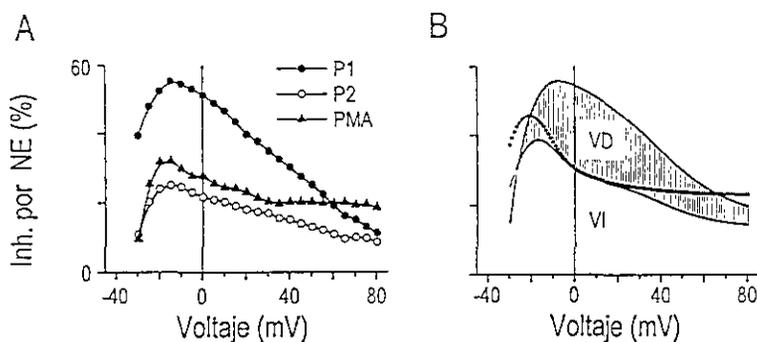


Fig. 21A-B *Inhibiciones VD y VI inducidas por NE*. A Porcentaje de inhibición de la corriente inducida por NE en neuronas control durante P1 y P2 (círculos cerrados y abiertos, respectivamente) y en neuronas pretratadas con PMA durante P1 (triángulos cerrados). La magnitud de la inhibición para cada voltaje fue calculada a partir de los valores promedio de las Figs. 20A-B. B Porcentaje de inhibición de la corriente inducida por NE para las mismas condiciones descritas en A. 100 valores calculados punto a punto a partir de los ajustes a la suma de dos funciones de Boltzmann de las Figs. 20A-B. La parte sombreada, y marcada como *VD* corresponde a la porción de la inhibición inducida por NE que es revertida por *prepulsos*, mientras que la porción indicada como *VI* es aquella que es insensible a éstos. La línea punteada corresponde a la inhibición inducida por NE en neuronas pretratadas con PMA.

8.7. EL PRETRATAMIENTO CON PMA Y LA ACTIVACIÓN DE PG INDUCEN EFECTOS OPUESTOS EN CORRIENTES DE $CCDV_N$

Un corolario, dejado intencionadamente para el final, se desprende del análisis de las curvas de inactivación control: “El $\sim 24\%$ de inhibición tónica en nuestras condiciones de registro (a partir de la Tabla 1) tiene por lo tanto dos efectos principales en la curva de inactivación: una reducción de $\sim 28\%$ en la inactivación máxima, y una sobre-recuperación de $\sim 27\%$ a potenciales positivos a $+30$ mV” (Fig. 15F). Si lo anterior es válido, una implicación relevante se desprende necesariamente: bajo condiciones de activación de PG la corriente debe mostrar poca o nula inactivación, y debe facilitar enormemente a potenciales condicionantes positivos.

La corroboración de la condición postulada parte, nuevamente, del aumento en el nivel de inhibición tónica mediante la diálisis con GTP γ S. Los trazos de la Fig. 22A muestran que la disminución en la densidad de corriente y los cambios en la cinética de activación de la misma mostrados en la Fig. 11, van acompañados, en una ventana de tiempo más larga, de una casi completa eliminación de la inactivación de estado estacionario. El decaimiento de la corriente que aún persiste en estas condiciones muestra una dependencia del voltaje similar al que presenta

la corriente control, pero alcanza un valor máximo de apenas un 25% a potenciales positivos (Fig. 22C).

Como podía preverse, las curvas de inactivación dependientes de potencial, obtenidas con el protocolo ilustrado en la Fig. 15A, muestran que la inactivación máxima de la corriente no supera el 50% de la inactivación máxima que se presenta en condiciones control y que potenciales de P2 por encima de 0 mV facilitan enormemente las corrientes (~100%; Fig. 22D). Estas observaciones apoyan las inferencias hechas sobre la inhibición tónica en el control a partir de su comparación con GDP β S. Sin embargo, el resultado más interesante no es ése. Si se observa con detenimiento la relación P3/P1 en la Fig. 22D, puede observarse que la máxima inactivación de las corrientes en presencia de GTP γ S (~15%) se alcanza a potenciales de P2 de entre -40 y -30 mV que se encuentran claramente en el umbral de activación de la corriente en P2 (Fig. 22B). Visiblemente, este resultado apoya un modelo dependiente de voltaje, y no de corriente, para explicar el comportamiento de inactivación de la corriente en nuestras condiciones. Más aún, obsérvese cómo la fase de recuperación de la corriente en P3 sigue a la perfección la fase de activación de la curva I-V de la corriente en P2 que se presenta en la Fig. 22B. Tal vez sea éste el resultado que apoya de manera más contundente que el modelo de inactivación dependiente de potencial acople la tasa más alta de este proceso a los estados cerrados del canal (Patil et al., 1998).

Intencionalmente, se han repetido en la Fig. 22 los datos de la Fig. 15 obtenidos tras el pretratamiento con PMA para volver explícita una comparación ineludible: el comportamiento de la corriente de CCDV_N modulada por PG exhibe, en todos sus aspectos, características diametralmente opuestas a las observadas tras la activación de la PKC.

De alguna manera, la imagen mental que se persigue invocar con la Fig. 22 es la siguiente: el comportamiento basal (control) de la corriente de CCDV farmacológicamente indiscriminables (compárese la sensibilidad a ω -CgTx GVIA en la Fig. 22A con aquella de las Figs. 17A y B) puede ser alterado profunda y antagónicamente en respuesta a la activación de vías de señalización intracelular específicas. Unas, que dependen de PG, llevan a un *enlentecimiento* de las cinéticas de compuerta del canal, mientras que las otras, activadas por ésteres de forbol y presumiblemente mediadas por la PKC, llevan a una *aceleración* de las mismas. Las primeras

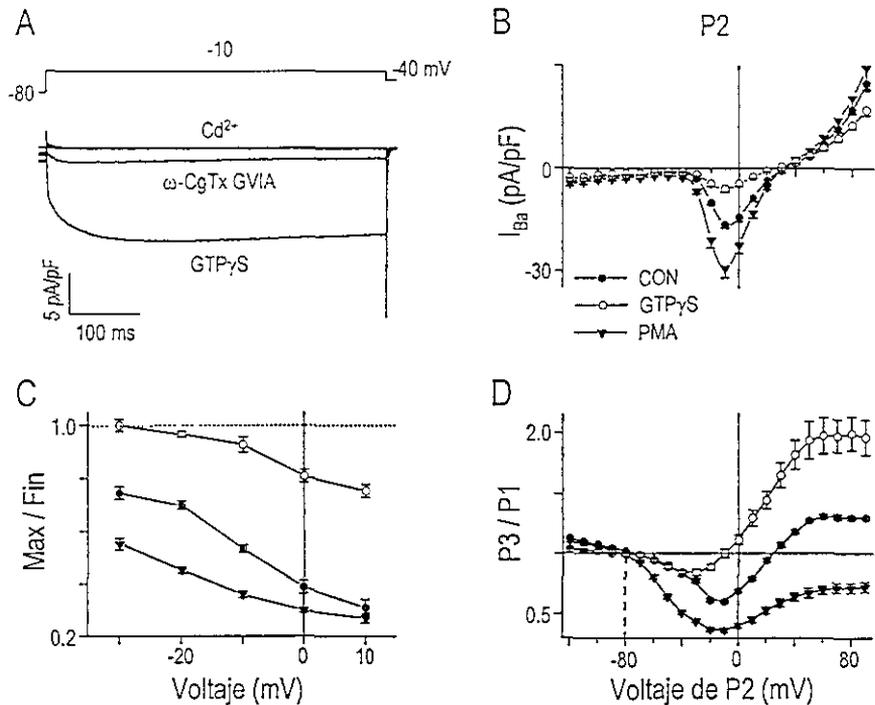


Fig. 22A-D Efecto del aumento en inhibición tónica - inducido por GTP γ S - sobre la inactivación de corrientes de CCDV_{N} . A Superposición de registros promedios de I_{Ba} en condiciones de diálisis interna con GTP γ S ($n = 4$) registradas durante una despolarización de 500 ms a -10 mV. Los trazos superiores muestran, respectivamente el bloqueo de la corriente por $\omega\text{-CgTx GVIA}$ (10 μM) y Cd^{2+} (100 μM). B-D Inactivación de estado estacionario para neuronas dializadas con GTP γ S (círculos abiertos; $n = 6$), neuronas control y pretratadas con PMA (mismos datos de la Figs. 15 y 16 en ambos casos). Datos registrados utilizando el protocolo de voltaje ilustrado en la Fig. 15A. B Curva I-V para la corriente pico registrada en P2. D Relación de corriente pico en P3/P1 como función del potencial de P2. La escala de voltaje de P2 en D, aplica a B. C Relación de corriente máxima (Max)/corriente registrada durante el último milisegundo de las despolarizaciones de 500 ms (Fin), como una función del potencial de P2 que en la Fig. B genera corriente entrante.

disminuyen notablemente la amplitud de la corriente reclutable con despolarizaciones moderadas y las segundas desencadenan un incremento (temprano) de las mismas. Este cuadro de modulaciones convergentes que producen efectos divergentes en los CCDV_{N} , es el cimientto de la tesis central de este trabajo de investigación.

Y, sin embargo, no es la observación más interesante que se desprende de la Fig. 22. De los resultados que se presentan en la Fig. 22D puede inferirse que el resultado neto de ambas vías de modulación es regulado, a su vez, por el historial previo del potencial de membrana.

Resulta, por tanto, de especial interés el comparar directamente los trazos de corriente obtenidos en neuronas pretratadas con PMA con aquellos que se observan tras la diálisis interna

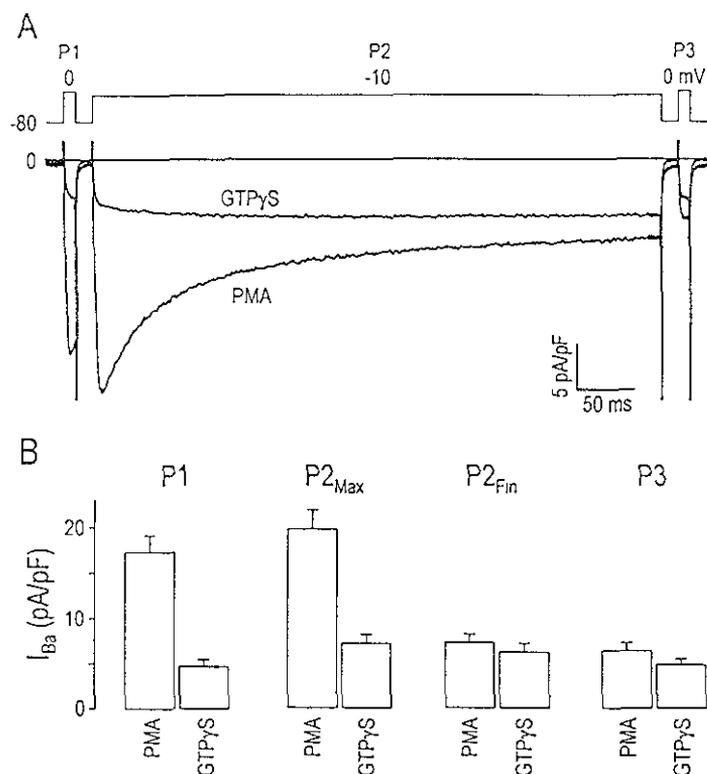


Fig. 23A-B Comparación de la inactivación de corriente en neuronas pretratadas con PMA y en neuronas dializadas con GTP γ S. A Superposición de trazos de I_{Ba} promedio, registrados en neuronas pretratadas con PMA (mismas neuronas de las Figs. 15 y 16) y neuronas dializadas con GTP γ S (mismas neuronas de las Figs. 22B-D) utilizando el protocolo de voltaje de tres pulsos a los voltajes indicados en la parte superior. B Promedio de valores para la corriente máxima en P1, P2 ($P2_{Max}$) y P3, y valor medio de la corriente durante el último ms de P2 ($P2_{Fin}$).

con GTP γ S. La Fig. 23A ilustra los trazos de corriente obtenidos en ambas condiciones con la ayuda del protocolo de tres pulsos, con despolarizaciones de P2 al pico de corriente entrante.

Los patrones opuestos en la activación y en la inactivación de la corriente, tras uno u otro tratamiento, inducen diferencias dependientes de tiempo en la amplitud de la corriente durante. Cerca del inicio de un pulso de prueba despolarizante la amplitud de la corriente es 3 a 4 veces más grande en neuronas pretratadas con PMA que en aquellas dializadas con GTP γ S, mientras que mediciones en intervalos de tiempo más largos muestran diferencias menos pronunciadas. Nótese que las grandes diferencias en la amplitud de la corriente en P1 y al pico de P2 ($P < 0.05$) se encuentran virtualmente ausentes en P3 ($P > 0.45$) debido a la aumentada inactivación durante P2 en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 23B).

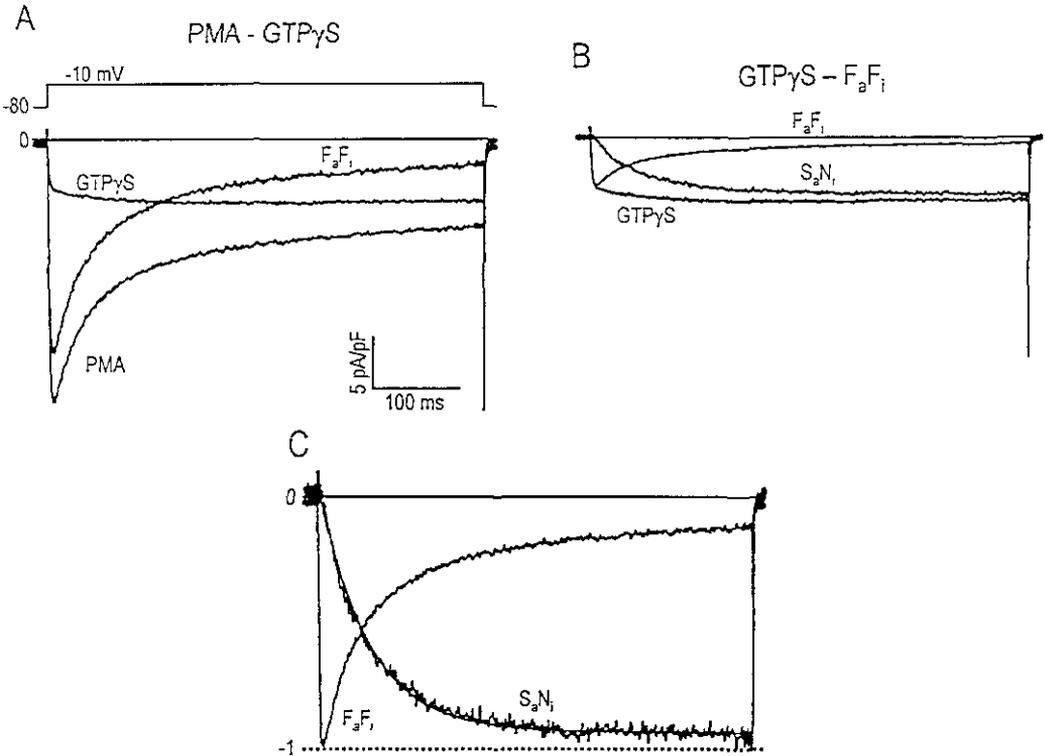


Fig. 24A-C Comportamiento hipotético de la corriente de $CCDV_N$ bajo modulaciones inducidas por PMA ó PG. A Superposición de trazos de I_{Ba} promedio inducida por despolarizaciones de 500 ms en neuronas dializadas con GTP γ S y pretratadas con PMA (trazos de P2 de la Fig. 23A). La sustracción punto a punto indicada aísla un componente de rápida activación y rápida inactivación (F $_a$ F $_i$; por *Fast-activating, Fast-inactivating*). B El componente F $_a$ F $_i$ fue escalado al valor de la amplitud del primer componente de un ajuste de la fase de activación de la corriente en presencia de GTP γ S a la suma de dos funciones exponenciales (la línea continua muestra el ajuste). La versión escalada del componente F $_a$ F $_i$ fue sustraída de la corriente en presencia de GTP γ S, revelándose un componente de lenta activación y no inactivante (S $_a$ N $_i$; por *Slowly activating, Non-inactivating*). C Superposición de los componentes F $_a$ F $_i$ y S $_a$ N $_i$ escalados al valor máximo de la corriente. La curva sólida a través de S $_a$ N $_i$ muestra el ajuste a una sola función exponencial.

La observación anterior lleva a conjeturar que la principal diferencia en el comportamiento de la corriente en ambas condiciones es debida a un componente de la corriente, en neuronas pretratadas con PMA, que inactiva casi por completo durante la despolarización sostenida de 500 milisegundos. Si este es el caso, esta diferencia puede ser representada por el trazo de corriente que se obtiene mediante la sustracción de la corriente en presencia de GTP γ S de aquella tras el PMA. Este trazo de corriente es mostrado en la Fig. 24A. Debe hacerse notar que la corriente diferencia obtenida de esta manera retiene las principales características de la corriente en neuronas pretratadas con PMA: rápidas cinéticas de activación e inactivación, de manera que ha sido aquí designado como el componente F $_a$ F $_i$ (por *Fast activation and Fast inactivation*). La fase

de activación de esta corriente puede ser descrita por una función exponencial simple con una constante de tiempo de 1.52 ms. Este valor está en concordancia con aquel obtenido en neuronas pretratadas con PMA (1.43 ± 0.11 ms, $n = 13$).

De manera interesante, el curso temporal de la activación de la corriente en neuronas dializadas con GTP γ S (Fig. 24A) es claramente bifásico y, al ser ajustado a la suma de dos funciones exponenciales, arroja una constante de tiempo rápida similar a la única constante de tiempo del componente $F_a F_i$ (1.45 ± 0.19 ms, $n = 6$). Esta coincidencia en los valores de las constantes de tiempo podría interpretarse como que representa a un componente $F_a F_i$ pequeño que pudiese contribuir a la corriente total en condiciones de GTP γ S. Si lo anterior es válido, la amplitud de este componente estaría dada por la amplitud del componente rápido que se deriva del ajuste a la doble función exponencial. La Fig. 24B muestra al componente $F_a F_i$ en una escala que correspondería hipotéticamente al de las neuronas dializadas con GTP γ S. Ahora, si esta curva $F_a F_i$ es sustraída del trazo de corriente en presencia de GTP γ S, la diferencia obtenida es un componente de lenta activación y que no presenta inactivación apreciable ($S_a N$; por *Slowly activating and Non-inactivating*). Por tanto, es posible describirlo de inicio a fin con una sola constante de tiempo de 47.15 ms (la línea continua en la Fig. 24C muestra el ajuste). Este valor concuerda con la segunda constante de tiempo obtenida del ajuste a una función biexponencial de la fase de activación de la corriente en neuronas dializadas con GTP γ S (45.6 ± 13.4 ms, $n = 6$).

En términos del razonamiento anterior, las cinéticas complejas que se observan en presencia de GTP γ S interno podrían ser explicadas como una mezcla del comportamiento de dos poblaciones de canales, cada una con cinéticas más simples (Fig. 24B). Específicamente, esta propuesta está en condiciones de dar una explicación sencilla tanto la cinética biexponencial de activación de la corriente como la persistencia de un cierto grado de inactivación de la misma, que no involucra los complejos cambios cinéticos que habría que invocar para explicar dicho comportamiento a partir de la activación de una población homogénea (p.e., Jones y Elmslie, 1997). Al margen de la validez de la afirmación anterior, la descomposición de la corriente realizada permite proponer que cada una de estas poblaciones (escaladas a uno en la Fig. 24C) representa el comportamiento extremo de la corriente a través de CCNV $_v$ bajo vías moduladoras inducidas por PG ($S_a N$) y por PKC ($F_a F_i$).

9. DISCUSIÓN

*“Creo que si Esparta
fue en otros tiempos muy floreciente,
no lo fue por causa de ninguna de sus leyes en particular,
puesto que algunas de ellas eran muy extrañas
e incluso contrarias a las buenas costumbres,
sino a causa de que,
habiendo sido inventadas por un solo hombre [Licurgo],
tendían todas a un mismo fin.”*

R. Descartes

El trabajo realizado en el marco de la presente Tesis tuvo su origen en el esfuerzo por dar respuesta a una pregunta sencilla que concierne a la modulación de $CCDV_N$: ¿Hay diferencias entre los patrones inhibitorios inducidos por los distintos subtipos de subunidades $G\beta$? Del análisis de los efectos que se han llamado “atípicos” (Fig. 4) y de los “paradójicos” (Figs. 5 a 7) de las dichas subunidades de las PG, se ha derivado el resto. Los primeros se refieren a la inducción de inhibición insensible a voltaje por ciertas subunidades. Los segundos, cuyo análisis ha ocupado la mayor parte de la sección precedente, conciernen efectos inesperados y antagónicos a los inhibitorios. Por oposición se ha hecho referencia a ellos como “estimuladores”. (Nótese que se ha decidido no utilizar el término “facilitadores” pues ello podría prestarse a confusiones: la expresión “facilitación” se emplea para denotar el proceso de des-inhibición transitoria de la inhibición VD que induce un *prepulso*; ver 3.1.1.2). La extensión del estudio de estos últimos se justifica en términos de lo poco que se sabe de modulación positiva (Yang y Tsien, 1993) de $CCDV_N$, y de la necesidad de hacer una clara distinción entre ésta y una modulación des-inhibitoria (Swartz, 1993), prerrequisito indispensable para poder plantear su existencia misma. Finalmente, y dado que la génesis del estudio se encuentra en la modulación negativa (inhibitoria), fue de especial interés no sólo hacer una comparación en detalle entre los efectos de una u otra, sino también la determinación del nivel de interacción

entre ambas, particularmente en términos de los efectos que tiene la segunda en un contexto de establecimiento previo de la primera.

9.1. ¿HAY ESPECIFICIDAD DE LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE SUBUNIDADES $G\beta$ EN LA REGULACIÓN INHIBITORIA?

Todos los subtipos de subunidades $G\beta$ probados - que corresponden a todos los subtipos que se han clonado hasta el momento - mostraron efectos inhibitorios sobre corrientes de $CCDV_N$. En este sentido, todos ellos tienen capacidad inhibitoria. No obstante esta generalidad, pueden establecerse claras distinciones cuantitativas entre las facultades relativas de cada subtipo.

La primera diferenciación evidente entre los efectos inhibitorios de los subtipos $G\beta$ identifica a $G\beta_5$ como el subtipo menos potente (Fig. 3D), tanto por sus débiles efectos sobre la densidad de corriente basal (Fig. 3E) como por el bajo nivel de facilitación que inducen los *prepulsos* tras su sobreexpresión. A pesar de que podría suponerse que el bajo nivel de efecto observado fuese debido a un pobre nivel de expresión de esta proteína, y de que no se presenta evidencia experimental alguna que permita descartar por completo esta posibilidad, los siguientes argumentos son sugestivos de que el efecto presentado es genuino y que puede deberse a factores inherentes subtipo-específicos. (1) Si bien existen diferencias entre los plásmidos utilizados, todos ellos comparten el mismo promotor de transcripción (CMV). Más aún, $G\beta_5$ fue clonada en el mismo plásmido (pcDNA I) que $G\beta_2$, quien mostró una fuerte potencia inhibitoria. (2) Resultados similares para $G\beta_5$ han sido obtenidos muy recientemente por dos grupos de investigación (Arnot et al., 2000; Ruiz-Velasco e Ikeda, 2000). En uno de ellos se reportó una completa inactividad de este subtipo (Arnot et al., 2000). En el otro, los autores notaron que “De hecho, la concentración de cDNA inyectada tuvo que ser elevada 10 veces para obtener resultados estadísticamente significativos” (*sic*) con dicho subtipo (Ruiz-Velasco e Ikeda, 2000). (3) Mientras que los subtipos 1 al 4 tienen un ~80 % de similitud en la secuencia de aminoácidos, $G\beta_5$ apenas supera el 50% de homología con cada uno de ellos (Watson et al., 1994; Yan et al., 1996). (4) $G\beta_5$ tiene unos 13 residuos de aminoácidos más que los demás subtipos (Watson et al., 1994). (5) A diferencia de los subtipos 1 al 4, se ha reportado que $G\beta_5$ se acopla casi exclusivamente a la subunidad $G\alpha_q$ (Fletcher et al., 1998).

A diferencia de $G\beta_3$, los demás subtipos mostraron capacidad de inducir una fuerte inhibición tónica (Fig. 3E) dependiente de voltaje (Fig. 3F) y una oclusión de la inhibición inducida por NE (Fig. 3G). Es interesante hacer notar que, entre éstas, $G\beta_3$ mostró los efectos ligeramente menores comparada con los subtipos 1, 2 y 4, y que, nuevamente, una correlación puede ser establecida con el grado de homología en la secuencia de aminoácidos: la similitud entre estos últimos (88-90 %), es un 10 % superior al que guarda el subtipo 3 con cada uno de ellos (78-82 %). Sin embargo, es extremadamente notorio que estas diferencias no involucran a **ninguno** de los residuos de aminoácidos en las posiciones críticas identificadas por el grupo de H. E. Hamm (Ford et al., 1998) para la inhibición dependiente de voltaje de corrientes a través de subunidades α_{1B} en células HEK 293 inducida por subunidades $G\beta_1$ (L55, K78, I80, M101, N119, T143, D186, W332), ya que todos ellos se encuentran conservados en los subtipos 1 a 4 (a partir de la inspección de las secuencias publicadas en Watson et al., 1994).

Según lo anterior, es posible que las diferencias estructurales que se encuentren en $G\beta_3$ no interfieran con su capacidad absoluta para inhibir los canales y que entonces, deba buscarse una explicación alternativa al índice de facilitación ligeramente reducido que se registra en su presencia. En este contexto, cobra especial sentido una observación reportada por el grupo de G.W. Zamponi (Arnot et al., 2000): $G\beta_3$ presenta la constante de tiempo de reinhibición de los canales más baja entre todas los subtipos probados en ese estudio. Esto quiere decir, que sería perfectamente esperable que el grado de reinhibición - durante el intervalo de 25 ms utilizado entre el *prepulso* y P2 en la Fig. 3 - en presencia de $G\beta_3$ puede ser lo suficientemente elevado como para que lleve a que se registre un índice de facilitación menor al que se registra con los subtipos 1, 2 ó 4 (Fig. 3F). Por otra parte, el mismo razonamiento podría explicar el aumento en el índice de facilitación en presencia de $G\beta_4$ (Fig. 3F): esta es la subunidad que, en el trabajo citado, muestra la mayor constante de tiempo para la reinhibición tras un *prepulso*.

Sobre dicha base, y admitiendo que los mencionados residuos de aminoácidos sean realmente los únicos críticos para que se exprese la modulación dependiente de voltaje, la conclusión que se desprende de esta discusión es que los subtipos $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$ y $G\beta_4$ son todos capaces de inducir una inhibición dependiente de voltaje con grado similar.

Al margen, la capacidad de inducir inhibición dependiente de potencial que se ha observado con los subtipos $G\beta_1$ y $G\beta_2$ reproducen observaciones previamente reportadas (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996). Por su parte, la misma capacidad para los subtipos $G\beta_3$ y $G\beta_4$ aquí descrita concuerda con lo reportado por el grupo de Ikeda (Ruiz-Velasco e Ikeda, 2000), pero contradice un reporte previo nacido de la presente Tesis (García et al., 1998). En este último, se reportó que tanto $G\beta_3$ como $G\beta_4$ eran inhibitoriamente inactivas. La razón de la discrepancia es la siguiente: la clona de cDNA para $G\beta_4$ que fue originalmente utilizada (M.I. Simon, California Institute of Technology, Pasadena, CA) carecía de un codón de inicio, presumiblemente como resultado de una mutación espuria ocurrida durante la propagación del plásmido (B. Hille, comunicación personal). Una escena similar podría subyacer la aparente inhabilidad de $G\beta_3$ previamente reportada.

9.1.1. Inhibición VI Inducida por Subtipos Específicos de Subunidades $G\beta$

De los datos anteriores, sería muy tentador concluir que, como ha sido sugerido (Ruiz-Velasco e Ikeda, 2000) no existen diferencias entre las capacidades moduladoras de los subtipos 1 a 4 de las subunidades $G\beta$. Sin embargo, los datos presentados en la Fig. 4 obligan a reconsiderar esta propuesta. A pesar de que presentan una sensibilidad al voltaje relativamente similar (Fig. 3F), los patrones de inhibición tónica entre $G\beta_1$ y $G\beta_2$ son sustancialmente distintos: mientras que los *prepulsos* llevan a una completa recuperación de la densidad de corriente en el primer caso (Fig. 4B), en presencia de $G\beta_2$ los valores de la misma post-*prepulso* permanecen drásticamente reducidos (Fig. 4C). Esto es, parte de la inhibición de la corriente en este último caso es independiente de voltaje (VI; Fig. 4E), y sugiere similitud con la porción de la inhibición inducida por NE que muestra esta misma característica (Figs. 4A, D y E, y 18 a 21).

No puede invocarse como subyacente al fenómeno anterior un razonamiento similar al invocado para explicar las diferencias en el índice de facilitación basal que presentan $G\beta_3$ y $G\beta_4$. Según el trabajo entonces citado, la tasa de recuperación de la inhibición es indistinguible entre $G\beta_1$ y $G\beta_2$. Por tanto, la diferencia observada debe reflejar características intrínsecas a cada subtipo.

¿Cuál es la naturaleza bioquímica de esta inhibición VI? Dos vías VI principales han sido descritas: una vía rápida y delimitada a membrana (*fan*; Beech et al., 1992; Shapiro y Hille, 1993, Kammermeier et al., 2000), y otra vía más lenta que utiliza un segundo mensajero aún desconocido (*smn*; Bernheim et al., 1991; Beech et al., 1992; Lewis e Ikeda, 1997; Delmas et al., 1998a,b). El tipo de abordaje experimental utilizado en esta tesis no permite, evidentemente, establecer una distinción basada en la velocidad de establecimiento de la inhibición VI. Sin embargo, es poco probable que la vía VI reportada corresponda a la vía *smn*. Se ha reportado que niveles de quelantes de Ca^{2+} intracelular similares a aquel utilizado en este trabajo interfieren significativamente con esta vía (Beech et al., 1991, 1992; Bernheim et al., 1991, 1992; Lewis e Ikeda, 1997; Delmas et al., 1998a,b; Kammermeier et al., 2000). Por lo tanto, es probable que, la inhibición VI observada tanto con NE como con GTP γ S sea el producto de la utilización de una vía *fan*.

Se encuentra relativamente establecido que la vía *smn* actúa a través de un segundo mensajero capaz de difundir hacia un sello *on-cell* (pero que no involucra ni Ca^{2+} , ni GMPc, ni AMP, ni PKC; Bernheim et al., 1991). Sin embargo, ¿Cuál es la naturaleza bioquímica de la inhibición *fan*? La respuesta es directa: aún no es claro. A pesar de ello, existe una hipótesis en particular que merece especial atención puesto que concuerda con los resultados exhibidos en esta tesis: S. W. Jones y K. S. Elmslie (1997) han propuesto que la inhibición residual no revertida por *prepulsos* podría reflejar una unión de baja afinidad de la PG activa con el estado abierto del canal. En otros términos, ambos tipos de modulación (VD y VI) tendrían un sustrato molecular idéntico: la interacción directa de subunidades $G\beta\gamma$ con la subunidad α_1 de los $CCDV_N$ (Lee y Elmslie, 2000).

Si lo anterior fuese demostrado, los datos aquí presentados agregarían lo siguiente: la interacción directa de algunos subtipos de subunidades $G\beta\gamma$ - los que contengan a $G\beta_1$ ó $G\beta_5$ - con la subunidad α_1 de los $CCDV_N$ induciría una modulación básicamente VD, mientras que la interacción directa de otros subtipos - los que contengan $G\beta_2$, $G\beta_3$ ó $G\beta_4$ - induciría, además, un patrón inhibitorio VI (Fig. 4D y E).

En el contexto de lo anterior, se ha especulado que el patrón inhibitorio mixto (esto es, tanto VD como VI) que induce la NE podría estar ligado a que la vía de transducción que activa no

utilice una sola especie de subtipos $G\beta$, sino una mezcla de ellos. Existen evidencias publicadas en apoyo de esta conjetura. El grupo de P. Delmas (Delmas et al., 1999) ha reportado recientemente que subunidades $G\beta\gamma$ derivadas de la estimulación por NE de $G\alpha_{oA}$ y $G\alpha$ son capaces de inducir, selectivamente, inhibiciones VD y VI respectivamente. La activación preponderante de $G\alpha_{oA}$, según los autores, explicaría la predominancia de las vías VD inducidas por NE.

Al margen de la evidencia experimental que a la activación de cada subtipo de $G\alpha$ con cada efecto, vale la pena mencionar aquella que apoya la participación de subunidades $G\beta\gamma$ en ambos efectos. Esta, que fue obtenida en la misma preparación que se ha estudiado en la presente Tesis, consiste básicamente en la comparación de los efectos que tienen, sobre la inhibición inducida por NE, la expresión de tres proteínas con afinidad conocida por subunidades $G\beta\gamma$: la región *C-terminal* de la cinasa 1 del receptor β -adrenérgico (β ARK1), la subunidad $G\alpha_{i1}$ y la α -transducina. Mientras que esta última eliminó totalmente la inhibición, las dos primeras la previnieron parcialmente. La inhibición residual en estos casos tenía una sensibilidad al voltaje claramente opuesta. En células que expresaban $G\alpha_{i1}$, la inhibición era VD, y era VI en aquellas que expresaban β ARK1. Este último dato es el que interesa: esta proteína interacciona *in vivo* fuertemente con subunidades $G\beta_1$ y $G\beta_2$, pero muy débilmente con el resto de los subtipos (Daaka et al., 1997). En el presente trabajo se ha observado que las inhibiciones tónicas inducida por $G\beta_3$ y $G\beta_4$ son incompletamente revertidas por un *prepulso* (Fig. 4D-E). Así, una explicación plausible para la evidencia presentada por Delmas y cols, a partir de los datos aquí presentados, sería que $G\alpha_{oA}$ se acopla preferentemente con $G\beta_1$, mientras que $G\alpha$ se acopla preferencialmente con $G\beta_3$ y/o $G\beta_4$.

En cualquier caso, los resultados aquí presentados, si bien no demuestran que la inhibición VI sea directamente causada por una interacción entre subunidades $G\beta\gamma$ y α_1 de los $CCDV_N$, se suman a la lista de evidencias que apuntan a que las primeras se encuentran involucradas fuertemente en este tipo de inhibición (Diversé-Pierluissi et al., 1995, 2000; Jones y Elmslie, 1997; Delmas et al., 1999; Kammermeier et al., 2000), y sobre todo, apuntalan la idea de que múltiples efectos sobre los $CCDV_N$ pueden ser inducidos tras la activación de PG (Hille, 1994).

9.2. ACTIVACIÓN DE LA PKC POR SUBUNIDADES $G\beta$

Si bien no se ha publicado evidencia alguna que sea absolutamente concluyente al respecto, es ampliamente aceptado que el sustrato molecular de la inhibición VD se encuentra en una interacción directa entre subunidades $\beta\gamma$ de las PG y α_1 de los $CCDV_N$. Por otra parte, se ha desarrollado anteriormente la especulación de que al menos parte de la inhibición VI (la vía *fan*) pudiese desarrollarse como consecuencia de un fenómeno idéntico, y algo más se agregará a la discusión anterior más adelante. ¿En qué se cimienta entonces el grupo de efectos antagónicos observado en la Fig. 5 y agrupados, por covariación de características fenotípicas (Fig. 6), bajo la denominación de “grupo 3” (G3)?

No existe duda alguna al afirmar que es completamente esperable que la sobreconcentración intracelular de subunidades $G\beta$ lleve a que se activen (o inhiban) todas las vías de señalización intracelular que son reguladas por éstas. Los $CCDV_N$ no son más que uno de los múltiples efectores regulados por el heterodímero $G\beta\gamma$. Por lo tanto, no es en absoluto sorprendente postular que un solo estímulo - la presencia de un subtipo específico de $G\beta$ - desencadene una multitud de respuestas. Esta, es una cualidad inherente a todas las vías de transducción de señales extracelulares.

Por otra parte, es también previsible que la actividad de PKC se encuentre aumentada en estas células: está bien establecido que $G\beta\gamma$ estimula la actividad de la familia de fosfolipasas $C\beta$ (PLC β ; Katz et al., 1992; Boyer et al., 1994; Giershik y Camps, 1994; Ueda et al., 1994; Diversé-Pierluzzi et al., 2000). La degradación de fosfolípidos de membrana por estas enzimas genera diacilglicerol, quien actúa como coactivador fisiológico de esta enzima (ver Apéndice III.3) Aún más, al menos entre $G\beta_1$, $G\beta_2$, no parece haber diferencias de potencia estimuladora de las PLC β entre distintas combinaciones de subtipos en el heterodímero $\beta\gamma$ (Harish y Role, 1992; Boyer et al., 1994). Por lo tanto, tampoco es insólito que un activador directo de la PKC, el PMA, reproduzca las acciones estimuladoras de $G\beta\gamma$ sobre los $CCDV_N$.

Lo que sí sorprende es la cualidad de los efectos mismos: si la modulación negativa se caracteriza por una reducción en la densidad de corriente (tanto la inhibición VD como la VI) y, en el caso de la inhibición VD, por *alentamiento* de las cinéticas de la misma, entonces, por

oposición, el aumento en la densidad de corriente y la aceleración de cinéticas características de $G\beta$ nos sumerge directamente en terrenos de modulación positiva de $CCDV_N$. Justamente en este terreno, se encuentra una de las áreas de mayor discrepancia de opiniones: su existencia misma es sostenida por unos (p.e., Yang y Tsien, 1993) y descartada por otros (Barrett y Rittenhouse, 2000). La disputa entre ambos consiste, esencialmente, en si existe - o no - diferencia en el significado funcional de los términos “modulación positiva” y “desinhibición tónica”. Esto es, las dudas se circunscriben a la siguiente pregunta: ¿Se encuentran todos los efectos que induce la activación de la PKC **exclusivamente** relacionados con la interferencia sobre la modulación inhibitoria?

Es en el marco de la pregunta anterior se han desarrollado la mayor parte de los experimentos aquí expuestos. Es decir, antes de postular la activación de vías antagónicas por subunidades $G\beta$, había que contestar si existe modulación positiva de $CCDV_N$ y, de ser así, en qué consiste y cómo repercute en el comportamiento de la corriente. En el contexto de la discusión precedente, llevar esto a la práctica significa, en última instancia, un análisis comparativo que determine si el fenómeno observado es reducible a un proceso de desinhibición tónica.

Resta decir que, si bien no se ha aportado ninguna evidencia experimental concluyente sobre la posible activación selectiva de la PKC por el procedimiento utilizado (pretratamiento con PMA), se postula que esto es así y se hablará, por lo tanto, de “efectos de la activación de la PKC” como sinónimo de “efectos inducidos por el PMA”. Lo anterior se debe, en parte, a la necesidad de tratar de evitar confusiones respecto a posibles efectos directos de dicha sustancia, que quedan descartados con certeza de los resultados que se presentan.

9.3. MODULACIÓN POSITIVA DE $CCDV_N$ POR PKC

En acuerdo con algunos de los trabajos previos realizados en neuronas simpáticas (Swartz, 1993; Yang y Tsien, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Shapiro et al., 1996), se han presentado evidencias de que la activación de la PKC induce un incremento en la amplitud de las corrientes basales de $CCDV_N$ (Figs. 8 a 10 y 12 a 17). La pregunta obligada respecto a esta observación es si este incremento corresponde a un estado modulado particular de los canales (Yang y Tsien, 1993), ó si no es más que el producto de la remoción de una inhibición mediada por PG que se encuentra tónicamente activa en condiciones basales (Swartz, 1993).

La segunda propuesta tendría sentido en el marco de que los resultados presentados demuestran claramente que los $CCDV_N$ se encuentran bajo inhibición tónica en esta preparación (Figs. 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13; Ikeda, 1991; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Barrett y Rittenhouse, 2000). La remoción transitoria (por *prepulsos*) o persistente (por GDP β S) de dicha inhibición lleva a un aumento dependiente de voltaje en la amplitud de las corrientes (Figs. 10 y 13) y a algunas alteraciones en la cinética de las mismas (Figs. 1, 9, 15, 16). Dada su habilidad para interrumpir parte de la inhibición mediada por PG (Figs. 19 a 21; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Shapiro et al., 1996), la PKC podría actuar removiendo esta inhibición basal, lo que desencadenaría el aumento en las corrientes observado (Swartz, 1993). Si esto fuese así, la fosforilación por PKC no tendría mayor efecto en $CCDV_N$, más que el de volverlos resistentes a la inhibición por PG (Barrett y Rittenhouse, 2000).

En particular, dos similitudes entre los efectos de remoción de inhibición tónica y aquellos inducidos por PKC han sido referidas en la literatura (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994) como cimientos de esta posición: (1) Dicho tratamiento, elimina todo signo de facilitación basal (Figs. 8, 9, 10, 13); (2) La magnitud del aumento es dependiente de voltaje (Figs. 10 y 13). Se intentará fundamentar que la convergencia de efectos no implica, necesariamente, la utilización de mecanismos idénticos, y que la propuesta de que los efectos inducidos por PKC reflejan un estado modulado particular de los $CCDV_N$ es favorecida por las evidencias experimentales presentadas.

9.3.1. Naturaleza del Aumento en la Amplitud de Corrientes Inducido por PKC

La pregunta que aquí interesa responder es: ¿El aumento inducido por PKC, respecto de la amplitud de corrientes de $CCDV_N$, se debe a la remoción de inhibición tónica? La respuesta tentativa a la anterior interrogante es no. Existen dos razones que la sostienen: (1) Algunas evidencias sugieren que la inhibición tónica se encuentra aún presente en neuronas pretratadas con PMA (Fig. 12); (2) El incremento de las corrientes por PMA no es ocluido por la remoción previa de la inhibición tónica por GDP β S (Fig. 14).

El primer punto se fundamenta en lo siguiente. El aumento en la amplitud de las corrientes inducido por remoción de inhibición tónica tiene una característica distintiva: da como resultado

que las curvas de activación se vuelvan más simétricas - alrededor del punto medio de activación máxima - que aquellas que se observan en el control (Ikeda, 1991).

Un efecto parecido debería esperarse si la PKC aumentara las corrientes mediante un mecanismo similar. Esto no es así: las curvas de activación de neuronas pretratadas con PMA son tan asimétricas alrededor del punto medio de activación máxima como aquéllas del control (Fig. 12C). El ajuste de las curvas a la suma de dos funciones de Boltzmann revela que la amplitud del segundo componente es equivalente al que se observa en condiciones control (Fig. 12E).

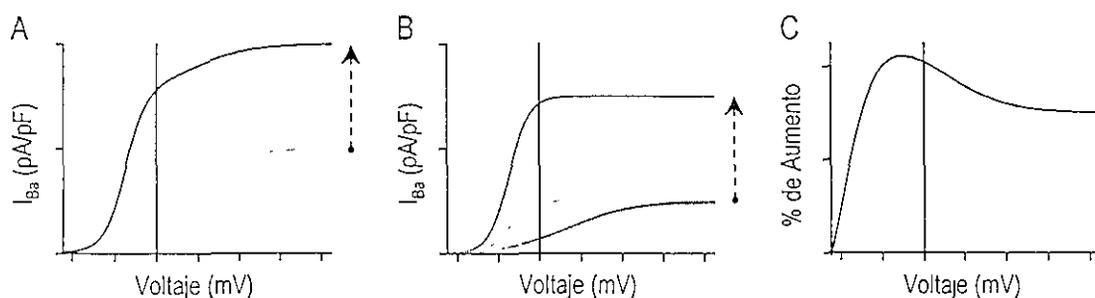
Más aún, siguiendo el modelo *willing-reluctant* (ver 3.1.1.2), este segundo componente se ajusta a la descripción de una población de $CCDV_N$ inhibida de manera dependiente de voltaje. Si esto es así, este componente representa canales tónicamente inhibidos, y esto lleva a concluir que el pretratamiento con PMA no remueve la inhibición tónica. En este aspecto, nuestros resultados son similares al reporte de un aumento en corrientes de $CCDV_N$ después del tratamiento con el éster de forbol PDBu, que no involucra la remoción de inhibición tónica en neuronas simpáticas del sapo (Yang y Tsien, 1993).

Tanto el GDP β S como el PMA eliminan la facilitación por *prepulsos*. Si la inhibición tónica sigue presente en células expuestas a PMA, lo contrario sería esperable. Sin embargo, se ha argumentado que la falta de facilitación en estas células puede atribuirse a un enmascaramiento por la rápida cinética de inactivación (Elmslie et al., 1993). De hecho, algunas de las observaciones indican que los *prepulsos* en estas neuronas podrían tener un efecto similar al registrado en el control: (1) Las curvas de activación después de los *prepulsos* en neuronas expuestas a PMA son mucho más simétricas que aquellas en ausencia de un *prepulso* (Fig. 12C); (2) El índice de facilitación negativa es significativamente mayor en neuronas previamente dializadas con GDP β S (Fig. 14). Lo anterior permite sugerir que la abolición de la facilitación basal por PKC no puede tomarse como una evidencia conclusiva para soportar la remoción de inhibición tónica, como ha sido interpretada en varios reportes (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Barrett y Rittenhouse, 2000).

La expresión de los efectos inducidos por el PMA es independiente de que exista, o no, inhibición tónica, como queda demostrado en la Fig. 14. Cabe preguntarse si existen

antecedentes en la literatura de que exista un efecto de tal tipo. La respuesta es afirmativa: se ha demostrado que las corrientes α_{IB} , expresadas en ovocitos, son estimuladas por PKC independientemente de sus efectos sobre la inhibición mediada por PG (Hamid et al., 1999; Stea et al., 1995). Este efecto independiente de la PKC ha sido reportado como que provoca un 50% de incremento en las corrientes totales (Hamid et al., 1999). Así, es al menos posible que el incremento en amplitud del primer componente de voltaje de Boltzmann tras el PMA (~41% más que en el control; ver Tabla 1) podría ser explicado sin invocar la remoción de inhibición tónica. Sin invocar un mecanismo de acción independiente, sería, además, extremadamente difícil explicar de qué manera la PKC da lugar a incrementos independientes de voltaje en la amplitud de corrientes de cola en esta preparación (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994).

Lo anterior nos permite re-evaluar la siguiente pregunta que ha sido planteada en párrafos anteriores: ¿De qué manera se explica que el aumento inducido por activación de la PKC guarde cierta dependencia de voltaje, a potenciales negativos, si no es por un mecanismo de interconversión *reluctant* \rightarrow *willing* (Figs. 10A y 13A)? Se ilustrará una respuesta tentativa con base en el siguiente esquema:



En el panel A se esquematiza un incremento (magnificado *ex profeso*) en la corriente poblacional de $CCDV_N$, representada, en cada caso, por una función doble de Boltzmann. Según se muestra en el panel B, que representa los componentes de cada curva del panel A por separado, este incremento es el resultado de un aumento selectivo en la magnitud del primer componente (nótese que el segundo componente es idéntico en cada caso). El panel C muestra que, este efecto, repercute en un incremento dependiente de voltaje a potenciales negativos e independiente del mismo a potenciales más despolarizantes. Podemos concluir que, un aumento “dependiente de voltaje”, no involucra necesariamente un reordenamiento de $CCDV_N$ entre los modos *reluctant* y *willing* - como ha sido interpretado en trabajos previos (Swartz, 1993; Zhu e

Ikeda, 1994) - sino que puede deberse a un efecto selectivo que altere las características de alguna población particular. En el caso esquematizado, y que reproduce cualitativamente los efectos observados tras el PMA, esta efecto altera exclusivamente a la población *willing*, dejando intacta a la población *reluctant* (Fig. 12E).

¿Puede explicarse la persistencia de inhibición tónica después de la aplicación de PMA? Esta tesis y otros estudios anteriores han mostrado que el tratamiento previo con PMA provoca una atenuación más o menos significativa en la inhibición subsiguiente de la corriente de $CCDV_N$ inducida por NT (Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Shapiro et al., 1996). Sin embargo, la habilidad de la PKC para revertir la inhibición previa de los $CCDV_N$ a través de la activación directa de PG por $GTP\gamma S$ depende de la utilización de *prepulsos* muy largos (>50 ms) y muy despolarizantes (Swartz, 1993; Barrett y Rittenhouse, 2000). Esto último indica que el “orden de aplicación” (Chen y Penington, 1997) es crítico para el resultado final de la convergencia de ambas vías moduladoras (Barrett y Rittenhouse, 2000). Por tal motivo, la PKC puede ser capaz de prevenir la inhibición mediada por PG únicamente si sus efectos son establecidos antes de la activación de estas últimas.

En consecuencia, si existe un cierto nivel de activación basal de PG, es posible que éste pudiera interferir con la modulación por PKC y *viceversa*. Esto es, el enunciado anterior formulado de manera recíproca, es lo que permite plantear la presencia de un componente F_2F_1 en neuronas dializadas con $GTP\gamma S$ (Fig. 24). En otras palabras, un cierto nivel de actividad basal de PKC puede volver, a una pequeña población de $CCDV_N$, resistente a la acción de PG. Con esta conjetura, la fase de activación bifásica de la corriente tras el $GTP\gamma S$ sería concebible como el resultado de la activación de dos poblaciones de canales con patrones de activación e inactivación prácticamente opuestos, y no como el resultado de la activación de una sola población con cinética de activación bifásica e inactivación *enlentecida* (Jones y Elmslie, 1997).

El fundamento molecular para explicar la dependencia de los efectos del “orden de aplicación”, reside en la noción de una competencia por el sustrato (Swartz, 1993; Chen y Penington, 1997; Barrett y Rittenhouse, 2000) entre la PKC y la subunidad $G\beta\gamma$ por sitios comunes en la subunidad α_1 de los $CCDV_N$. La idea básica es que las subunidades $G\beta\gamma$ libres se unen directamente (De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997; Furukawa et al., 1998b), de una

manera dependiente de voltaje (Ehrlich y Elmslie, 1995), a uno o más sitios potenciales en una o más regiones intracelulares de la subunidad α_1 , presumiblemente en una estequiometría 1:1 (Zamponi y Snutch, 1998), y que esta interacción puede prevenir la fosforilación de regiones consenso de PKC sobrelapantes. En este contexto, los *prepulsos* largos y sumamente despolarizantes son necesarios para despegar al complejo $G\beta\gamma$ de la subunidad α_1 y permitir el acceso de la PKC a regiones previamente “enmascaradas” (Barrett y Rittenhouse, 2000). La fosforilación de la subunidad α_1 (en uno o más sitios potenciales) prevendría, a su vez, la subsiguiente unión de $G\beta\gamma$ (Swartz, 1993; Barrett y Rittenhouse, 2000).

Es extremadamente interesante hacer notar, que exactamente el mismo cuadro anterior de competencia por sustrato entre PKC y $G\beta\gamma$ ha sido invocado para explicar la capacidad de las segundas de prevenir la fosforilación por PKC de $PLC\beta$ y de ésta última para inhibir la interacción de $G\beta\gamma$ con la misma (Litosch, 1997). Por lo tanto, puede conjeturarse sobre la posible generalización de un cuadro modulador de este tipo como el sustrato molecular que determine el efecto de vías de regulación convergentes en un efector y divergentes en sus efectos sobre éste. De ser cierto lo anterior, también proveería un modelo interpretativo para explicar la existencia de los grupos G1 y G3 entre las neuronas con sobreexpresión heteróloga de subunidades $G\beta\gamma$: el que el fenotipo de la corriente se incline hacia uno u otro extremo dependería del orden temporal preciso en el que se establezcan los efectos que llevan a uno u otro, de manera que el efecto que se establezca primero inhiba el establecimiento del segundo.

9.3.2. Cambios Inducidos por la PKC en las Cinéticas de Activación e Inactivación

Antes de analizar los efectos que induce la PKC sobre las cinéticas de $CCDV_N$, conviene retomar una discusión que ha quedado pendiente sobre un fenómeno muy llamativo que ha sido observado al analizar los efectos del aumento en inhibición tónica sobre el comportamiento de la corriente. El paréntesis no es ocioso: servirá para dar sustento a la conclusión de que las alteraciones cinéticas inducidas por el pretratamiento con PMA no pueden ser explicadas invocando la remoción de dicha inhibición.

Tanto los *prepulsos* como el $GDP\beta S$ aceleran el curso temporal de la activación de la corriente de $CCDV_N$, solamente a potenciales más positivos que aquellos que evocan corriente entrante

máxima (Figs. 9F y 11F). Esta observación no es nueva: una conclusión similar ha sido planteada por S. R. Ikeda (1991) tras el análisis del efecto de los *prepulsos* en condiciones basales. Sin embargo, lo que interesa subrayar de los resultados de esta tesis es el contraste que tiene con la observación de que los efectos sobre la amplitud de la corriente de ambos procedimientos son máximos a potenciales en los que las alteraciones cinéticas son mínimas (Fig. 10A). Esta marcada separación en la dependencia de voltaje de ambos fenómenos es especialmente notable cuando se analiza el efecto de los *prepulsos* en condiciones en las que la inhibición tónica ha sido experimentalmente elevada por diálisis con GTP γ S (Fig. 11F).

¿De qué manera se explica el fenómeno anterior? La respuesta es simple. Basta con fusionar dos observaciones: (1) El *enlentecimiento* cinético es una característica distintiva de canales inhibidos por PG (e.g. Fig. 24C); (2) Las PG llevan a un marcado corrimiento en la dependencia de voltaje de la activación de los canales inhibidos (Figs. 12D y 20D). Ya que la última observación implica que el punto medio de activación máxima se desplaza a potenciales cercanos al potencial de inversión de la corriente, la lenta activación de canales *reluctant* no contribuye significativamente (en tiempos muy cortos) a la fase global de activación de la corriente a potenciales menos despolarizantes (Fig. 11F), puesto que éstos sólo activan a la población *willing*. Tras los *prepulsos*, la proporción de canales en esta última población se incrementa, de manera que la cantidad de corriente reclutable por despolarizaciones moderadas también aumenta. Ya que el efecto de los *prepulsos* es desplazar el equilibrio *willing* \leftrightarrow *reluctant* hacia la izquierda, esto implica una disminución neta en la población *reluctant*, de manera que su contribución a la fase de activación de la corriente disminuye y, ésta, se activa según patrones normales.

El corolario de la discusión anterior es que, la aceleración en la cinética de activación que induce la PKC a potenciales negativos (Fig. 9F) no puede explicarse sino por alteraciones en la cinética de la población *willing*.

Por otra parte, de acuerdo con reportes anteriores (Ikeda, 1991; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Barrett y Rittenhouse, 2000), se ha encontrado que la remoción de inhibición tónica por el GDP β S aumenta la inactivación de la corriente de CCDV_N. Sin embargo, las amplitudes relativas de los componentes de la inactivación (ver Tabla 2) son afectados más fuertemente que las constantes de tiempo (Tabla 2) o la dependencia de voltaje de la inactivación (inserto Fig. 15F). Esta conclusión se ajusta con los resultados de la Fig. 22 y la interpretación de la Fig. 24C: los

canales inhibidos por PG **no** inactivan. Esto se traduce en lo siguiente. Si hay una fracción de canales tónicamente inhibidos, su contribución al comportamiento general de la inactivación de la corriente será una disminución proporcional en la cantidad de inhibición global, que no tiene porqué afectar la dependencia de voltaje ni la cinética de inactivación en estado estacionario de la fracción no inhibida.

Lo anterior es consistente con varios trabajos previos (Bean, 1989b; Boland y Bean, 1993; Elmslie y Jones, 1994), en los que se ha notado que la inhibición inducida por NT tiene sólo efectos marginales sobre la dependencia de voltaje de la inactivación.

En contraste, la activación de la PKC induce un corrimiento negativo en la dependencia de voltaje de la inactivación (inserto Fig. 15F), una reducción en la asíntota de inactivación a potenciales positivos del pulso condicionante (Fig. 15F), y altera las constantes de tiempo de la inactivación durante el pulso (Fig. 16B y Tabla 2). Estas alteraciones en el patrón de inactivación son particularmente congruentes con las predicciones del modelo propuesto por el grupo de D. T. Yue (Patil et al., 1998; Jones et al., 1999). Esta propuesta predice que, pequeños incrementos en la inactivación desde el estado abierto (Fig. 16A y B), generan reducciones sustanciales en la asíntota de inactivación con despolarizaciones saturantes (Fig. 15F). La recíproca de este efecto está dada por la prácticamente total eliminación de inactivación en estado estacionario que induce la inhibición por PG (Figs. 22 a 24) y que repercute en una marcada “*sobrecuperación*” de la corriente en este rango de potenciales (Fig. 22D). Así, el pretratamiento con PMA, al desencadenar un aumento en la tasa de inactivación de estado abierto, puede modificar el patrón con forma de U de la inactivación dependiente de voltaje.

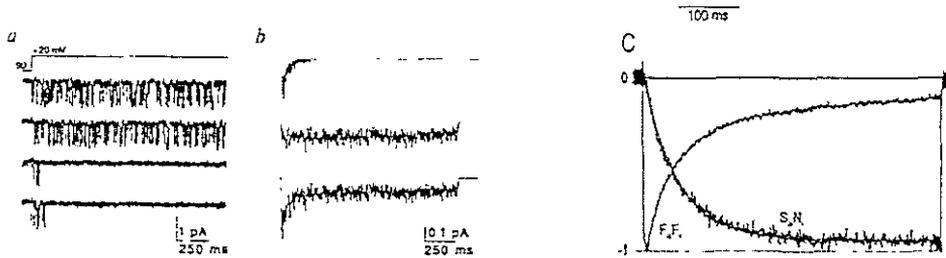
En realidad, cabe una interpretación alternativa a lo anterior. Puede asumirse que la tasa de inactivación desde el estado abierto sea *cuasi* nula en todas las condiciones y que la tasa de inactivación que se vea modificada antagónicamente por PKC y PG sea la inactivación acoplada al último estado cerrado del canal. Ya que la transición entre éste y el estado abierto es independiente de potencial (Boland y Bean, 1993; Carbone et al., 1998), las repercusiones esperables en este último caso podían ser similares a las de acoplar una tasa de inactivación al estado abierto.

Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels

Mark R. Plummer* & Peter Hess†

Modulation of N-type Ca^{2+} channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons

Rafael E. García-Ferreiro, Erick O. Hernández-Ochoa and David E. García



Ilustr. 14 *Alternancia entre modos de apertura inactivante y no-inactivante de CCDV_N* . Panel izquierdo, *a* Registro de la actividad de un único CCDV_N registrado en el modo de *cell-attached* en una neurona simpática en cultivo proveniente del SCG de rata. Trazos seleccionados (no consecutivos) en respuesta a una larga despolarización (1.4 s) desde -90 a $+20$ mV con 110 mM Ba^{2+} como acarreador de carga. *b*, Promedio de corrientes unitarias con actividades inactivantes (parte superior), corrientes con actividad sostenida durante el pulso de prueba (parte central), y de todos los trazos con actividad del canal (parte inferior). Los registros fueron clasificados como no-inactivantes si no se detectaron aperturas más allá de los 450 ms después del inicio del pulso de prueba. “...long- and short-bursting patterns remain correlated over the duration of the interpulse interval... The slow transition rates suggest a reversible, covalent modification of the channel protein...” Panel derecho, ver descripción de la Fig. 24C.

La propuesta anterior se ajustaría de manera más sencilla con otros efectos del PMA, ya que, la inactivación desde estados cerrados es seguramente afectada tras dicho tratamiento pues, corrimientos en el punto medio de la inactivación por *prepulsos* hacia voltajes más negativos son predichos por el modelo invocado si existe un incremento en el número de estados cerrados a partir de los cuales ocurre inactivación sustancial (Patil et al., 1998). Por lo tanto, ambas observaciones pueden ser explicadas a la vez, de la manera más simple asumiendo solamente modificaciones en la tasa de inactivación desde estados cerrados.

De cualquier manera, y al margen de la validez de las consideraciones anteriores, estos resultados apoyan la sugerencia de K. J. Swartz (1993) de que la fosforilación inducida por PKC podría controlar un proceso de inactivación independientemente de sus efectos sobre la inhibición mediada por PG. Este efecto de la fosforilación sobre CCDV_N está en acuerdo con las conclusiones del grupo de K. S. Elmslie (Werz et al., 1993). Estos autores encontraron que el inhibidor de fosfatasa, el ácido okadáico aumenta la inactivación dependiente de voltaje de estos

canales en neuronas simpáticas del sapo, y concluyeron que este efecto resulta de la fosforilación ya que es prevenido por estaurosporina.

Se ha demostrado que $CCDV_N$ farmacológicamente identificados en neuronas individuales pueden inactivar con marcadas diferencias en la tasa y magnitud de la misma (Jones y Marks, 1989b; Plummer et al., 1989; Jones, 1998). De manera interesante, M. R. Plummer y P. Hess (1991) han mostrado que $CCDV_N$ individuales pueden alternar entre modos de apertura inactivantes y no inactivantes. Los resultados presentados en esta tesis (Fig. 22 a 24) apoyan la proposición de Werz et al., (1993) de que los $CCDV_N$ pueden inactivar a través de estas vías dependiendo de su estado de fosforilación (Ilustr. 14).

9.4. LA ACTIVACIÓN DE LA PKC INTERFIERE CON LA INHIBICIÓN POR PG

La última pregunta que ha sido abordada en este trabajo tiene que ver con la interferencia que tiene la activación previa de la PKC con la inhibición subsiguiente inducida por PG.

Amplia literatura apoya el hecho de que la PKC es capaz de prevenir ciertos efectos moduladores de las PG sobre los $CCDV_N$ (Lester y Jahr, 1990; Swartz et al., 1993; Swartz, 1993; Zhu e Ikeda, 1994; Shapiro et al., 1996). Sin embargo, la interferencia que se ha observado es siempre parcial y poca importancia se le ha dado a este hecho. ¿A qué se debe que la prevención no sea completa? El grupo de B. Hille (Shapiro et al., 1996) ha sugerido que el grado de efecto variable puede ser correlacionado con una prevención selectiva de vías delimitadas a membrana y no de vías de señalización que involucran segundos mensajeros citoplasmáticos. Dado que distintos NT están acoplados en grado variable a vías de señalización delimitadas y no a membrana, es al menos plausible que la PKC interfiera con la inhibición causada por unos y no por otros.

Al margen de la validez de la hipótesis anterior, no puede explicarse en estos términos la inhibición inducida por NE en neuronas tratadas con PMA puesto que su mecanismo de transducción de señales intracelular da lugar puramente a vías delimitadas a membrana (Beech et al., 1991, 1992; Bernheim et al., 1991; Mathie et al., 1992; Shapiro et al., 1994a,b; Zhou et al., 1997; Delmas et al., 1998b, 1999). Por tanto, una vía exclusivamente delimitada a la membrana sigue induciendo efectos tras la activación de la PKC, y la parcialidad de la inhibición debe

establecerse a otro nivel. La hipótesis a este respecto, fue la siguiente: las vías delimitadas a membrana no son homogéneas e incluyen componentes tanto VD como VI. Por ende, para buscar una respuesta se han analizado las características electrofisiológicas de la inhibición no ocluida por PKC.

En términos electrofisiológicos, dos tipos de patrones inhibitorios son claramente distinguibles tras la activación, directa ó indirecta, de las PG: aquéllos que dependen de potencial (VD) y aquellos que no (VI). El componente VD muestra las siguientes características: (1) Su magnitud es inversamente proporcional al potencial de prueba (Marchetti et al., 1986; Bean, 1989b; Kasai, 1992); (2) Da lugar a un *enlentecimiento* en la cinética de activación de la corriente (Deisz y Lux, 1985; Marchetti et al., 1986; Bean, 1989b; Kasai, 1992); y (3) La inhibición es transitoriamente revertida por una fuerte despolarización (Grassi y Lux, 1989; Elmslie et al., 1990; Ikeda, 1991).

Todas las características anteriores que definen a la inhibición VD se encuentran completamente ausentes en las neuronas pretratadas con PMA: (1) El análisis de corrientes de cola no reveló ninguna alteración importante en la dependencia de voltaje; (2) No hubo alteraciones en la cinética de activación de la corriente; (3) Los *prepulsos* no produjeron ningún aumento en la amplitud de la corriente, sino un decremento en ella. Así, por definición, la inhibición VD fue completamente *prevenida* por el tratamiento con PMA.

Por otra parte, la presencia del componente VI es evidente por una reducción porcentual neta en la cantidad de corriente que puede ser evocada por un pulso de prueba, sin que presente ningún signo claro de alteraciones ni en la cinética de la corriente ni en su dependencia de voltaje (Beech et al., 1992; Luebke y Dunlap, 1994), ni ninguna reversión apreciable por *prepulsos* (Luebke y Dunlap, 1994; Shapiro et al., 1994b; Delmas et al., 1999).

El patrón inhibitorio observado en neuronas pretratadas con PMA sigue a la perfección la descripción anterior. La postura que se sostiene, entonces, es que la parcialidad de la interferencia es explicable en términos de una interrupción de vías que dependen de potencial frente a aquellas que no dependen de éste. El problema está, por tanto, en tratar de explicar qué mecanismo haría esto posible. La dificultad en hacerlo se encuentra básicamente en lo pobremente caracterizada que se encuentra la inhibición VI.

En párrafos anteriores se ha especulado respecto de la posible participación de las subunidades $G\beta\gamma$ en, al menos parte, de la modulación VI (aquella que concierne a la vía *fan*) y, en particular, el hecho de que pudiese originarse por un mecanismo similar a la modulación VD. Es decir, la interacción directa de éstas con la subunidad α_1 de los $CCDV_N$. Si esto probase ser cierto, ¿Involucrarían, sin embargo, ambos tipos de modulaciones a las mismas regiones del canal? A este respecto, los resultados presentados en esta tesis, con base en las acciones selectivas de la PKC sobre dichas modulaciones, permiten postular algunas hipótesis.

Según las evidencias presentadas en la literatura, la prevención de la inhibición VD por la PKC parece residir, a nivel molecular, en una competencia por unión entre dicha enzima y las subunidades $G\beta\gamma$ en ciertas regiones del *loop I-II* de la subunidad α_1 del canal (ver 3.2.1). Sin embargo, también es cierto que no todos los datos son consistentes con el que esta región citoplasmática forme un sitio único para la modulación por PG (revisado en Dolphin et al., 1999). En particular, interesa hacer notar que existen evidencias de que la región *C-terminal* contiene también sitios críticos para la completa expresión de la misma (Zhang et al., 1996a; Qin et al., 1997; Furukawa et al., 1998a,b). La razón del interés en lo anterior se debe a que, dicha región, no parece estar involucrada en los cambios inducidos por la PKC en la actividad del canal dado que no contiene sitios de fosforilación dependiente de esta enzima (Hell et al., 1994; Zamponi et al., 1997; Hamid et al., 1999). Por tanto, existen, en la subunidad α_1 , múltiples sitios de interacción con $G\beta\gamma$ (Ilustr. 4). Algunos de estos sitios son sujeto de fosforilación por PKC y otros no lo son (Ilustr. 12). De esta manera, a partir de los resultados aquí expuestos, es posible conjeturar que la fosforilación mediada por PKC de la subunidad α_1 podría no interferir con la interacción de $G\beta\gamma$ con sitios no involucrados en la inhibición VD, sino, tentativamente, en la VI.

De manera interesante, Furukawa et al., (1998a,b) han reportado que la inhibición mediada por $G\alpha_3$ (asociada con un patrón inhibitorio VI por Delmas et al., 1998b, 1999) no es alterada por mutaciones en el *loop I-II*, pero es prevenida por coinyección de dos péptidos sintéticos con secuencias derivadas de tanto el *loop I-II* como del *C-terminal*. Así, ya sea que esta modulación adicional mediada por G, sea llevada por subunidades $G\alpha$ (propuesto por Furukawa et al., 1998b) o por subunidades $G\beta\gamma$ (como es sostenido por Delmas et al., 1999, y soportado por las

evidencias de Qin et al., 1997), estos resultados darían prueba adicional para apoyar la idea de que existen múltiples sitios de interacción con PG en diferentes dominios intracelulares y que estos sitios distintos podrían ser responsables de que se lleven a cabo diferentes componentes de la inhibición por PG y que, a su vez, sean sujeto de regulación diferencial por PKC. Asumiendo que la inhibición VI se lleva a cabo por una interacción de baja afinidad entre $G\beta\gamma$ y el canal abierto (ver 3.1.2.1), podría postularse, además, que el *loop I-III* podría contener un sitio de afinidad para $G\beta\gamma$ más alta que aquel presente, tentativamente, en el *C-terminal*.

Esta hipótesis tiene la ventaja adicional de aportar un marco interpretativo al hecho de que la PKC bloquee la mayor parte de la inhibición inducida por NE: dado que se ha demostrado que dos isoformas de la subunidad α_{1B} (Westenbroek et al., 1992), que difieren en la longitud de su región *C-terminal* (Hell et al., 1994), pueden ser expresadas en tejidos nerviosos, es posible considerar que la fosforilación por PKC puede prevenir la mayor parte de la inhibición por PG al inhibir completamente los efectos VD en ambas isoformas, pero es incapaz de prevenir la interacción de baja afinidad de $G\beta\gamma$ con el *C-terminal* de la isoforma más larga.

9.5. ¿PUEDE COMPAGINARSE UN ESQUEMA CINÉTICO TENTATIVO PARA DAR CUENTA DE LOS FENÓMENOS OBSERVADOS?

*"Everything should be made
as simple as possible
but not simpler."*

A. Einstein

En el Planteamiento del Problema se hizo notar que, de demostrarse la existencia de una vía de modulación positiva de los $CCDV_N$, el modelo *willing-reluctant* sería insuficiente para explicar el cuadro de modulación completo de estos canales. Toda la discusión que hasta el momento se ha presentado ha estado encaminada a sostener la conclusión de que, justamente, la modulación de $CCDV_N$ existe, por lo menos en el caso particular de las neuronas simpáticas que han servido de modelo experimental. Entonces, ¿Qué tipo de modelo cinético se ajusta a las observaciones aquí descritas?

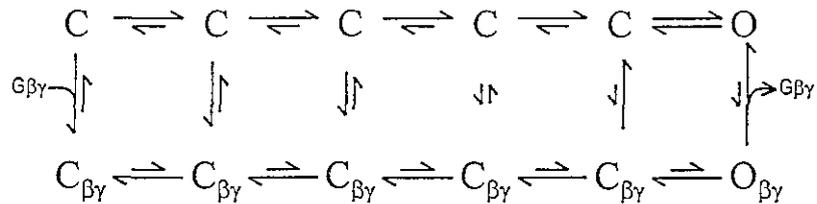
El esquema cinético tentativo, que a continuación se presenta, se fundamenta en lo siguiente:

- 1) Las características cinéticas de la corriente de $CCDV_N$ tras la activación de la PKC son distintivas de un modo operativo de “actividad estimulada” (AE) de dichos canales que se diferencia claramente del modo operativo de “actividad basal” (AB) propio de canales no-modulados.
- 2) La presencia de inhibición tónica en neuronas pretratadas con PMA, y la oclusión de la inhibición VD tras la activación de la PKC, indican que los modos operativos de “actividad inhibida (VD)” (AI_{VD}) y de AE son mutuamente excluyentes. Por lo tanto, los resultados presentados **no contradicen** al modelo *willing-reluctant*, que explica las transiciones $AB \leftrightarrow AI_{VD}$.
- 3) Son características cinéticas de los canales en el modo operativo AI_{VD} , aquellas descritas para el componente S_aN_i (Fig. 24C). Esto es: (1) Cinética de activación *enlentecida* (Fig. 11F); (2) Ausencia de inactivación dependiente de voltaje (Fig. 22D); y (3) Corrimiento hacia potenciales despolarizantes en la dependencia de voltaje de la activación de la corriente poblacional (Fig. 20D).
- 4) Son características cinéticas de los canales en el modo operativo AE, aquellas descritas para el componente F_aF_i (Fig. 24C). Esto es: (1) Aceleración dependiente de voltaje en las cinéticas de activación (Fig. 9F) e inactivación de la corriente (Fig. 16B); y (2) Corrimiento hacia potenciales hiperpolarizantes en la dependencia de voltaje de la inactivación de estado estacionario (Fig. 15F).
- 5) El comportamiento cinético de los $CCDV_N$ en el modo operativo AB se encuentra en una posición relativa “intermedia” entre los comportamientos extremos descritos, y es similar al de la corriente de las neuronas dializadas con $GDP\beta S$ (Fig. 16A). Esto es: (1) Similar dependencia de voltaje de activación que el modo operativo AE, pero con cinéticas de activación e inactivación más lenta a potenciales hiperpolarizantes (Fig. 9F); y (2) Inactivación parcial y preferencialmente acoplada a los estados cerrados intermedios (Fig. 15F).

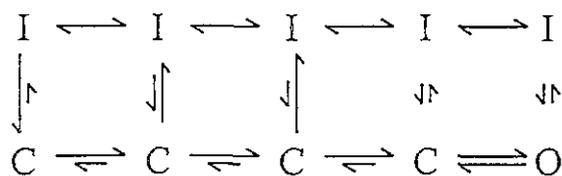
Tomemos de la literatura dos modelos cinéticos que servirán de base para el esquema que se desea plantear: el modelo de “inactivación preferencial desde el estado cerrado” (*preferential closed state inactivation*; Patil et al, 1998; Jones et al, 1999) y el modelo de “intercambio permisivo”

(*permissive exchange*; Patil et al., 1996; Colecraft et al., 2000), planteados ambos por el grupo de D. T. Yue para explicar la inactivación en forma de U de corrientes no-moduladas y la inhibición VD, respectivamente.

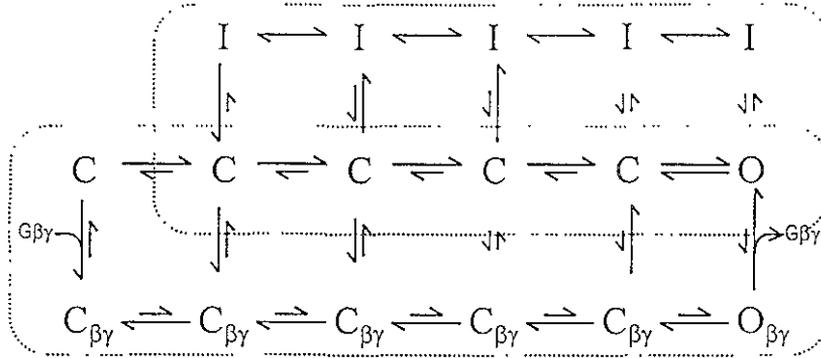
El modelo de *intercambio permisivo* es una formalización de la versión del modelo *willing-reluctant* propuesta por Elmslie y cols., que se describió ampliamente en el apartado 3.1.1.2 de los Antecedentes (ver Ilustr. 7). La versión de Yue simplemente incorpora a este último la existencia de varios estados cerrados, cuya afinidad por las subunidades $G\beta\gamma$ decrece a medida que se encuentran más cercanos al estado abierto:



Por otra parte, el modelo de inactivación preferencial desde estados cerrados es una formalización del modelo de inactivación de $CCDV_N$ desde el estado cerrado, propuesto por Jones y Marks (1989b). En particular, este modelo predice una inactivación incompleta y con una dependencia de voltaje con forma de U - y corrida hacia potenciales hiperpolarizantes respecto de la curva de activación de la corriente (Figs. 15F *versus* E y 22D *versus* B)-, al acoplar la mayor tasa de inactivación de los canales en estados conformacionales cerrados cercanos al estado abierto:

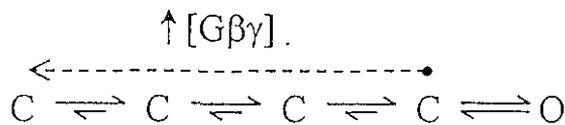


Ahora, juntemos ambos modelos de la siguiente manera:



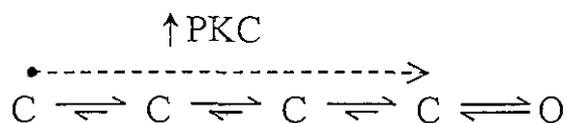
Este esquema, que no es, hasta el momento, más que una superposición de dos esquemas cinéticos publicados, explicaría tanto la inhibición VD como la inactivación parcial de las corrientes basales. Por lo tanto, se propone que este esquema explica las transiciones entre los estados de $AI_{VD} \leftrightarrow AB$, así como las características cinéticas de cada uno.

¿Y las transiciones $AB \leftrightarrow AE$ y las características cinéticas de este último modo operativo? Planteemos una respuesta tentativa con base en una pregunta sencilla. Parafraseando la metáfora empleada por el grupo de Yue, el incrementar la concentración de subunidades $G\beta\gamma$ repercutiría, en el esquema propuesto, en que los canales se vieran “empujados hacia conformaciones cerradas profundas, alejadas del estado abierto”. En un esquema lineal, esto podría representarse como:



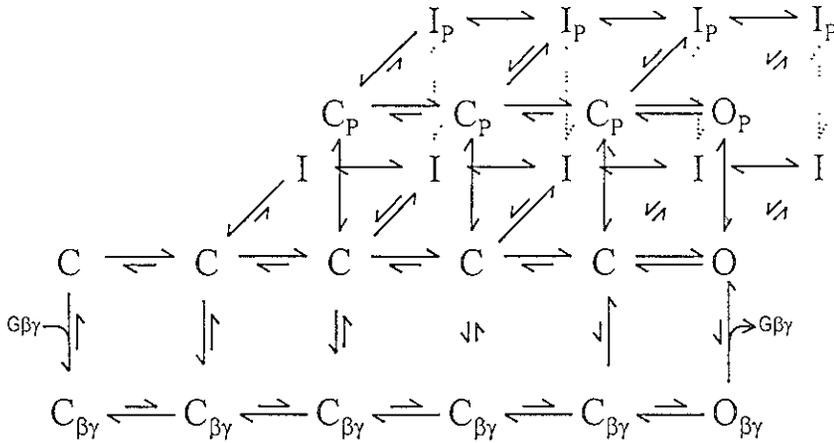
En el esquema anterior, la “promoción” de estados “cerrados profundos” (*deep closed-states*; Patil et al, 1996) por las PG llevaría a que la corriente poblacional se active más lentamente, pero también “protegería” a los canales de sufrir inactivación dependiente de voltaje. Esto es, describe *gravo modo* el comportamiento de canales en el modo operativo M_{VD} .

Ahora, ¿Qué sucedería en caso de existir una modulación que “empuje los canales hacia conformaciones cerradas cercanas al estado abierto”? En otras palabras, ¿Qué sucedería si la PKC lleva a los canales, a través de la ruta de activación, en sentido contrario al que lo hacen las subunidades Gβγ?. Esta proposición, puede esquematizarse de la siguiente manera:



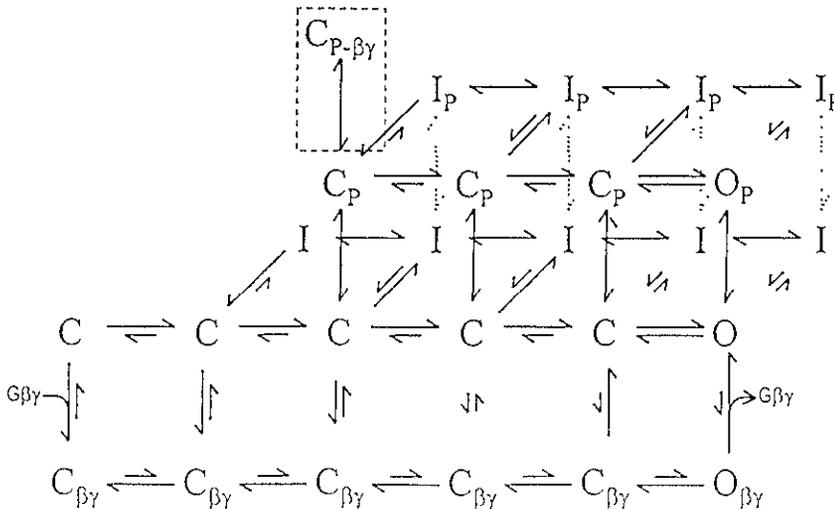
En el modelo de inactivación preferencial desde estados cerrados, claramente sería esperable un aumento en la tasa de inactivación en estado estacionario (por estar acoplada ésta preferentemente a los estados cerrados cercanos al abierto). Sin embargo, también podría predecirse una activación más rápida de la corriente, puesto que, una mayor concentración de canales en estados cercanos al abierto, implicaría una activación más sincrónica y homogénea de los mismos. Si, a las características anteriores les sumamos un incremento en la tasa de activación desde el estado abierto y/o el estado cerrado más próximo a éste, las características de las corrientes corresponderían, *grosso modo*, con el estado de modulación correspondiente a la “actividad estimulada” descrita. (El aumento en la amplitud de la corriente pico en este esquema sería consecuencia del punto (2) descrito, esto es, una activación sincrónica de los canales, significaría un aumento en la corriente pico temprana).

El problema con tratar de conformar un esquema $AI_{VD} \leftrightarrow AB \leftrightarrow AE$, se encuentra en el hecho de que un diagrama bidimensional no alcanza para representarlo: un canal en estado cerrado del modo AB podría transitar a cuatro estados posibles (abierto, inactivado, cerrado inhibido o cerrado estimulado). En consecuencia, se requiere de una representación tridimensional:



En el esquema anterior, las transiciones en los ejes x y y corresponden a transiciones dependientes de voltaje, mientras que aquellas que se encuentran representadas en el eje z son independientes de éste. Los estados cerrados, abiertos e inactivados **sin** subíndice corresponden a los estados de los $CCDV_N$ del modo AB, mientras que aquellos que contienen el subíndice " $\beta\gamma$ " y "P" corresponden a los modos AI_{VD} y AE, respectivamente.

Se propone aquí que el modelo anterior está en condiciones de explicar la mayoría de las observaciones que se han reportado. Todavía puede incorporarse un estado adicional de los canales para describir el hecho de que los canales AE todavía son sujeto de inhibición VI. Si, como se ha propuesto anteriormente, este estado es promovido por subunidades $G\beta\gamma$, entonces se podría representar de la siguiente manera:



En este último esquema, el estado $C_{p,\beta\gamma}$ corresponde a la inhibición VI de canales en modo operativo AE. No se pretende llevar más lejos esta discusión. En particular, tres puntos no pueden ser derivados de ninguno de los resultados que se han obtenido: (1) Las transiciones permisivas entre los modos operativos AB y AE, esto es, si los canales en AB en cualquier estado (o en uno particular) son sujeto de fosforilación; (2) Si existe, o no, una transición posible $C_{p,\beta\gamma} \leftrightarrow C_{\beta\gamma}$, esto es, si los canales fosforilados pueden ser sujeto de la acción de una fosfatasa en presencia de una interacción de baja afinidad entre las subunidades α_1 de los $CCDV_N$ y $\beta\gamma$ de las PG; y (3) El número de estados posibles en cada modo de apertura y las tasas de transición entre éstos.

9.6. SIGNIFICADO FUNCIONAL E IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS

El conjunto de los resultados presentados en esta tesis favorece la siguiente interpretación. La liberación de subunidades $G\beta\gamma$, tras la activación de un RHH, da lugar a una señalización **divergente** (en términos de la vía de transducción seguida), **antagónica** (respecto de sus efectos) y **confluyente** (en los $CCDV_N$) (Ilustr. 15).

Esto abre la vía para dar respuesta a tres preguntas fundamentales que aguardan contestación en la literatura: *Cómo*, *Cuándo* y *Dónde* la PKC es activada durante el funcionamiento normal del sistema nervioso (Bean, 2000). La respuesta común a todas ellas sería entonces: la PKC puede ser activada simultáneamente con las vías de regulación negativa de los $CCDV_N$ (Ilustr. 15A), pero sus efectos se encuentran normalmente enmascarados por los efectos inhibitorios comúnmente analizados (Ilustr. 15B).

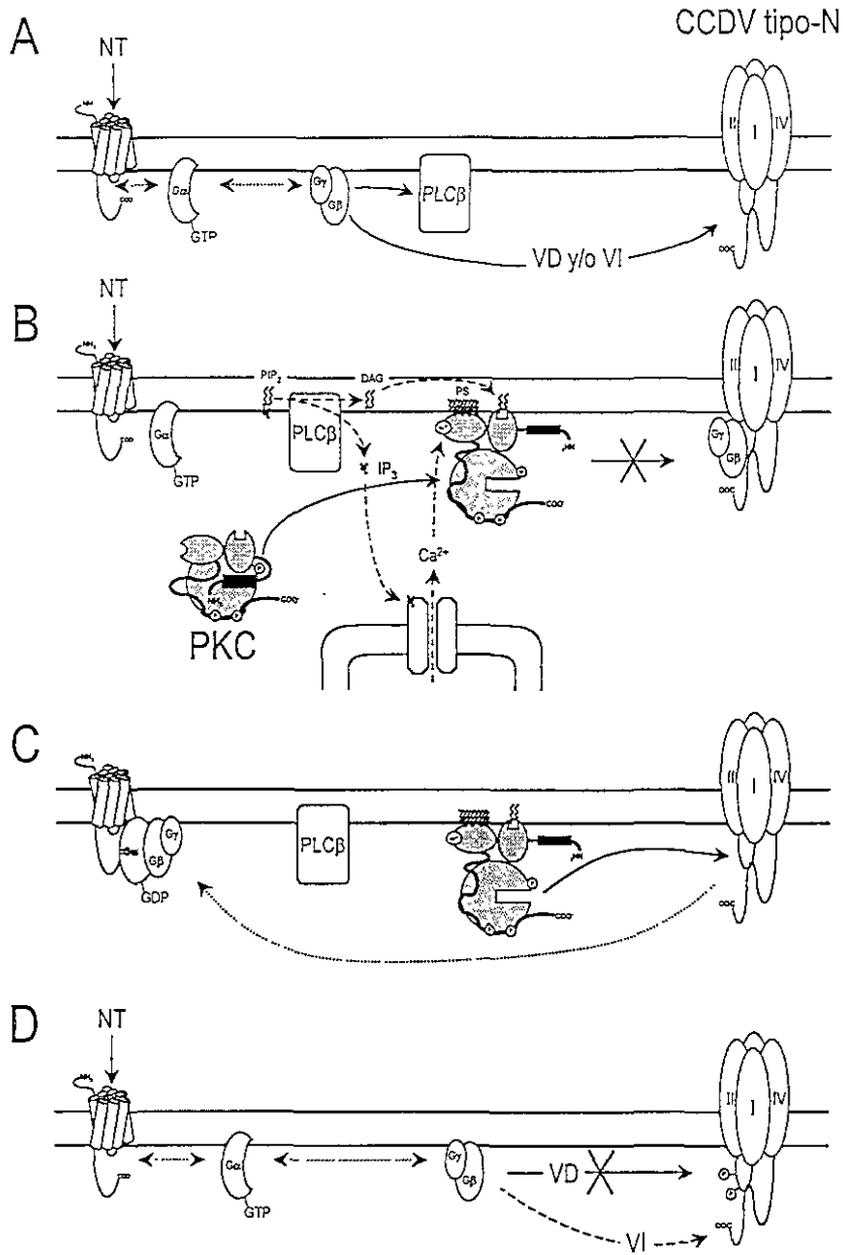
En particular, la activación de la PKC podría revelarse dentro de un fenómeno conocido como “rebote de facilitación” (*rebound facilitation*; Kasai, 1991). Este término se refiere a que, en ciertas preparaciones, al *off* de un pulso de algunos inhibidores particulares, la corriente crece hacia niveles superiores a aquellos que tenía antes del *on*. Si la PKC estuviese involucrada, esto resolvería dos problemas simultáneamente: (1) La naturaleza del incremento; (2) La naturaleza de la activación fisiológica de esta enzima. Es decir, algunos NT inducirían una modulación bidireccional de $CCDV_N$, con efectos inhibitorios y estimuladores que se sucederían secuencialmente (Ilustr. 16; Morikawa et al., 1999).

Un trabajo del grupo de H. D. Lux (Zong y Lux, 1994) es de particular importancia para sostener la interpretación anterior. Este grupo encontró que, en condiciones de perfusión intracelular con GTP γ S, los efectos inicialmente depresores de este último sobre la corriente de CCDV de DRGs de pollo, son seguidos, a tiempos más largos (~ 20 minutos) de un efecto estimulador de la corriente (Ilustr. 17). De manera interesante: (1) La corriente estimulada alcanza valores que casi duplican la corriente inicial (antes de la aplicación de GTP γ S); y (2) La estimulación, más no la inhibición, es bloqueada por dos inhibidores de la PKC (H7 y PKC₁₉₋₃₆).

Puede proponerse por tanto que la activación de la PKC constituye una señal latente y que la manifestación de sus efectos son condicionales a la remoción de la inhibición directa por subunidades G $\beta\gamma$, de manera que, mientras los canales estén inhibidos, no puedan ser fosforilados (Ilustr. 15B). Sin embargo, al removerse el agonista, la PKC tendría acceso a regiones previamente “enmascaradas” por subunidades G $\beta\gamma$ (Ilustr. 15C), lo que llevaría a un incremento en las corrientes y a una prevención selectiva de la inhibición VD (Ilustr. 15D). Este sería un mecanismo de desensibilización de una respuesta inhibitoria no llevada a cabo en los RHH y tendría la ventaja sobre esta última de proveer un sitio común de manera que una respuesta a un NT pudiera verse prevenida por la historia previa de la neurona a otro de estos mediadores químicos. Adicionalmente, el que siga existiendo inhibición VI podría permitir que un cierto NT tenga “efectos secundarios” frente a algunos NT y no frente a otros (frente a los que induzcan VD y no frente a los que induzcan VI).

Desde el primer reporte de modulación de CCDV neuronales (Dunlap y Fischbach, 1978), ninguno de los múltiples papeles que éstos juegan (ver Introducción) ha recibido tal número de atenciones como aquél vinculado con la liberación de NT (Jones y Elmslie, 1997). Es por ello que la búsqueda del significado fisiológico posible de los resultados aquí presentados, sea más sencilla en este terreno que en cualquier otro.

Hasta ahora, el papel fisiológico más claro de la inhibición por PG de los CCDV_N se encuentra en proveer uno de los mecanismos de inhibición por NT de la transmisión sináptica, al reducir la entrada de Ca²⁺ a la terminal presináptica (Hirning et al., 1988). Existen muchos paralelos entre las acciones de los NT en CCDV_N (generalmente estudiados en los cuerpos celulares) y la transmisión sináptica (a pesar de que las PG actúan, también, más directamente

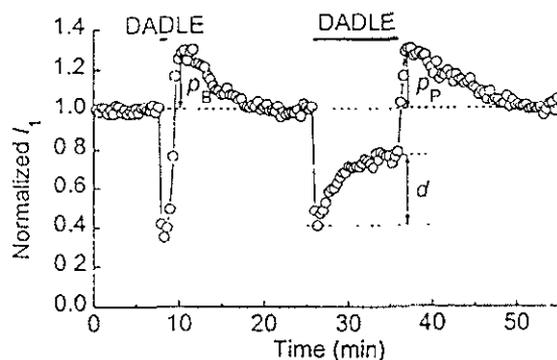


Ilustr. 15 Modulaciones divergentes, antagónicas y confluentes de $CCDV_N$ inducida por subunidades $G\beta\gamma$. A El heterodímero $G\beta\gamma$ activo sigue dos vías delimitadas a membrana. B Activación de la PKC por los productos de la hidrólisis del PIP_2 por la $PLC\beta$ activada por $G\beta\gamma$. La interacción directa de este último con la subunidad α_1 de los $CCDV_N$ previene la fosforilación de éstas por la PKC. C El despegue de $G\beta\gamma$ permite el acceso de la PKC a las regiones previamente "enmascaradas" en la subunidad α_1 . D La fosforilación del *loop I-II* por la PKC impide la unión de $G\beta\gamma$ con los $CCDV_N$ en esta región (y bloquea, por tanto, la inhibición VD), pero no excluye el establecimiento de inhibiciones VI. Abreviaturas: $PLC\beta$, fosfolipasa $C\beta$; PIP_2 , inositol 4,5-bisfosfato; IP_3 , inositol 1,4,5-trisfosfato; PS, fosfatidilserina; DAG, 1,2-diacilglicerol.

sobre la liberación al inhibir pasos aún desconocidos de la exocitosis) (Bean, 2000). En particular, se ha demostrado que la activación de PG se correlaciona con una reducción en la cantidad Ca^{2+}

Hitoshi Morikawa · Hiroyuki Mima · Hisatoshi Uga
Takehiro Shoda · Kazuhiko Fukuda

Opioid potentiation of N-type Ca^{2+} channel currents via pertussis-toxin-sensitive G proteins in NG108-15 cells



Ilustr. 16 *Sobre-recuperación de corrientes de CCDV_N* . Curso temporal de los efectos de un agonista al receptor δ -opioide (DADLE, 100 nM) sobre corrientes totales de Ba^{2+} - registradas en una línea celular híbrida (neuroblastoma x glioma) - evocadas por pulsos de prueba a 0 mV, desde un potencial de mantenimiento de -40 mV.

que entra a través de CCDV_N durante una despolarización individual similar a un PA (Park y Dunlap, 1998).

Según lo aquí expuesto, un efecto opuesto debería encontrarse en condiciones que favorezcan la fosforilación. Esto no es nuevo. Un incremento en la corriente de Ca^{2+} por fosforilación ya ha sido propuesto como un posible mecanismo por el cual la activación de la PKC podría conducir a un incremento en la liberación de NT durante despolarizaciones breves (Swartz, 1993, Yang y Tsien, 1993, Zhu e Ikeda, 1994), y también se ha observado que los ésteres de forbol pueden reducir o eliminar la inhibición por NT en todas las sinápsis en las que han sido probados (Swartz et al., 1993).

Sin embargo, resulta interesante especular acerca del comportamiento que tendrían CCDV_N modulados por una u otra vía durante un período de actividad intensa, esto es, durante un tren de PA. Hoshi et al., (1984) fueron los primeros en sugerir que el fenómeno de la facilitación de corrientes de CCDV por voltaje podría jugar un papel importante en el incremento en la liberación de NT de las terminales nerviosas presinápticas durante la estimulación con altas frecuencias. Estudios subsecuentes han apoyado esta proposición al mostrar que la inhibición

VD por PG de $CCDV_N$ puede ser transitoriamente liberada por despolarizaciones similares a un tren de PA, conduciendo a un incremento progresivo en la entrada de Ca^{2+} (Park y Dunlap, 1998). Este fenómeno es dependiente tanto del número como de la frecuencia de dichas estimulaciones (Williams et al., 1997; Park y Dunlap, 1998; Brody y Yue, 2000). En consecuencia, estas observaciones han sido interpretadas como que los *prepulsos* tiene un correlato fisiológico con la tasa de disparo de las neuronas. Por ello, se piensa que la “facilitación sináptica”, que es inducida por estimulación de alta frecuencia de una terminal sináptica, tiene un correlato directo con la facilitación de corrientes de $CCDV_N$ (Williams et al., 1997; Dolphin, 1998).

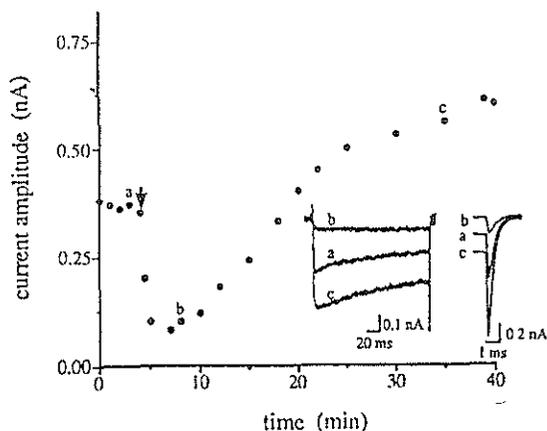
¿Qué sucedería con los $CCDV_N$ fosforilados? Es factible pensar que la inactivación dependiente de voltaje aumentada después de la fosforilación podría aumentar la cantidad de inactivación de la corriente durante un tren de PA. Por tanto, es esperable que la potenciación inicial en la entrada de Ca^{2+} a través de canales fosforilados será seguida de una fuerte depresión debido a la inactivación dependiente de voltaje acumulada entre los PA. Si esto fuera así, dos patrones opuestos de entrada de Ca^{2+} a una terminal tendrían lugar en condiciones que favoreciesen la inhibición VD por PG y la activación de la PKC. La primera originaría una entrada de Ca^{2+} inicialmente disminuida que se incrementaría a lo largo del tren de PA y la segunda provocaría una entrada inicial potenciada seguida de una fuerte depresión de la corriente.

Puede postularse que estos cursos temporales en la entrada de Ca^{2+} opuestos, durante estimulaciones repetidas estén relacionados con patrones integrativos diferentes que llevarían, a su vez, a cursos temporales de descarga distintos de una terminal nerviosa. En particular, el patrón propuesto de entrada de Ca^{2+} a través de canales fosforilados, durante una estimulación de alta frecuencia, podría ser uno de los mecanismos que explique porqué una potenciación inicial en la liberación de NT podría ser seguida de una depresión sináptica aumentada en condiciones que favorezcan la activación de la PKC (p.e., Shapira et al., 1987).

Las conjeturas anteriores llevarían a plantear el siguiente modelo evidente: activación de PKC \rightarrow incremento de la entrada de Ca^{2+} \rightarrow aumento en la liberación de NT. Sin embargo, hasta ahora, dicha correlación no ha podido ser probada. No sólo eso, las evidencias que se han acumulado suelen ser contrarias a esta idea: no ha podido registrarse un incremento neto en la entrada de Ca^{2+} en terminales sinápticas tras la estimulación de la PKC que sí aumenta la

Augmentation of Calcium Channel Currents in Response to G Protein Activation by GTP γ S in Chick Sensory Neurons

Xiangang Zong and Hans D. Lux



Ilustr. 17 Inhibición temprana y aumento tardío de corrientes de $CCDV_N$ en respuesta a la activación directa de proteínas G. Curso temporal de los efectos del GTP γ S sobre corrientes totales de Ba^{2+} - registradas en una neurona sensorial en cultivo, proveniente del DRG de pollo - evocadas por pulsos de prueba a 0 mV, desde un potencial de mantenimiento de -70 mV. La flecha marca el inicio de la perfusión de la solución de pipeta con GTP γ S (250 μ M). El inserto muestra los trazos de corriente registrados en los momentos marcados en la gráfica.

liberación de NT. Lo anterior ha llevado a que se piense que el aumento en esta última por PKC es independiente de Ca^{2+} .

¿Contradice lo anterior las observaciones aquí reportadas? En absoluto. Simplemente, hay que tomar en cuenta un factor adicional que se presenta en condiciones fisiológicas: el potencial de reposo que normalmente se registra tanto en tejidos completos como en neuronas en cultivo varía enormemente entre los -35 y -60 mV (Dunlap y Fischbach, 1978; Horn y McAfee, 1980; Galvan y Adams, 1982; Forscher y Oxford, 1985). De los datos presentados sobre el comportamiento de la inactivación dependiente de potencial, puede apreciarse que, en un rango de voltajes como este, buena parte de la corriente en presencia de PMA se encuentra inactivada y, de hecho, en un porcentaje más alto que en condiciones control (Fig. 15F y 22D). Así, no sería sorprendente, incluso, que se registrara un decremento de la corriente evocada tras la activación de la PKC, dependiendo del historial previo del potencial de membrana.

El argumento anterior puede servir, adicionalmente, para explicar porqué, en algunos estudios iniciales en los que se utilizaban protocolos de voltaje despolarizante para aislar la corriente de

CCDV_N, lo que se ve es una reducción en la misma tras la activación de la PKC (p.e., Holz et al., 1956; Rane y Dunlap, 1986). Sin embargo, así como la liberación procede a partir de dominios espaciales de la entrada de Ca²⁺ bien definidos, existe una dependencia estricta en el curso temporal de la misma (Sabatini y Regehr, 1999). Por tanto, la liberación de NT tras la activación de la PKC podría verse estimulada, no por un aumento en la magnitud absoluta de la entrada de Ca²⁺, sino por una entrada **equivalente pero más veloz**. Como la concentración absoluta de Ca²⁺ en un “microdominio” aledaño a la cara citoplasmática de un canal depende de la relación que existe entre la velocidad de entrada de éste y la velocidad a la que es amortiguado o excluido del citoplasma, una entrada de Ca²⁺ más veloz llevaría a que se alcancen valores mayores de la [Ca²⁺]_i, con entradas de Ca²⁺ absolutas equivalentes. Por otra parte, reducciones en el curso temporal del componente de Ca²⁺ en un PA, podrían dar lugar a la activación preferencial de ciertas enzimas con una K_M baja por el Ca²⁺.

Hay una consideración final. Tras un periodo de actividad intensa, la [Ca²⁺]_i suele elevarse lo suficiente como para que se activen conductancias de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (I_{K(Ca)}). La corriente saliente producida por los I_{K(Ca)} está asociada con la post-hiperpolarización tras un PA. Se espera que, esta hiperpolarización, reclute un mayor número de CCDV_N en condiciones de activación de PKC que en control (siempre y cuando no haya efectos de la PKC sobre los canales de K⁺ de los que depende esta post-hiperpolarización). Con este efecto se podría contrabalancear, tras el cese de actividad, la inactivación acumulada durante un tren de PA.

La sensibilidad distinta de canales no-modulados y fosforilados frente a cambios en el potencial de membrana tiene una ventaja adicional: el fino control de la entrada de Ca²⁺ por NT que no actúan por medio de receptores metabotrópicos sino ionotrópicos. La activación directa de conductancias que lleven a una despolarización de membrana conduciría a una disminución porcentual en la población reclutable de CCDV_N mucho mayor tras la activación de la PKC que en condiciones basales. De hecho, se ha mostrado que la duración de los PA es una función sensible del potencial de reposo de la membrana (Forsher y Oxford, 1985). Esto se traduce en el hecho de que la función de las conductancias que lo componen varía (inactiva o activa) con el potencial. La observación anterior se hizo, en particular, en una preparación (DRGs) en la que la duración de la fase de meseta del PA es críticamente dependiente de la actividad de CCDV. Si en condiciones que lleven a la activación de la PKC, los CCDV somáticos inactivan mucho más

rápida y/o marcadamente, siguiendo cambios ligeros en el potencial de reposo, esto se traduciría entre otras cosas, en un PA más corto.

Baste decir que, además, la modulación de la cinética de $CCDV_N$ es un mecanismo potencial para la modulación indirecta de otras conductancias dependientes de la entrada de Ca^{2+} .

En resumen, los cambios que pueden sufrir los canales tras ser fosforilados son complejos y, dependiendo del potencial de reposo y de la historia previa del potencial de membrana, pueden traducirse tanto en fenómenos estimuladores como en fenómenos inhibitorios de la entrada de Ca^{2+} al citoplasma.

Si a todo lo anterior se le suma que el patrón de modulación por PG no sólo puede ser, a su vez, modulado por la historia previa de activación de PKC, y si el curso temporal del establecimiento de ambos depende críticamente del orden en el que se establecen, las posibilidades para obtener una variedad de patrones de entrada de Ca^{2+} a una terminal, con sólo manejar las variables de potencial de reposo, fosforilación y activación de PG, se vuelve sumamente complejo.

9.7. PERSPECTIVAS

Es evidente que buena parte de los mecanismos moleculares propuestos para explicar los efectos observados, así como la mayor parte de las posibles consecuencias fisiológicas descritas, aguardan comprobación experimental.

Se señalará solamente algunos de los puntos pendientes entre otros.

Se ha postulado que distintos heterodímeros $G\beta\gamma$ son capaces de inducir, selectivamente, modulaciones VD y VI (Delmas et al., 1999). Sería interesante averiguar si esta diferencia se refleja en una habilidad selectiva para establecer uniones de baja afinidad con la subunidad α_1 y si, la fosforilación por PKC puede selectivamente alterar la interacción de alta afinidad sobre la de baja.

Una posibilidad inexplorada en el presente trabajo es que alguna de las al menos doce subunidades $G\gamma$ que se conocen induzca cambios sustanciales en la cualidad inhibitoria de un

heterodímero $G\beta\gamma$ particular. Algunas diferencias menores han sido notadas por otros autores (Ruiz-Velasco e Ikeda, 2000), pero ningún trabajo ha sido hasta ahora exhaustivo en este punto. En particular, la cuestión interesa porque el acople específico de un heterodímero $G\beta\gamma$ con un RHH depende de $G\gamma$ más que de $G\beta$ y sólo esto podría asociar la activación de un RHH dado con un subtipo $G\beta\gamma$ específico con cualidades moduladoras particulares.

Adicionalmente, la interacción de subunidades $G\beta\gamma$ a proteínas de fusión ha sido observada en estudios bioquímicos directos (De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997). Además, esta interacción puede ser desorganizada por fosforilación mediada por PKC de los péptidos (Zamponi et al., 1997), y cuando los canales carecen de dos sitios particulares de fosforilación al ser expresados, la PKC es incapaz de bloquear la inhibición por PG (Hamid et al., 1999). En este contexto, los resultados aquí presentados predicen que la fosforilación de estos sitios podría ser prevenida (o al menos fuertemente *enlentecida*) si primero se incuban los péptidos con subunidades $G\beta\gamma$.

10. CONCLUSIONES

Las subunidades β de las PG ejercen tres tipos de efectos sobre el comportamiento de $CCDV_N$ en neuronas simpáticas del SCG:

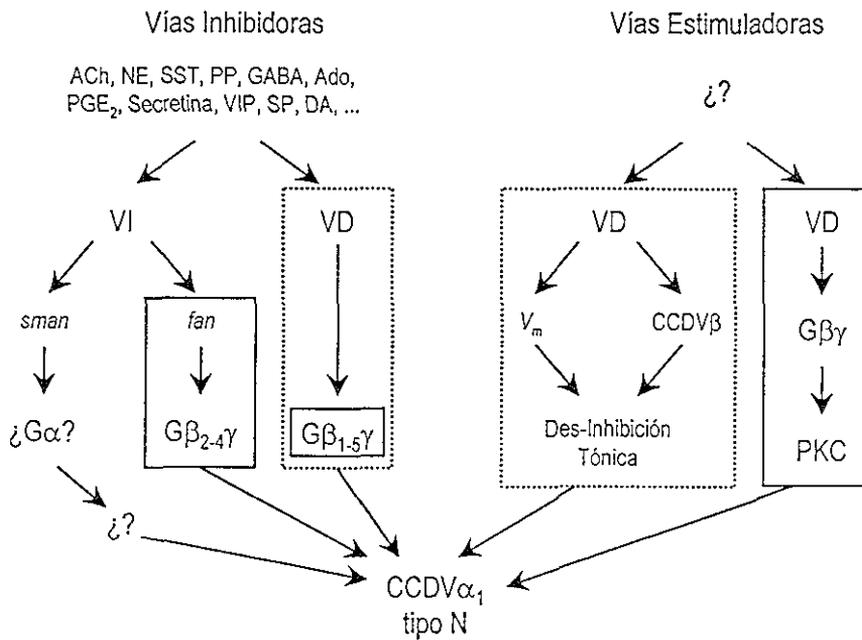
- 1) Modulación inhibitoria VD, en la que $G\beta_4 \geq G\beta_1 \approx G\beta_2 > G\beta_3 \gg \gg G\beta_5$
- 2) Modulación inhibitoria VI, en la que $G\beta_2 > G\beta_3 \approx G\beta_4 \gg \gg G\beta_1 \approx G\beta_5$
- 3) Modulación positiva, mimetizada por activación de la PKC, y caracterizada por:
 - a. Incremento en la amplitud de corriente registrada desde potenciales de mantenimiento hiperpolarizantes.
 - b. Aceleración - dependiente de potencial - de las cinéticas de activación e inactivación.
 - c. Corrimiento hacia potenciales hiperpolarizantes en la dependencia de voltaje de la inactivación de estado estacionario.
 - d. Insensibilidad al componente VD de la inhibición inducida por NE.

Las modulaciones positiva e inhibitoria (VD) son mutuamente excluyentes, inducen características antagónicas en el comportamiento de la corriente que fluye a través de $CCDV_N$, y son moduladas de manera opuesta por el historial previo del potencial de membrana.

Se ha inferido, por tanto, que la activación de subunidades $G\beta\gamma$ conduce a que la respuesta al potencial de membrana de los $CCDV_N$ sea modulada por vías de señalización bifurcantes (en términos de la ruta bioquímica a través de la cual proceden), antagónicas (en cuanto a los efectos que producen), y mutuamente excluyentes (respecto de que el establecimiento de los efectos de una previene que se establezcan los de la otra).

11. CONTRIBUCIÓN

Las Conclusiones anteriores pueden ser incorporadas en el esquema general de regulación bidireccional postulado en el Planteamiento del Problema (Ilustr. 13), de la manera como se destaca con regiones delimitadas por recuadros de líneas continuas en la Ilustr. 18.



Ilustr. 18 Contribuciones de los resultados que se han obtenido en esta tesis al diagrama general de modulación bidireccional de $CCDV_N$ en neuronas simpáticas. Se ha reproducido el diagrama postulado en el Planteamiento del Problema (Ilustr. 13) agregando, dentro de las regiones enmarcadas en recuadros con líneas continuas, las Conclusiones de esta tesis

En particular, pueden sugerirse algunas respuestas a las preguntas que se hicieron en ese momento.

- 1) La especificidad de acople entre un RHH y las vías VD y *fan* puede explicarse, al menos parcialmente, en términos de la activación de subtipos particulares de $G\beta$.

- 2) La falta de efectos estimuladores entre distintos NT con capacidad probada en otros sistemas para activar la PKC puede explicarse en términos de la sucesión temporal precisa con la que se siguen la activación paralela de vías antagónicas y mutuamente excluyentes.

Es posible que el diagrama de la Ilustr. 18 deba ser replanteado para incorporar un nivel adicional de convergencia entre vías moduladoras a nivel del inductor (NT) que las active simultáneamente. Falta por determinar si uno o más de los NT referidos en dicha ilustración cumplen la condición anterior y, de diferir algunos, en qué términos se establece el acople selectivo o no a esta vía. Las características distintivas descritas para los efectos de la activación de la PKC sobre corrientes poblacionales de $CCDV_N$ que se han descrito proveen, sin embargo, de un objeto de búsqueda particular, esto es, de un objetivo definido.

12. APÉNDICES

I. CARACTERÍSTICAS DE LAS CORRIENTES QUE FLUYEN A TRAVÉS DE CCDV

*"In a wide variety of cells
a depolarization of the membrane potential
increases the membrane's permeability to Ca^{2+} .
We refer to this voltage-dependent permeation mechanism
as the Ca channel,
even though very little evidence
exist to establish its channel nature."
S. Hagiwara y L. Byerly, 1981*

I.1. Características Cinéticas

El término de "cinética" se utiliza para referirse al curso temporal de alguna reacción. En el contexto de una corriente que fluye a través de un conjunto CCDV (corriente "macroscópica"), dicho término es empleado para describir el curso temporal con el que se desarrolla una corriente en estado estacionario del potencial de membrana, y la manera en la cual se alteran sus distintos componentes respecto de variaciones en el mismo. De ninguna manera se pretende dar aquí una exposición formal y precisa de tan extraordinariamente vasta y profundo tema, pues ello requeriría de un estudio completo por separado. Simplemente se trata de exponer cuales son las características principales que muestran las corrientes que fluyen a través de CCDV porque, es en términos de éstas que se tratará, más adelante, la identificación de distintos tipos de CCDV, y de distintos patrones inhibitorios de los mismos.

I.1.1. Activación

Los CCDV se encuentran predominantemente cerrados a valores del potencial de membrana cercanos al valor del potencial de reposo normal (entre -60 y -40 mV) o a valores más negativos que éste. El término de "activación", en registros macroscópicos, se refiere a la porción del curso temporal del desarrollo de la corriente de CCDV que comprende el periodo que va desde el inicio de una despolarización hasta el momento en el que la corriente alcanza su amplitud

máxima antes del fin de ésta. El desarrollo de la corriente entrante de Ca^{2+} sigue un curso temporal sigmoideal que alcanza valores máximos a tiempos progresivamente más cortos a medida que se incrementa la magnitud de la despolarización de membrana.

El proceso de activación de esta corriente es rápido ($\tau < 3$ ms), se encuentra bien separado de la inactivación (Elmslie y Jones, 1994) y puede ser descrito por una cinética exponencial simple, desde el inicio del desarrollo de la corriente entrante (Jones y Marks, 1989a). Sin embargo, el hecho de que el desarrollo de la corriente tenga un curso temporal sigmoideal es indicativo de que existe un retraso entre la despolarización de la membrana y la apertura de los canales (Hagiwara y Byerly, 1983). Por tanto, las cinéticas de primer orden no pueden describir el curso completo de la activación de la corriente de Ca^{2+} , lo que implícitamente significa que se requieren más de dos estados (uno cerrado y uno abierto) para modelar el proceso (Hagiwara y Byerly, 1983; Sala, 1991; Golard y Siegelbaum, 1993).

Una de las características principales que distinguen distintos tipos de CCDV es el rango de voltaje de su activación. La manera más simple de determinarlo es trazando una curva de amplitud de la corriente *versus* potencial utilizada para evocarla ("curva I-V"). En cada voltaje particular, la amplitud isocrónica de la corriente será proporcional al número de canales totales disponibles basalmente (N), la conductancia unitaria (γ), la probabilidad de apertura (p_0) y la fuerza electromotriz ($V_m - E_{\text{Ca}}$; donde V_m es el potencial de membrana y E_{Ca} es el potencial de equilibrio de Nernst para el Ca^{2+}). Dado que el E_{Ca} se encuentra a valores de V_m positivos, las relaciones I-V de los CCDV poseen una región característica de pendiente negativa a potenciales cercanos al umbral de activación de la corriente, un valor máximo ("pico") y una región más o menos lineal con pendiente positiva a valores más despolarizantes. La región de pendiente negativa refleja el rango de voltajes de la activación de los canales y es generalmente identificada por el voltaje de activación media máxima ($V_{0.5}$) y por la pendiente en este punto (sensibilidad al voltaje).

1.1.2. Desactivación

El término de "desactivación" denomina a la porción del curso temporal de la corriente que se presenta tras el fin del pulso de voltaje que ha sido utilizado para activarla. La desactivación — proceso de cierre — de los canales durante el regreso al potencial de reposo da lugar a un salto

instantáneo de la corriente entrante (debido a que la fuerza electromotriz sobre el ión que transportan se incrementa a potenciales en los que los canales se cierran) seguido por un decaimiento exponencial rápido de la corriente (“cola”), con una tasa, dependiente de potencial, que puede variar desde fracciones de milisegundos hasta algunos milisegundos. Estas corrientes se han llamado corrientes “de colas”, “de cierre” o “de desactivación” (Bezanilla, 1996).

Si se mantiene un valor de potencial de repolarización constante, tras varios pulsos breves a diferentes voltajes, entonces puede trazarse una gráfica de amplitud de corriente de cola *versus* potencial del pulso precedente. Una curva de este tipo, es una “curva de activación” de la corriente, ya que, entre un valor de potencial y otro, el único parámetro que varía es el número de canales que ha sido reclutado en el pulso de prueba.

I.1.3. Inactivación

El término de “inactivación” denomina al proceso de decaimiento de la corriente en condiciones de estado estacionario en el potencial de membrana. La inactivación de la corriente de Ca^{2+} , de hecho, es un tema polémico. Para los CCDV, al igual que para otros canales iónicos, la inactivación es, por lo tanto, definida como los eventos moleculares que conducen a un canal abierto o cerrado hacia una forma temporalmente inactiva (no conductora) diferente del canal deactivado (cerrado; Carbone et al., 1998).

La constante de tiempo (τ_i) para la inactivación de los CCDV puede depender del potencial de membrana (dependiente de voltaje), de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (dependiente de Ca^{2+}), o de otros factores intracelulares y puede estar acoplada en grado variable a la activación de los canales (Eckert y Chad, 1984; Gutnick et al., 1989; Jones y Marks 1989b; Cox y Dunlap, 1994; Patil et al., 1998; Jones et al., 1999; Carbone et al., 1998). Por ello, se suele dividir la inactivación de la corriente de Ca^{2+} en tres tipos:

1) Ausencia de inactivación.

2) Inactivación dependiente de corriente (o de uso). Una peculiaridad de algunos CCDV es la sensibilidad de sus compuertas de inactivación a los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} libre (Eckert y Chad 1984; Cox y Dunlap, 1994; Carbone et al., 1998). En estos casos la inactivación ocurre como resultado de un influjo de iones a través del CCDV y es relativamente independiente del

potencial de membrana. La interpretación más popular es que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$; debida al influjo de Ca^{2+} bloquea a los propios CCDV. La inactivación dependiente de Ca^{2+} de los CCDV fue originalmente descrita en *Paramecium* (Brehm y Eckert, 1978) y en neuronas de *Aplysia* (Tillotson, 1979). Dunlap y Fishbach (1981) documentaron un fenómeno similar en DRGs embrionarias del pollo en cultivo. La inactivación dependiente de Ca^{2+} está tipificada por tres características principales: (1) La tasa de inactivación es directamente proporcional la amplitud de la corriente; (2) En experimentos de doble pulso, en los cuales las corrientes de Ca^{2+} son medidas después de un pulso condicionante (*prepulso*) a diferentes potenciales, la amplitud de la corriente de prueba decrece (inactiva) proporcionalmente a la cantidad de Ca^{2+} que se acumula durante el *prepulso* (Eckert y Chad, 1984; Plant, 1988; Carbone et al, 1998). La curva de inactivación *versus* voltaje correspondiente no es monotónica, sino que tiene una forma de U, con valores máximos de inactivación a potenciales que producen corriente entrante máxima; (3) Las corrientes de Ba^{2+} y Na^+ a través de CCDV inactivan menos que aquellas de Ca^{2+} y la curva de inactivación en forma de U correspondiente es menos pronunciada; y (4) La inactivación de CCDV es prevenida en presencia de quelantes internos de Ca^{2+} . La inactivación de la corriente de Ca^{2+} en células no dializadas (p.e., utilizando la técnica de *patch-clamp* en configuración de "parche perforado") es generalmente más prominente que la que se observa en células dializadas (en configuración de célula completa) con una concentración efectiva de amortiguador de Ca^{2+} (p.e., 10 mM EGTA). La inactivación dependiente de Ca^{2+} es específica para algunos CCDV y puede presentarse en combinación con inactivación dependiente de voltaje.

3) Inactivación dependiente de potencial. Al igual que para las cinéticas de activación, la inactivación dependiente de voltaje implica que la tasa de inactivación del canal ($1/\tau_h$) es una función muy sensible del potencial de membrana. Al incrementar el voltaje en 10 a 20 mV, τ_h decrece e veces o incluso más. La inactivación rápida dependiente de voltaje (decenas de ms) es característica de algunos CCDV que se abren transitoriamente durante despolarizaciones pequeñas en células excitables, mientras que cursos temporales de inactivación más lentos ($\tau_h > 100$ ms) son característicos del resto de los CCDV (ver adelante). La inactivación dependiente de voltaje puede ocurrir también muy lentamente (decenas de segundos) al variar el potencial de mantenimiento hacia valores despolarizantes. Esta inactivación lenta es común a varios CCDV y conduce a un decaimiento de la corriente reclutable por una despolarización subsiguiente. En algunos casos, una curva de inactivación *versus* potencial de mantenimiento asociada a un proceso

de inactivación de este tipo presenta una forma sigmoidal de crecimiento monotónico. Sin embargo, ha sido descrito que una inactivación puramente dependiente de potencial puede producir una curva que sigue un comportamiento extremadamente similar al que se presenta en presencia de inactivación dependiente de Ca^{2+} (con forma de U; Jones y Marks, 1989) siempre que la tasa de inactivación máxima de los canales esté asociada a los estados cerrados próximos al estado abierto (ver Discusión; Patil et al., 1998; Jones et al., 1999).

1.1.4. Comportamiento cinético de la corriente a través de canales individuales

La dependencia de voltaje de la probabilidad de apertura del canal implica que las constantes de velocidad que regulan las transiciones entre los estados cerrados (no conductores, C) y el estado abierto (conductor, O) son, a diferentes grados, sensibles al voltaje. Para la mayor parte de los CCDV, la activación y desactivación pueden ser descritas razonablemente bien por un modelo secuencial mínimo con dos estados cerrados y un estado abierto ($C_1 \leftrightarrow C_2 \leftrightarrow O$; Fenwick et al., 1982). Las tasas de transición $C_2 \rightarrow O$ y $C_2 \leftarrow O$, determinadas a partir de los tiempos promedio de apertura y cerrado y de la duración media de periodos de actividad intensa (*bursts*) en los registros de actividad unitaria a diferentes potenciales (Fenwick et al., 1982), para ciertos CCDV son generalmente muy frecuentes ($500\text{-}1500\text{ s}^{-1}$), débilmente dependientes del voltaje y responsables de la rápida fluctuación del canal durante despolarizaciones prolongadas por encima de 0 mV (Carbone et al., 1998). En contraste, la tasa de transición $C_1 \rightarrow C_2$ es lenta ($50\text{-}250\text{ s}^{-1}$) a potenciales cercanos al umbral de activación de la corriente mientras que la tasa de la reacción en reversa ($C_1 \leftarrow C_2$) es alta. Las transiciones $C_1 \leftrightarrow C_2$, junto con la reacción rápida $C_2 \leftrightarrow O$, son las responsables del curso temporal sigmoidal de la activación de los CCDV (Carbone et al., 1998).

Los modelos cinéticos clásicos predicen que los parámetros estimados de las cinéticas de compuerta de los CCDV (tiempos de apertura, tiempos de cierre, p_0 y γ) se encuentran estadísticamente distribuidos alrededor de valores medios que identifican inequívocamente las características cinéticas del canal. En una serie registros de actividad unitaria, un modelo clásico predice actividades del canal con un patrón cinético homogéneo caracterizado por un conjunto de valores de parámetros cinéticos ("modo de apertura"). La actividad de los CCDV, sin embargo, puede derivarse de un número discreto de modos de apertura, cada uno caracterizado por su propio conjunto de parámetros cinéticos disjuntos (Hess et al., 1984; Bean, 1989b; Elmslie

et al., 1990; Plummer y Hess, 1991; Delcour y Tsien, 1993). Los modos de apertura de los CCDV pueden ser distinguidos de acuerdo con su probabilidad de apertura (alta, media o baja), sus cinéticas de inactivación (rápida o lenta), su amplitud de corriente unitaria (grande o pequeña) y su dependencia del voltaje (fuerte o débil). Las transiciones de un modo a otro son infrecuentes, con tiempos de residencia medios de cerca de 10 s en cada modo (Carbone et al., 1998). Esto implica que el canal sufre cientos de transiciones abierto-cerrado en un modo antes de cambiar a un modo distinto (Plummer y Hess, 1991). El intercambio modal ocurre preferentemente durante repolarizaciones prolongadas al potencial de reposo y es raramente observada dentro de pulsos cortos de actividad del canal que dure menos de 1 s. Por lo tanto, las transiciones entre modos de apertura distintos son evidentes únicamente a partir de una serie de registros consecutivos, en los cuales una serie de pulsos de voltaje en los que se presenta un patrón de actividad similar del canal es seguida por uno o más pulsos con características de apertura distintas.

Al nivel de canal unitario, la inactivación de los canales abiertos es indistinguible de los estados cerrados del canal, excepto por la aparición de interrupciones prolongadas en la actividad del canal durante despolarizaciones sostenidas. En registros de corrientes de sellos que contienen un solo canal activo, la inactivación es generalmente responsable del último cierre del canal después de la actividad repetida del mismo. El promedio de registros de este tipo presenta corrientes que decaen durante un pulso de voltaje con constantes de tiempo de inactivación comparables con la τ_h determinada a partir de registros macroscópicos.

I.2. La Corriente de Ca^{2+} en Neuronas no es Homogénea: Múltiples Tipos de CCDV

*"It is probably best to state at the beginning
that we are writing with the assumption
that the Ca channel is not a unique molecular structure..."*

S. Hagiwara y L. Byerly, 1981

Hacia finales de la década de los 70's, las corrientes de Ca^{2+} habían sido registradas en un buen número de las preparaciones en las que las células son lo suficientemente grandes como para resistir la penetración de su membrana plasmática con un sistema de microelectrodos. Las distintas corrientes diferían entre sí en prácticamente cualquier propiedad mensurable: (1) La eficacia relativa de cationes polivalentes para bloquear las corrientes de Ca^{2+} variaba entre

preparaciones; (2) Los bloqueadores orgánicos eran mucho más efectivos en algunas corrientes que en otras; (3) Algunas membranas parecían tener, claramente, más de un componente de corriente de Ca^{2+} , a juzgar por la presencia de diferentes dependencias de voltaje, diversas afinidades de unión y de movilidad de diferentes cationes divalentes, o por presentar variadas cinéticas en la misma membrana; (4) En algunas membranas, la inactivación de las corrientes de Ba^{2+} seguía el mismo curso temporal que aquél de las corrientes de Ca^{2+} , mientras que, en otras, ambas inactivaban con diferentes cursos temporales (Hagiwara y Byerly, 1981).

Los resultados anteriores contrastaban enormemente con aquellos provenientes del estudio de los canales de Na^+ . Éstos era generalmente considerados como una estructura única ya que, a pesar de que las constantes de tiempo, la dependencia de voltaje y la sensibilidad al TTX variaban de preparación en preparación, las cinéticas básicas y la selectividad permanecían inalteradas. Estas razones llevaron, en 1981, a Hagiwara y Byerly a postular que *“A pesar de que se debería esperar que distintos ambientes alteren las propiedades de un canal particular (como la dependencia de voltaje y las cinéticas), diferentes corrientes de calcio muestran tantas divergencias en propiedades fundamentales que encontramos más fácil asumir que hay más de un tipo”* (sic). Esta suposición probó ser completamente acertada: en menos de cinco años, la corriente de Ca^{2+} neuronal habría de sub-dividirse en, al menos, dos sub-poblaciones principales (Carbone y Lux, 1984), y una de ellas, a su vez, en otras dos (Nowycky et al., 1985).

La primer evidencia sobre la existencia de distintos tipos de CCDV fue obtenida de un estudio realizado en ovocitos de estrella de mar, en el cual se distinguieron dos componentes de la corriente de Ca^{2+} por su inactivación en estado estacionario, el umbral de activación y su selectividad (Hagiwara et al., 1975). Con base en el registro de dos mínimos locales en la curva I-V, los autores llamaron al primer pico de la corriente como “Tipo I” y a la corriente activada a potenciales más altos como “Tipo II”. Esta observación fue rápidamente expandida a finales de los 70's a diversas preparaciones de neuronas de invertebrados y, posteriormente, a células musculares (Bean, 1985, 1989a; McCleskey et al., 1986).

En neuronas de vertebrados, la primer observación similar aparece a principios de los 80's con un estudio realizado por el grupo de R. Llínás en neuronas de la oliva inferior (Llínas y Yarom, 1981a,b). En este estudio, los autores demuestran que un PA rápido de Ca^{2+} podía ser inducido únicamente si la célula era hiperpolarizada. Esta actividad de CCDV se encontraría

inactiva todo el tiempo excepto durante la post-hiperpolarización que sigue a una ráfaga de PA, y diferiría sustancialmente de la conductancia no-inactivante responsable de la meseta prolongada de los mismos.

En 1984, E. Carbone y H.D. Lux, demuestran formalmente la existencia de dos componentes de la corriente de Ca^{2+} con umbrales de activación y propiedades de inactivación dependiente de voltaje bien separados en DRGs de pollo. Mediante la técnica de *patch-clamp*, muestran que, el uso de potenciales de mantenimiento hiperpolarizantes, desenmascara una corriente de Ca^{2+} de rápida inactivación, normalmente ausente a los potenciales de mantenimiento que habían sido utilizados hasta entonces. El hecho de que estos CCDV fuesen activados por despolarizaciones pequeñas, llevó a que se les denominara como canales "activados por bajos voltajes" (LVA, por *low-voltage activated*). En contraposición, se nombró como "activados por altos voltajes" (HVA, por *high-voltage activated*) a los CCDV principales, puesto que se activaban con despolarizaciones de mayor magnitud.

Los componentes LVA y HVA, correspondían perfectamente con las corrientes "Tipo I" y "Tipo II" de Hagiwara, y con los componentes inducidos por post-hiperpolarizaciones y aquel de actividad sostenida que había inferido Llinás, respectivamente. La existencia de ambos componentes fue rápidamente aceptada y extendida a una gran variedad de células neuronales y no neuronales (Carbone y Lux, 1984; Fedulova et al., 1985; Nowycky et al., 1985; Kostyuk et al., 1988; [células no neuronales: Armstrong y Matteson, 1985; Bean, 1985; Nilius et al., 1985]). Estos canales habrían de ser rebautizados por el grupo de R. W. Tsien como "tipo-T" porque tienen conductancias unitarias pequeñas (*ñny*) y muestran una rápida y completa inactivación dependiente de potencial durante despolarizaciones sostenidas, que da lugar a pequeñas corrientes transitorias (*transient*; Nowycky et al., 1985; McCleskey et al., 1986). Otra propiedad cinética característica de estos canales es que deactivan mucho más lentamente (10 a 100 veces) que otros CCDV. Por esta razón son a menudo llamados "canales de lenta desactivación" (*slowly deactivating*) y su contribución a la corriente total puede ser cuantificada midiendo la amplitud del componente lento de las corrientes de cola (Armstrong y Matteson, 1985; Ertel y Ertel, 1997).

R. W. Tsien y cols. harían una segunda contribución significativamente más importante: describen una segunda clasificación que divide a la corriente HVA en dos componentes (Nowycky et al., 1985; Fox et al., 1987a,b). La propuesta estaba basada en la observación de que

la cinética de inactivación de la corriente HVA era substancialmente distinta cuando ésta era estimulada desde potenciales de mantenimiento hiperpolarizante - similar al utilizado para desenmascarar a la corriente LVA - de aquélla que presentaba cuando era estimulada desde potenciales ligeramente más despolarizantes. En el último caso, el comportamiento de la corriente presentaba poca o nula inactivación, mientras que en el primero, la corriente presentaba una cinética de inactivación claramente bifásica, con un componente de rápida inactivación que parecía sumarse al primer componente no-inactivante.

Los autores propusieron que dos poblaciones de CCDV serían responsables de mediar cada componente, y denominaron al componente inactivante como "N", y al no-inactivante como "L". De acuerdo con esta visión, la corriente macroscópica HVA podía ser separada en ambos componentes, ya sea (a) identificando el componente decaiente de la corriente durante un pulso de 150 a 200 ms como corriente N y a aquel remanente al final del pulso como L o (b) llevando el potencial de mantenimiento a valores de entre -60 y -40 mV para inactivar la corriente N y así estimular corriente L en aislamiento. Este procedimiento de separación asigna proporciones relativamente grandes (40-70%) de la corriente HVA estimulada desde potenciales negativos a CCDV tipo L.

Adicionalmente, reportaron que estos dos tipos de canales diferían en su conductancia unitaria y en su sensibilidad al bloqueo tanto por cationes divalentes como por distintos compuestos orgánicos que, consecuentemente, servían para separarlos farmacológicamente. Las 1,4-dihidropiridinas (DHP) afectaban selectivamente a los canales L (aumentando o disminuyendo su actividad según el tipo de DHP particular), y la ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx GVIA; Kerr y Yoshikami, 1984; Olivera et al., 1985), bloquearía tanto canales tipo N y L pero no canales tipo T (McCleskey et al., 1987). Esto último se basaba en resultados llevados a cabo tanto en DRGs de pollo como en SCGs y neuronas hipocámpales de rata donde esta toxina bloqueaba componentes decaientes y sostenidos de la corriente.

La división de la corriente HVA introducida por el grupo de R. W. Tsien habría de despertar un buen número de controversias. En la postura más radical, D. Swandulla y C. Armstrong (1988) habían analizado las corrientes de cola de los canales HVA y reportaron que se encontraba bien descrita por una sola exponencial, sugiriendo que un solo tipo de canal era responsable de la corriente HVA. Por otra parte, E. Carbone y H. D. Lux (1987a,b) señalaron

que no había diferencias entre los cursos temporales de la inactivación de dos corrientes HVA con conductancias unitarias diferentes, y varios grupos habían reportado que las corrientes HVA eran relativamente resistentes a DHPs, incluso cuando exhiben un componente sostenido, no inactivante, prominente (Boll y Lux, 1985; Kasai et al., 1987; Swandulla y Armstrong, 1988; Bean, 1989a). Finalmente, el grupo de H. Kasai (Kasai et al., 1987) evidenció la existencia de un componente de la corriente HVA no bloqueada por ω -CgTx pero sensible a DHPs.

A finales de los 80's, B. P. Bean (1989a) sugiere que la mayor parte de las discrepancias podrían ser resueltas si, contrariamente a lo pronosticado por el grupo de Tsien, los canales tipo N fuesen predominantes, contribuyendo a la mayor parte (en algunas células) o a la totalidad de la corriente HVA. Para ser responsables de esto, Bean pronosticó que los canales N tendrían cinéticas de inactivación complicadas, con inactivación rápida pero incompleta. Esto último daría lugar a que participaran de manera importante tanto a la corriente sostenida, identificada hasta entonces como L, como al componente inactivante. Por lo tanto, sin el aumento producido por agonistas DHP, la corriente L podría ser solamente una fracción pequeña de la N, con la mayor parte de las aperturas de canales L breves y difíciles de resolver en registros unitarios.

Al poco tiempo, estas inferencias fueron demostradas por el grupo de P. Hess (Plummer et al., 1989) en SCGs y en células PC12, describiendo que la corriente tipo N puede comprender un componente sostenido prominente - incluso al final de despolarizaciones de varios cientos de ms - y que el comportamiento de esta conductancia es básicamente no inactivante cuando es estimulada desde potenciales de mantenimiento despolarizantes. Finalmente, demuestran que, en neuronas simpáticas, un solo canal tipo N puede alternar entre modos de apertura (ver arriba) inactivantes y no inactivantes (Plummer y Hess, 1991).

Por lo tanto, la separación de los componentes de la corriente basados exclusivamente en las cinéticas de inactivación probó estar equivocada y haber llevado a conclusiones erróneas acerca de la proporción de corriente total llevada por canales tipo N y L. En consecuencia, la atribución de bloqueo de la corriente L por ω -CgTx GVIA resultó incorrecta: canales tipo L identificados mediante la utilización de agonistas DHP son insensibles a dicha toxina (Kasai et al., 1987; Aosaki y Kasai, 1989; Plummer et al., 1989).

De ésta manera, un componente de la corriente de Ca^{2+} que es irreversiblemente bloqueado por ω -CgTx GVIA es operacionalmente definido como que se ha originado a partir de canales tipo N (Ikeda y Dunlap, 1999). Utilizando este criterio, se ha demostrado que la mayor parte (65-95%) de la corriente de Ca^{2+} en neuronas periféricas simpáticas y sensoriales se origina a partir de canales tipo N (Plummer et al., 1989; Cox y Dunlap, 1992; Boland et al., 1994). En contraste, las neuronas del SNC tienden a poseer una población más heterogénea de subtipos de CCDV, donde los canales tipo N típicamente son responsables de solamente del 20 al 30% de la corriente total de Ca^{2+} (Regan et al., 1991; Mintz et al., 1992).

La concepción errónea que sostenía que las corrientes de Ca^{2+} tipo L y N podían ser completamente separadas por sus cinéticas de inactivación diferencial y su sensibilidad al potencial de mantenimiento (ver arriba) llevó obviamente, a conclusiones equivocadas respecto a la sensibilidad de los diferentes canales HVA, frente a la inhibición inducida por NT. En particular, el hecho de que algunos de ellos inhibieran un componente no inactivante de la corriente HVA (que permanecía disponible a un potencial de mantenimiento de -40 mV) llevó a algunos investigadores (Rane et al., 1987; Holz et al., 1989) a sugerir que los NT afectaban a canales tipo L.

Habría de demostrarse, contrariamente, que esta corriente no es modulada y que los canales tipo N son el blanco predominante de la inhibición. Las evidencias más fuertes que apoyan la conclusión anterior son: (1) Las acciones de los NT se encuentran ausentes en presencia de ω -CgTx; (2) La acción de los NT es siempre aditiva a aquella de los bloqueadores de canales tipo L; (3) Los NT no alteran las corrientes de cola de canales tipo L prolongadas por un agonista DHP (Elmslie et al., 1990; Cox y Dunlap, 1992; Kasai, 1992; Boland y Bean, 1993; Carbone et al., 1998). Por lo tanto, las conclusiones acerca de la aparente modulación de canales tipo L se debía a que, en realidad, estaban observando un componente de la corriente tipo N que permanece a potenciales de mantenimiento despolarizantes y que exhibe un comportamiento no-inactivante muy similar a la corriente tipo L (Plummer et al., 1991).

Mientras la distinción entre canales tipo L y N era todavía debatida, se descubrieron canales, en una variedad de neuronas disociadas de la rata, que no eran bloqueados ni por DHPs ni por ω -CgTx GVIA y que, por tanto, no se ajustaban a ninguna de las dos categorías (Regan et al., 1991). En un caso extremo se encontraban las neuronas de Purkinje, en las cuales más del 90%

de la corriente permanecía en presencia de ambos bloqueadores. En esta preparación, la corriente resistente correspondía a los canales tipo "P", originalmente caracterizados por el grupo de R. Llinás (Llinás et al., 1989a,b; 1992; Usowicz et al., 1992), y que se definen actualmente por su rápido bloqueo por el toxina de arañas ω -Aga IVA a concentraciones por debajo de 100 nM (Mintz et al., 1992). Poco después, se encontraron canales resistentes tanto a DHP como a ω -CgTX GVIA pero que eran bloqueados menos rápidamente y/o potentemente por ω -Aga IVA, y fueron llamados canales Q (Zhang et al., 1993). La distinción entre canales tipo P y Q ha sido difícil de establecer en muchas neuronas, de manera que la mayor parte de los estudios se refieren a canales tipo P/Q a menos que un bloqueo de alta afinidad por ω -Aga IVA sea inequívoco. Los canales P/Q también se bloquean de manera prácticamente irreversible por ω -conotoxina MVIIC (Zhang et al., 1993; McDonough et al., 1996). Esta toxina también bloquea canales N de manera reversible, pero no hace lo mismo con otros canales HVA o LVA (Jones, 1998). Finalmente, muchas neuronas tienen un componente de la corriente HVA que es resistente a todos los bloqueadores anteriores (DHPs, ω -CgTx GVIA, ω -Aga IVA y ω -conotoxina MVIIC). Esta corriente R ("resistente") a menudo inactiva más rápidamente que otras corrientes HVA, y puede activar a voltajes relativamente más negativos (Zhang et al., 1993; Elmslie et al., 1994).

No se pretende llevar más lejos el análisis de la heterogeneidad de las corrientes de Ca^{2+} en distintas preparaciones. Baste con decir que las herramientas de investigación que habría de aportar la biología molecular en la última mitad de la década de los 90's, expandirían aún más las ya distantes fronteras de la diversidad de subtipos de CCDV neuronales (ver Apéndice II).

II. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS CCDV

Al igual que otros canales iónicos dependientes de voltaje, los CCDV neuronales son proteínas heteromultiméricas integrales de membrana. La subunidad principal (denominada α_1) es un polipéptido de unos 2000 residuos de aminoácidos (190-250 kDa; Walker y De Waard, 1998; Catterall, 2000), capaz de formar canales funcionales por sí misma cuando es incorporada a sistemas de expresión heterólogos (Dubel et al., 1992; Perez-Reyes et al., 1992; Williams et al., 1992). Esto es, la subunidad α_1 forma el poro conductor y le confiere las principales características al canal: selectividad al Ca^{2+} , dependencia de voltaje de las cinéticas de apertura y cierre, sensibilidad a la mayor parte de los agentes farmacológicos y sitios de regulación por segundos mensajeros (Carbone et al., 1998; Ertel et al., 2000). Esta subunidad comparte una arquitectura transmembranal, y un cierto grado de homología, con los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Catterall, 2000). La secuencia de aminoácidos en la subunidad α_1 muestra cuatro dominios homólogos, que contienen, cada uno, seis regiones altamente hidrofóbicas (Ilustr. 4). Tanto las regiones amino (N)- y carboxilo (C)-terminales de la subunidad α_1 , como las asas (*loops*) que unen cada dominio transmembranal, son regiones citoplasmáticas de la subunidad. Con excepción del *loop* que conecta los dominios III-IV, todas estas regiones han sido implicadas en la interacción con distintas proteínas citoplasmáticas que modulan las propiedades de las corrientes a través de α_1 (Walker y De Waard, 1998).

La estructura secundaria de cada segmento que compone a los dominios I a IV, predice una conformación de α -hélice transmembranal (que se numeran como S1 a S6 en cada dominio; Ilustr. 4). El segmento S4 diverge de los demás por poseer, generalmente cada tercer posición en su secuencia primaria, varios residuos de aminoácidos con carga positiva, que le confieren un perfil hidropático más hidrofílico que el de los demás. Por analogía con los canales de Na^+ y de K^+ , se piensa que dicha región opera como el censor de voltaje del canal (Jones, 1998). Esto es, que esta región es capaz de sufrir reorientaciones en respuesta a cambios en el potencial transmembranal que repercuten en la estructura terciaria del resto - o de parte - de la subunidad α_1 , desencadenando que el canal se vuelva permeable a los iones. La selectividad por el Ca^{2+} del canal abierto es conferida por una región extracelular que se localiza entre S5 y S6, y que se piensa que forma parte del poro acuoso.

II.1. Dos Nuevas Clasificaciones para los CCDV Nacidas de la Biología Molecular

Es universalmente aceptado que los múltiples tipos de corriente que han sido identificadas por sus propiedades fisiológicas y farmacológicas están correlacionadas con distintas isoformas de la subunidad α_1 . Mediante técnicas de biología molecular ha sido posible identificar la existencia de al menos diez isoformas de la subunidad α_1 : α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1E} , α_{1F} , α_{1G} , α_{1H} , α_{1I} y α_{1S} . La reconstrucción de dichas subunidades α_1 clonadas indica una correlación fisiológica-molecular, en la que los CCDV que contienen los subtipos α_{1C} , α_{1D} o α_{1S} son responsables de corrientes tipo L, aquellos que poseen subunidades α_{1E} generan corrientes tipo R y/o T, los que contienen subunidades α_{1B} son responsables de las corrientes tipo N y aquellos conformados por el subtipo α_{1A} son responsables de las corrientes P/Q (Dolphin, 1998; Walker y De Waard, 1998; Catterall, 2000).

La heterogeneidad en la manera de clasificar a los CCDV, ha llevado al establecimiento de una tendencia creciente hacia la unificación de las denominaciones, nacidas del estudio de diversos aspectos de las corrientes por separado, en una sola. Así, se habla de canales clase B para hacer referencia a corrientes de tipo N registradas a través de subunidades α_{1B} , etc. (Dolphin, 1998; Walker y De Waard, 1998). Sin embargo, la constante clonación de genes de CCDV nuevos volvía al orden alfabético de su nomenclatura molecular original extremadamente susceptible de no poder proveer suficientes categorías para canales putativos, prestándose a constante confusión. Además, la nomenclatura alfabética no refleja las relaciones estructurales entre las subunidades α_1 . En términos del grado de homología en la secuencia de aminoácidos, éstas pueden ser agrupadas en tres familias: (1) α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} y α_{1S} ; (2) α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} ; (3) α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} (Catterall, 2000; Ertel et al., 2000). El grado de homología entre subunidades α_1 de una misma familia es superior al 70%, mientras que no supera el 40% entre miembros de distintas familias (Ertel et al., 2000).

Por estas razones, algunos autores expertos en esta área, decidieron renombrar las distintas isoformas de la subunidad α_1 siguiendo un sistema numérico - análogo al que se utiliza para canales de Na^+ y K^+ - que define tres familias, con varias subfamilias, con base en el mencionado grado de homología: (1) Ca_v1 , que comprende a las subfamilias $\text{Ca}_v1.1$ (α_{1S}), $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}), $\text{Ca}_v1.3$

(α_{1D}) y $Ca_v1.4$ (α_{1F}); (2) Ca_v2 , compuesta por las subfamilias $Ca_v2.1$ (α_{1A}), $Ca_v2.2$ (α_{1B}) y $Ca_v2.3$ (α_{1C}); y (3) Ca_v3 , formada por las subfamilias $Ca_v3.1$ (α_{1G}), $Ca_v3.2$ (α_{1H}) y $Ca_v3.3$ (α_{1I}) (Ertel et al., 2000).

Un nivel de complejidad adicional a la ya vasta diversidad de tipos de CCDV es conferido por la presencia de isoformas generadas por *splicing* alternativo entre los mismos genes de varias subfamilias. En particular, se ha mostrado que existen al menos dos isoformas de subunidades $Ca_v2.2$ (que codifican para corrientes tipo N análogas a las analizadas en esta tesis), que difieren en la longitud de la región *C-terminal* (Westenbroek et al., 1992; Hell et al., 1994), y en algunas posiciones que conectan los segmentos S3 y S4 (Lin et al., 1997), y que pueden presentar características cinéticas ligeramente distintas (Lin et al., 1997). Dada la importancia de la región *C-terminal* en la modulación de las características cinéticas de las corrientes que fluyen a través de este tipo de subunidades (ver texto), la expresión de distintas isoformas en un mismo tejido puede jugar un papel importante en la regulación diferencial de canales farmacológicamente indistinguibles.

II.2. La Subunidad β

Las subunidades α_1 que se obtienen por procedimientos de purificación a partir de tejidos nerviosos, coprecipitan con otras dos proteínas (en una estequiometría 1:1:1; Hofmann et al., 1994; Walker y De Waard, 1998; Catterall, 2000), que operan como subunidades auxiliares y/o reguladoras de las propiedades biofísicas de las corrientes reconstituidas en sistemas de expresión (Berrow et al., 1995; Zhang et al., 1996a; Roche et al., 1995; Roche y Treistman, 1998; Dolphin, 1998): la subunidad β (52-78 kDa), enteramente citoplasmática; y la subunidad $\alpha_2\delta$ (140-170 kDa), anclada a la membrana y con un gran dominio extracelular altamente glicosilado, que consiste de dos péptidos - codificados por el mismo gen - unidos por puentes disulfuro (Ilustr. 4).

El papel preciso que juega la subunidad $\alpha_2\delta$ sobre el comportamiento de la subunidad α_1 es aún sujeto de debate (Hofmann et al., 1994; Catterall, 2000; Stotz y Zamponi, 2001) y, en general, sus efectos requieren de la coexpresión de la subunidad β para ser evidentes (Walker y De Waard, 1998). En contraste, los cambios inducidos por la subunidad β son extremadamente pronunciados e independientes de la expresión conjunta de la subunidad $\alpha_2\delta$ (Walker y De

Waard, 1998): las subunidades β tienen efectos sobre todas las características de la corriente que fluye a través de subunidades α_1 .

Los cuatro subtipos clonados de subunidades β (β_{1b} , β_{2a} , β_3 y β_4) muestran algunas diferencias importantes subtipo-específicas. Por ejemplo, en la mayor parte de los subtipos de α_1 , el subtipo β_{2a} reduce marcadamente la tasa de inactivación de la corriente, mientras que β_3 produce una pronunciada aceleración de la misma (Walker y De Waard, 1998; Catterall, 2000). La modulación de las cinéticas de la corriente no sólo depende del subtipo preciso de subunidad β sino también del subtipo α_1 con el cual interactúa (Walker y De Waard, 1998; Stotz y Zamponi, 2001). Sin embargo, en todos los tipos de subunidades α_1 , la expresión de subunidades β induce, invariablemente, un incremento en la densidad de corriente y un corrimiento hacia potenciales hiperpolarizantes en la dependencia de voltaje de su activación (Walker y De Waard, 1998; Catterall, 2000).

Esta última observación tiene un especial interés para el tema que, a lo largo de esta tesis, se ha venido tratando: las alteraciones mencionadas que induce la presencia de subunidades β son exactamente contrarias a aquellas que induce la inhibición VD por PG (ver texto). Más aún, no sólo la dirección de los cambios que inducen cada una son opuestos, sino que, además, tanto en neuronas nativas como en sistemas de expresión, la depleción de subunidades β aumenta el grado de inhibición por PG, mientras que la sobreexpresión de la misma bloquea la inhibición (Berrow et al., 1995; Campbell et al., 1995; Roche et al., 1995; Bourinet et al., 1996; Dolphin, 1998).

El conjunto de las observaciones anteriores llevó al grupo de A. C. Dolphin (Campbell et al., 1995) a proponer que las PG podrían ejercer sus efectos al competir con la subunidad β de los CCDV, previniendo los efectos de esta última sobre la actividad de la subunidad α_1 . Esta idea habría de volverse sumamente popular al ser demostrado que, los mismos sitios en la subunidad α_1 que son críticos para la interacción con la subunidad β , tienen afinidad por subunidades β y de las PG (Ilustr. 4; De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997).

Todos los subtipos β presentan un arreglo estructural similar, en el que dos dominios altamente conservados (de 107 y 203 aminoácidos) están flanqueados, y separados entre sí, por

tres regiones altamente variables (Stotz y Zamponi, 2001). Los primeros 30 aminoácidos del segundo dominio conservado son cruciales para la interacción de las subunidades β con el asa citoplasmática de α_1 , que conecta al primer y segundo dominios transmembranales (el *loop I-II*). Por este motivo, dicha región es conocida como el dominio de interacción β (BID; por *beta-interaction domain*; De Waard et al., 1994). Por su parte, la región de interacción en el *loop I-II* es llamada el dominio de interacción α (AID; por *alpha interaction domain*; De Waard et al., 1997). El sitio AID se encuentra en los seis subtipos de subunidades α_1 clonadas y consiste de una secuencia de 18 aminoácidos, nueve de los cuales se encuentran universalmente conservados (Q1, Q2, E3, L6, G8, Y9, W13, I14 y E18), y es tanto necesario como suficiente para la unión a la subunidad α_1 de la subunidad β (De Waard et al., 1997).

Sin embargo, la interacción AID-BID por sí misma es insuficiente para explicar todo el potencial regulatorio de la subunidad β (Walker y De Waard, 1998). Al menos dos regiones adicionales en la subunidad α_1 contienen, además, sitios de afinidad con la subunidad β : las regiones N- (Walker et al., 1999) y *C-terminales* (Qin, 1997; Tareilus et al., 1997; Walker et al., 1998) (Ilustr. 4). Es interesante hacer notar dos puntos: (1) Estos sitios adicionales tienen una afinidad mucho menor por la subunidad β que el sitio AID (unas 30 veces menos; Walker y De Waard, 1998); (2) No sólo *todos* estos sitios de interacción α_1 - β han sido implicados en la expresión del fenotipo completo de corriente modulada por PG (ver texto; Zhang et al., 1996a), sino que también el orden de afinidad relativa que muestran estos sitios por las subunidades $G\beta\gamma$ guardan un paralelismo estrecho con aquel de la subunidad β (*loop I-II* >>> *C-terminal*; Ilustr. 4).

Si bien la modulación por subunidades $G\beta\gamma$ no puede reducirse a un escenario de competencia con la subunidad β (Zhang et al., 1996a), este cuadro de múltiples sitios de interacción con grados de afinidad variable será crítico para consolidar algunas de las inferencias realizadas en esta tesis.

Por largo tiempo fue sostenido que únicamente la subunidad $G\alpha$ mediaba la transducción de señales, y se pensaba que $G\beta\gamma$ funcionaba únicamente como una subunidad reguladora de la primera. Después de la demostración inicial de que el complejo $G\beta\gamma$ activa al canal muscarínico de K^+ (Logothetis et al., 1987), se ha reportado que un número creciente de efectores es regulado por este dímero. Entre ellos, se encuentran varias isoformas de la adenilato ciclasa, la fosfolipasa A_2 , la $PLC\beta$, los CCDV tipo N y P/Q, los canales de Na^+ dependientes de voltaje, la cinasa del receptor β -adrenérgico (β ARK), varias proteínas de la cascada de la cinasa MAP y varias GRKs (Clapham y Neer, 1997). En todos estos casos, existen evidencias de una interacción directa entre $G\beta\gamma$ y el efector (Gautam et al., 1998). Dado que la conformación de la subunidad $G\beta\gamma$ no es alterada tras su disociación de $G\alpha$ y que la unión a esta última generalmente impide que $G\beta\gamma$ active sus efectores, se piensa que el sitio los sitios de unión a $G\alpha$ y a los efectores se solapan (Clapham y Neer, 1997). Por lo menos en los casos de la AC II, del GIRK1 (una subunidad del canal de K^+ atrial), de la $PLC\beta_2$, de la calmodulina y de la cinasa MAP, la región de interacción con los efectores se localiza en la subunidad $G\beta$ (revisado en Gautam et al., 1998).

III.3. La PKC

Desde su descubrimiento en 1977, la PKC ha sido el foco de atención de biólogos interesados en los mecanismos mediante los cuales las señales externas son transmitidas al interior de las células (Nishizuka, 1988; Newton, 1997). Los estudios que se han efectuado indican que la PKC se encuentra involucrada en respuestas celulares a varios y diversos estímulos exógenos, que incluyen hormonas, NT y algunos factores de crecimiento (Nishizuka, 1992). Todos éstos comparten entre sí la propiedad de transmitir las señales extracelulares - de la superficie celular al interior de la célula - a través de dos rutas: activación de la PKC y movilización de Ca^{2+} de depósitos intracelulares. A menudo, ambas rutas son activadas simultáneamente como resultado de una sola interacción entre un ligando adecuado y un receptor específico, y actúan conjuntamente para evocar respuestas celulares subsecuentes, como aquellas que involucran los procesos de liberación de NT y hormonas (Nishizuka, 1984).

De hecho, la PKC transduce no solamente la información transmitida por activación de RHs acoplados a PG sino, también, la enorme cantidad de señales que inducen la hidrólisis de

fosfolípidos mediada por activación de receptores con actividad de cinasas de tirosina y de otras tirosin-cinasas sin actividad de receptor (Newton, 1997).

La PKC se encuentra presente en una gran variedad de tejidos y no muestra ni especificidad tisular ni especie-especificidad (Castagna et al, 1982). Se distribuye ampliamente en tejidos y órganos, pero, entre éstos, el tejido nervioso concentra la máxima actividad específica (Nishizuka, 1984). Por definición, la PKC es una proteína periférica de membrana: puede ser removida de las fracciones subcelulares membranales mediante procedimientos que no perturban la integridad estructural de la membrana misma, como la adición de un quelante de cationes divalentes (Bell, 1986).

Las altas concentraciones de PKC en tejidos nerviosos se correlacionan con el amplio espectro de funciones neuronales en las que se ha reportado su participación (Tanaka y Nishizuka, 1994; Newton, 1997). Por ejemplo, se ha demostrado que, la vía de la PKC, puede modular la excitabilidad neuronal y la eficacia de la transmisión sináptica, y se ha propuesto que esto podría constituir lo que ha sido considerado como las bases para algunas formas de memoria (Tanaka y Nishizuka, 1994; Newton, 1997): la activación de la PKC, en células nerviosas, ha sido frecuentemente asociada con la modulación de canales iónicos (Shearman et al, 1989), desensibilización de receptores (Huganir y Greengard, 1990), aumento en la liberación de NT (Tanaka y Nishizuka, 1994).

La vía de activación de la PKC involucra la hidrólisis de los fosfolípidos presentes en la membrana plasmática (Asaoka et al, 1992). La activación de la fosfolipasa C (PLC) conduce a la hidrólisis de los fosfolípidos de inositol presentes en la membrana plasmática, con preferencia por el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2 ; Nishizuka, 1984). Uno de los productos de esta hidrólisis, el sn-1,2-diacilglicerol (DAG), es un activador de la PKC (Bell, 1986). Desde su descubrimiento, el DAG ha sido implicado en numerosos procesos celulares, que incluyen la regulación de fenómenos de secreción, expresión genética y de la actividad de receptores de la superficie celular, activación de plaquetas y neutrófilos, y, en términos generales, procesos involucrados en la regulación del metabolismo, el crecimiento y la diferenciación celular (Bell, 1986). El papel del DAG como segundo mensajero fue reconocido primeramente por Nishizuka y colegas, quienes observaron que el DAG incrementa la afinidad de la PKC por Ca^{2+} y fosfatidil-L-serina (PS), causando la activación de dicha enzima a niveles fisiológicos de Ca^{2+} :

cuando la actividad de la PKC es analizada en un ensayo libre de células, la PKC depende tanto de Ca^{2+} como de fosfolípidos, particularmente PS, para su activación (Castagna et al, 1982); sin embargo, la presencia de DAG incrementa la afinidad de esta enzima por el Ca^{2+} , de manera que requiera de cantidades mínimas ($\approx 10^{-7}$ M) de este catión bivalente, y la vuelve, por tanto, completamente activa sin un incremento neto en la concentración citosólica fisiológica de Ca^{2+} (Castagna et al, 1982; Nishizuka, 1984). La activación de la PKC es, por tanto, bioquímicamente dependiente, pero fisiológicamente independiente, del catión bivalente (Nishizuka, 1984): en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} , la activación de la PKC requiere de menos degradación de fosfolípidos, mientras que en presencia de una intensa degradación de lípidos, se requiere de menos Ca^{2+} para activar la enzima. Aparentemente, el DAG activa a la PKC con una estequiometría 1:1 (Nishizuka, 1984). Ésto no indicaría necesariamente que active a la enzima por interacciones directas ligando-ligando, sino que, más bien (según se ha interpretado), cada molécula de DAG modifica un microambiente en la membrana plasmática, dentro del cual, la PKC produce un complejo cuaternario (compuesto de la enzima, fosfolípidos, Ca^{2+} y el DAG), en conformación plenamente activa para la fosforilación proteica (Nishizuka, 1984; Newton, 1997).

Los ésteres de forbol promotores de tumores (tumor-promoting phorbol esters) y sus análogos son sn-1,2-DAGs exógenos, derivados de aceites contenidos en la semilla de ciertas plantas (p.e., *Croton tiglium*), que pueden sustituir al DAG y, así, activar a la PKC directamente, sin necesidad de inducir el metabolismo de fosfatidilinositol (Castagna et al, 1982; Bell, 1986). Además, la alta permeabilidad que tienen en membranas celulares permite activar la PKC desde fuera de la célula, sin necesidad de estimular RHHs asociados con su activación fisiológica, lo cual los ha vuelto sumamente populares desde su descubrimiento, sobretodo en experimentos con células completas (Castagna et al, 1982; Nishizuka, 1984; Siegel, 1994). Aparentemente, una molécula de promotor tumoral, que entra a la bicapa fosfolipídica de la membrana por intercalación, activa una molécula de la enzima a través de un mecanismo análogo al descrito para el DAG, sin embargo, los ésteres de forbol son más potentes que el DAG para activar a la PKC (Bell, 1986). Al contrario del DAG, que es metabolizado muy rápidamente (tanto cuando es producido endógenamente como cuando es agregado desde el exterior), los ésteres de forbol son metabólicamente estables (Nishizuka, 1992).

Cuando el grupo de Yasutomi Nishizuka demostró que los ésteres de forbol, potentes promotores de tumores, podían estimular la actividad de la PKC (Castagna et al., 1982), atrajo la atención de muchos grupos de investigación y provocó una literal explosión de trabajos (que aún no cesa de crecer en nuestros días) sobre el papel de la PKC en numerosos procesos biológicos (Hidaka y Hagiwara, 1989). En particular, la idea de que la PKC estuviese involucrada en la modulación de CCDV resultaba particularmente atractiva porque esta cinasa se encuentra especialmente concentrada en los componentes membranales del tejido nervioso y, además, en el cerebro se encuentra asociada una gran cantidad de la PKC con membranas sinápticas, mientras que en la mayor parte de los demás tejidos, la enzima es recuperada principalmente, de la fracción soluble y en configuración inactiva (Nishizuka, 1984).

A pesar de ésto, la mayor parte de la información que se tenía de la enzima provenía de estudios hechos en plaquetas y poco se sabía acerca de los posibles papeles que podría jugar en el sistema nervioso. Las acciones de la PKC en CCDV_N de neuronales de vertebrados habrían de probar ser un largo sujeto de debate, en el que se han aportado toda clase de evidencias contradictorias.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Abrahams TP, Schofield GG (1992) Norepinephrine-induced Ca^{2+} current inhibition in adult rat sympathetic neurons does not require protein kinase C activation. *Eur J Pharmacol* 227:189-197
- 2 Ahljianian MK, Striessnig J, Catterall WA (1991) Phosphorylation of an α_1 -like subunit of an ω -conotoxin-sensitive brain calcium channel by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* 266:20192-20197
- 3 Ahn J, Pietrini G, Muth TR, Caplan MJ (1998) Expression of neurotransmitter transport systems in polarized cells. *Methods Enzymol* 296:370-389
- 4 Aozaki T, Kasai H (1989) Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and ω -conotoxin GVLA. *Pflügers Arch* 414:150-156
- 5 Armstrong CM, Matteson DR (1985) Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227:65-67
- 6 Arnot MI, Stotz SC, Jarvis SE, Zamponi GW (2000) Differential modulation of N-type 1B and P/Q-type 1A calcium channels by different G protein subunit isoforms. *J Physiol* 527:203-12
- 7 Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y (1992) Protein Kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem Sci* 17: 414-17
- 8 Atlas D (2001) Functional and physical coupling of voltage-sensitive calcium channels with exocytotic proteins. ramifications for the secretion mechanism. *J Neurochem* 77:972-985
- 9 Banker G, Goslin K (1992) Primary dissociated cell cultures of neural tissue. In: Banker G, Goslin K (ed) *Culturing nerve cells*. The MIT Press, Cambridge, MA pp 11-73
- 10 Barrett CF, Rattenhouse AR (2000) Modulation of N-type calcium channel activity by G-proteins and protein kinase C. *J Gen Physiol* 115:277-286
- 11 Bashor MM (1979) Dispersion and disruption of tissues. *Methods Enzymol* LVIII:119-131
- 12 Bayewitch ML, Avidor-Reiss T, Levy R, Pfeuffer T, Nevo I, Simonds WF, Vogel Z (1998) Differential modulation of adenylyl cyclases I and II by various G_{β} subunits. *J Biol Chem* 273:2273-2276
- 13 Bean BP (1985) Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86:1-30
- 14 Bean BP (1989a) Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51:367-384
- 15 Bean BP (1989b) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340:153-156
- 16 Bean BP (1992) Whole-cell recording of calcium channel currents. *Methods Enzymol* 207:181-193
- 17 Bean BP (2000) Modulating modulation. *J Gen Physiol* 115:273-275
- 18 Beech D, Bernheim L, Hille B (1992) Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron* 8:97-106
- 19 Beech DJ, Bernheim L, Mathue A, Hille B (1991) Intracellular Ca^{2+} buffers disrupt muscarinic suppression of Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:652-656
- 20 Bell RM (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45:631-632

21. Belluzzi O, Sacchi O (1986) A quantitative description of the sodium current in the rat sympathetic neurone. *J Physiol* 380:275-291
22. Bernheim L, Beech DJ, Hille B (1991) A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron* 6:859-867
23. Bernheim L, Mathie A, Hille B (1992) Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9544-9548
24. Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13-26
25. Berrow N, Campbell V, Fitzgerald E, Brickley K, Dolphin A (1995) Antisense depletion of β -subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J Physiol* 482:481-491
26. Bezanilla F (1996) El impulso nervioso. En: Latorre R, López-Barneo J, Bezanilla F, Llinás R (ed) *Biofísica y fisiología celular*. Universidad de Sevilla, España. pp 229-258
27. Black IB (1977) Regulation of the growth and development of sympathetic neurons in vivo. En: Hall Z, Kelly R, Fox CF (ed) *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol 15: Cellular Neurobiology. Alan R Liss, New York, NY pp 61-71
28. Blair LAC, Bence KK, Marshall J (1999) Jellyfish green fluorescent protein: a tool for studying ion channels and second-messenger signaling in neurons. *Methods Enzymol* 302:213-225
29. Bley KR, Tsien RW (1990) Inhibition of Ca^{2+} and K^{+} channels in bullfrog sympathetic neurons by neuropeptides and other ganglionic transmitters. *Neuron* 3:379-391
30. Boland LM, Bean BP (1993) Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J Neurosci* 13:516-533
31. Boland LM, Morrill JA, Bean BP (1994) ω -Conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:5011-5027
32. Boll W, Lux HD (1985) Action of organic antagonists on neuronal calcium currents. *Neurosci Lett* 56:335-339
33. Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ (2001) The organization and functions of local Ca^{2+} signals. *J Cell Sci* 114:2213-2222
34. Bourinet E, Soong TW, Stea A, Snutch TP (1996) Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1486-1491
35. Boyer JL, Graber SG, Waldo GL, Harden TK, Garrison JC (1994) Selective activation of phospholipase C by recombinant G-protein α - and β -subunits. *J Biol Chem* 269:2814-2819
36. Bray D (1970) Surface movements during the growth of single explanted neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 65:905-910
37. Bray D (1992) Isolated chick neurons for the study of axonal growth. En: Banker G, Goslin K (ed) *Culturing nerve cells*. The MIT Press, Cambridge, MA pp 119-135
38. Brehm P, Eckert R (1978) Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 202:1203-1206
39. Breitwieser GE (1996) Mechanisms of K^{+} channel regulation. *J Membrane Biol* 152:1-11
40. Brody DL, Yue DT (2000) Relief of G-protein inhibition of calcium channels and short-term synaptic facilitation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:889-898
41. Campbell V, Berrow EM, Fitzgerald EM, Brickley K, Dolphin AC (1995) Inhibition of the interaction of G protein G_o with calcium channels by the calcium channel β -subunit in rat neurones. *J Physiol* 485:365-372
42. Carabelli V, Lovallo M, Magnelli V, Zucker H, Carbone E (1996) Voltage-dependent modulation of single N-type Ca^{2+} channel kinetics by receptor agonists in IMR32 cells. *Biophys J* 70:2144-2154
43. Carbone E, Lux HD (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-502

44. Carbone E, Lux HD (1987a) Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol* 386:547-570
45. Carbone E, Lux HD (1987b) Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones. *J Physiol* 386:571-601
46. Carbone E, Magnelli V, Pollo A, Carabelli V, Albilos A, Zucker H (1998) Biophysics of voltage-dependent Ca^{2+} channels: gating kinetics and their modulation. In: *Ion channel pharmacology*. Soria B, Ceña V (ed). Oxford University Press, Oxford
47. Carman CV, Benovic JL (1998) G-protein-coupled receptors: turns-ons and turns-offs. *Curr Opin Neurobiol* 8:335-344
48. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257:7847-7851
49. Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555
50. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805
51. Chen C, Schofield GG (1993) Differential neuromodulation of calcium currents by norepinephrine in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 70:1440-1450
52. Chen J, Devivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, Stoffel RH, Inglese J, Lefkowitz RJ, Logothetis DE, Hildebrandt JD, Iyengar R (1995) A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Science* 268:1166-1169
53. Chen Y, Penington NJ (1997) Order of application determines the interaction between phorbol esters and GTP- γ -S in dorsal raphe neurons: evidence that the effect of 5-HT is modified upstream of the G protein Ca channel interaction. *J Neurophysiol* 77:2697-2703
54. Clapham DE (1991) Direct G protein activation of ion channels? *Annu Rev Neurosci* 17:441-464
55. Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* 80:259-268
56. Clapham DE (1996) Intracellular signalling: More jobs for $G\beta\gamma$. *Curr Biol* 6:814-816
57. Clapham DE, Neer EJ (1997) G protein $\beta\gamma$ subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203
58. Colecraft HM, Patil PG, Yue DT (2000) Differential occurrence of reluctant openings in G-protein-inhibited N- and P/Q-type calcium channels. *J Gen Physiol* 115:175-192
59. Cox DH, Dunlap K (1992) Pharmacological discrimination of N-type from L-type calcium current and its selective modulation by transmitters. *J Neurosci* 12:906-914
60. Cox DH, Dunlap K (1994) Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. *J Gen Physiol* 104:311-336
61. Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD, Lefkowitz RJ (1997) Receptor and G $\beta\gamma$ isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2180-2185
62. De Luca A, Li CG, Rand MJ, Reid JJ, Thana P, Wong-Dusting HK (1990) Effects of ω -conotoxin GVIA on autonomic neuroeffector transmission in various tissues. *Br J Pharmacol* 101:437-447
63. De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VES, Gurnett CA, Campbell KP (1997) Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385:446-450
64. De Waard M, Pragnell M, Campbell KP (1994) Ca^{2+} channel regulation by a conserved β subunit domain. *Neuron* 13:495-503
65. Deisz RA, Lux HD (1985) γ -Aminobutyric acid-induced depression of calcium currents of chick sensory neurons. *Neurosci Lett* 56:205-210
66. Delcour A, Tsien R (1993) Altered prevalence of gating modes in neurotransmitter inhibition of N-type calcium channels. *Science* 259:980-984
67. Delmas P, Abogadie JC, Dayrel M, Hale JJ, Milligan G, Caulfield MP, Brown DA, Buckley

- NJ (1998a) G-proteins and G-protein subunits mediating cholinergic inhibition of N-type calcium currents in sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 10:1654-1666
68. Delmas P, Abogadie FeC, Milligan G, Buckley NJ, Brown DA (1999) β dimmers derived from G_o and G_i proteins contribute different components of adrenergic inhibition of Ca^{2+} channels in rat sympathetic neurones. *J Physiol* 518.1:23-36
69. Delmas P, Brown D, Dayrell M, Abogadie F, Caulfield M, Buckley N (1998b) On the role of endogenous G-protein β subunits in the N-type Ca^{2+} current inhibition by neurotransmitters in rat sympathetic neurones. *J Physiol* 506:319-329
70. DeRiemer SA, Strong JA, Albert KA, Greengard P, Kaczmarek LK (1985) Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. *Nature* 313:313-316
71. Diverse-Pierluissi M, Dunlap K (1993) Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron* 10:753-760
72. Diversé-Pierluissi M, Goldsmith PK, Dunlap K (1995) Transmitter-mediated inhibition of N-type calcium channels in sensory neurons involves multiple GTP-binding proteins and subunits. *Neuron* 14:191-200
73. Diversé-Pierluissi M, McIntire WE, Myung CS, Lindorfer MA, Garrison JC, Goy MF, Dunlap K (2000) Selective coupling of G protein β complexes to inhibition of Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 275:28380-28385
74. Doerner D, Abdel-Latif M, Rogers TB, Alger BE (1990) Protein kinase C-dependent and -independent effects of phorbol esters on hippocampal calcium channel current. *J Neurosci* 10:1699-1706
75. Doerner D, Pitler TA, Alger BE (1988) Protein kinase C activators block specific calcium and potassium current components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci* 8:4069-4078
76. Dohlman HG, Bouvier M, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987b) The multiple membrane spanning topography of the beta 2-adrenergic receptor. Localization of the sites of binding, glycosylation, and regulatory phosphorylation by limited proteolysis. *J Biol Chem* 262:14282-14288
77. Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987a) A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26:2657-2664
78. Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60:653-688
79. Dolphin AC (1998) Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J Physiol* 506:3-11
80. Dolphin AC, McGuirk SM, Scott RH (1989) An investigation into the mechanisms of inhibition of calcium channel currents in cultured sensory neurones of the rat by guanine nucleotide analogues and (-)-baclofen. *Br J Pharmacol* 97:263-273
81. Dolphin AC, Page KM, Berrow NS, Stephens GJ, Cantù C (1999) Dissection of the calcium channel domains responsible for modulation of neuronal voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Ann NY Acad Sci* 868:160-74
82. Doroshenko PA, Kostyuk PG, Martynyuk AE (1982) Intracellular metabolism of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and calcium inward current in perfused neurones of *Helix pomatia*. *Neuroscience* 7:2125-2134
83. Dubei SJ, Starr TV, Hell J, Ahljianian MK, Enyeart JJ, Catterall WA, Snutch TP (1992) Molecular cloning of the α_1 subunit of an ω -conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5058-5062
84. Dunlap K (1985) Forskolin prolongs action potential duration and blocks potassium current in embryonic chick sensory neurons. *Pflügers Arch* 403:170-174
85. Dunlap K (1997) Integration hot-spot gets hotter. *Nature* 385:394-397
86. Dunlap K, Fischbach GD (1978) Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potential. *Nature* 276:837-839
87. Dunlap K, Fischbach GD (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of

- embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* 317:519-535
- 88 Eccles JC, McGeer PL (1979) Ionotropic and metabotropic neurotransmission. *Trends Neurosci* 2:39-40
 - 89 Eckert R, Chad JE (1984) Inactivation of Ca channels. *Prog Biophys Mol Biol* 44:215-267
 - 90 Eckert R, Randall D, Augustine G (1988) *Animal physiology*. 3rd Ed. W. H. Freeman and Company, New York, NY
 - 91 Ehrlich I, Elmslie KS (1995) Neurotransmitters acting via different G proteins inhibit N-type calcium current by an identical mechanism in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 74:2251-2257
 - 92 Elmslie KS (1992) Calcium current modulation in frog sympathetic neurons: multiple neurotransmitters and G proteins. *J Physiol* 451:229-246
 - 93 Elmslie KS, Jones SW (1994) Concentration dependence of neurotransmitter effects on calcium current kinetics in frog sympathetic neurones. *J Physiol* 481:35-46
 - 94 Elmslie KS, Kammermeier PJ, Jones SW (1994) Reevaluation of Ca²⁺ channel types and their modulation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 13:217-228
 - 95 Elmslie KS, Werz MA, Overholt JL, Jones SW (1993) Intracellular ATP and GTP are both required to preserve modulation of N-type calcium channel current by norepinephrine. *Pflügers Arch* 423:472-479
 - 96 Elmslie KS, Zhou W, Jones S (1990) LHRH and GTP- γ -S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 5:75-80
 - 97 Ertel EA, Campell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Scharf A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535
 - 98 Ertel SI, Ertel EA (1997) Low-voltage-activated T type Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* 18:37-42
 - 99 Ewald DA, Sternweis PC, Miller R (1988) Guanine nucleotide-binding protein G_i-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca²⁺ channels in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3633-3637
 - 100 Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS (1981) Calcium channels in the somatic membrane of the rat dorsal root ganglion neurons, effect of cAMP. *Brain Res* 214:210-214
 - 101 Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS (1985) Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 359:431-446
 - 102 Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS (1991) Ionic mechanisms of electrical excitability in rat sensory neurons during postnatal ontogenesis. *Neuroscience* 41:303-309
 - 103 Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS (1994) Comparative analysis of ionic currents in the somatic membrane of embryonic and newborn rat sensory neurons. *Neuroscience* 58:341-346
 - 104 Fenwick EM, Marty A, Neher E (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 331:599-635
 - 105 Fletcher JE, Lindorfer MA, DeFilippo JM, Yasuda H, Guilford M, Garrison JC (1998) The G protein β_5 subunit interacts selectively with the G_q α subunit. *J Biol Chem* 273:636-644
 - 106 Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. *Science* 280:1271-1274
 - 107 Formenti A, Arrigoni E, Mancini M (1993) Two distinct modulatory effects on calcium channels in adult rat sensory neurons. *Biophys J* 64:1029-1037
 - 108 Forscher P, Oxford GS (1985) Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons. *J Gen Physiol* 85:743-763
 - 109 Forscher P, Oxford GS, Schulz D (1986) Noradrenaline modulates calcium channels in avian dorsal root ganglion cells through tight receptor-channel coupling. *J Physiol* 379:131-144

110. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW (1987a) Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* 394:149-172
111. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW (1987b) Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol* 394:173-200
112. Frank C, Engert F, Tokutomi N, Lux HD (1996) Different effects of baclofen and GTPyS on voltage-activated Ca^{2+} currents in rat hippocampal neurons in vitro. *Eur J Pharmacol* 295:87-92
113. Freissmuth M, Waldhoer M, Bofill-Cardona E, Nanoff C (1999) G protein antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 20:237-245
114. Freschi JE (1983) Membrane currents of cultured rat sympathetic neurons under voltage clamp. *J Neurophysiol* 50:1460-1478
115. Freschi JE, Hitarogoku SH (1965) Membrane currents of cultured rat sympathetic neurons under voltage clamp. *J Cell Biol* 39:309-316
116. Furukawa T, Miura R, Mori Y, Strobeck M, Suzuki K, Ogihara Y, Asano T, Morishita R, Hashii M, Higashida H, Yoshii M, Nukada T (1998b) Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca^{2+} channels with G-protein α and $\beta\gamma$ subunits. II. Evidence for direct binding. *J Biol Chem* 273:17595-17603
117. Furukawa T, Nukada T, Mori Y, Wakamori M, Fujita Y, Ishida H, Fukuda K, Kato S, Yoshii M (1998a) Differential interactions of the C terminus and the cytoplasmic I-II loop of neuronal Ca^{2+} channels with G-protein α and $\beta\gamma$ subunits. I. Molecular determination. *J Biol Chem* 273:17585-17594
118. Galvan M, Adams PR (1982) Control of calcium current in rat sympathetic neurons by norepinephrine. *Brain Res* 244:135-144
119. Galvan M, Sedlmeir C (1983) An N-shaped current-voltage relationship in rat sympathetic neurones. *Pflügers Arch* 398:78-80
120. Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B (1998) G-protein β -subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca^{2+} channels. *J Neurosci* 18:9163-9170
121. Gautam N, Downes GB, Yan K, Okisselev O (1998) The G-protein $\beta\gamma$ complex. *Cell Signal* 10:447-455
122. Gelmini S, Pinzan P, Pazzagli M (2000) Luciferase gene as a reporter: comparison with the CAT gene and use in transfection and microinjection of mammalian cells. *Methods Enzymol* 305:557-576
123. Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:239-247
124. Gierschik P, Camps M (1994) Stimulation of phospholipase C by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Methods Enzymol* 238:181-195
125. Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615-649
126. Golard A, Role LW, Siegelbaum SA (1993) Protein kinase C blocks somatostatin-induced modulation of calcium current in chick sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 70:1639-1643
127. Golard A, Siegelbaum SA (1993) Kinetic basis for the voltage-dependent inhibition of N-type calcium current by somatostatin and norepinephrine in chick sympathetic neurons. *J Neurosci* 13:3884-3894
128. Grassi F, Lux HD (1989) Voltage-dependent GABA-induced modulation of calcium currents in chick sensory neurons. *Neurosci Lett* 105:113-119
129. Greengard P, Snyder G, Fisone G, Aperia A (1995) Interactions of signal transduction pathways in the nervous system. En: Ottoson D, Bartfai T, Hökfelt T, Fuxe K (ed) *Challenges and perspectives in neuroscience*. Pergamon. Great Britain. Wenner-Gren International Series: vol. 66
130. Gross RA, Macdonald RL (1988) Reduction of the same calcium current component by A and C kinases: differential pertussis toxin sensitivity. *Neurosci Lett* 88:50-56
131. Gross RA, MacDonald RL (1989) Activators of protein kinase C selectively enhance inactivation of a calcium current component of cultured

- sensory neurons in a pertussis toxin-sensitive manner. *J Neurophysiol* 61:1259-1269
132. Gudermann T, Shöneberg T, Schultz G (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 20:399-427
133. Gurney AM, Nerbonne JM, Rayburn HB (1986) Development of voltage-activated currents in rat superior cervical ganglion cells in culture. *J Physiol* 372:50P
134. Gutnick MJ, Lux HD, Swandulla D, Zucker H (1989) Voltage-dependent and calcium-dependent inactivation of calcium channel current in identified snail neurones. *J Physiol* 412:197-220
135. Hagiwara S, Byerly L (1981) Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* 4:69-125
136. Hagiwara S, Byerly L (1983) The calcium channel. *Trends Neurosci* 6:189-193
137. Hagiwara S, Ohmori H (1982) Studies of calcium channels in rat clonal pituitary cells with patch electrode voltage clamp. *J Physiol* 331:231-252
138. Hagiwara S, Ozawa S, Sand O (1975) Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65:617-644
139. Hamid J, Nelson D, Spaetgens R, Dubel SJ, Snutch TP, Zamponi GW (1999) Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem* 274:6195-6202
140. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Plugs Arch* 391:85-100
141. Hansh OE, Role LW (1992) Activation of phosphoinositide turnover and protein kinase C by neurotransmitters that modulate calcium channels in embryonic chick sensory neurons. *Int J Dev Neurosci* 10:421-433
142. Hawrot E, Patterson PH (1979) Long-term culture of dissociated sympathetic neurons. *Methods Enzymol* 1A:III 574-584
143. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY (1995) Improved green fluorescence. *Nature* 373:663-664
144. Hell JW, Appleyard SM, Yokoyama CT, Warner C, Catterall WA (1994) Differential phosphorylation of two size forms of the N-type calcium channel α_1 subunit which have different COOH termini. *J Biol Chem* 269:7390-7396
145. Helmreich EJ, Pfeuffer T (1976) Control of catecholamine stimulated adenylate cyclase in pigeon erythrocyte membranes by guanylnucleotides. *Adv Enzyme Regul* 15:209-220
146. Herlitze S, Garcia D, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall W (1996) Modulation of Ca^{2+} channels by G-protein β subunits. *Nature* 380:258-262
147. Herlitze S, Hockerman G, Scheuer T, Catterall WA (1997) Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel α_1A subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1512-1516
148. Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G (1987) The GTP-binding protein G_{α} , regulates neuronal calcium channels. *Nature* 325:445-447
149. Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1984) Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311:538-544
150. Heuss C, Gerber U (2000) G-protein-independent signaling by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 23:469-475
151. Hidaka H, Hagiwara M (1989) Molecular pharmacology of protein kinase C. En: Hidaka H (ed) *Calcium protein signalling*. Plenum Press, New York, NY pp 1-7
152. Huggins D, Lein PJ, Osterhout DJ, Johnson MI (1992) Tissue culture of mammalian autonomic neurons. En: Banker G, Goslin K (ed) *Culturing nerve cells*. The MIT Press, Cambridge, MA pp 177-205
153. Hille B (1992a) Ionic channels of excitable membranes. 2nd Ed. Sinauer, Sunderland
154. Hille B (1992b) G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 9:187-195

155. Hille B (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17:531-536
156. Hille B, Beech DJ, Bernheim L, Mathie A, Shapiro MS, Wollmuth LP (1995) Multiple G-protein-coupled pathways inhibit N-type Ca channels of neurons. *Life Sci* 56:989-992
157. Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, Tsien RW (1988) Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239:57-61
158. Hirning LD, Fox AP, Miller R (1990) Inhibition of calcium currents in cultured myenteric neurons by neuropeptide Y: evidence for direct receptor/channel coupling. *Brain Res* 532:120-130
159. Hockberger P, Toselli M, Swandulla D, Lux HD (1989) A diacylglycerol analogue reduces neuronal calcium currents independently of protein kinase C activation. *Nature* 338:340-342
160. Hofmann F, Biel M, Flockerzi V (1994) Molecular basis for Ca^{2+} channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 17:399-418
161. Holz GG, Dunlap K, Kream RM (1988) Characterization of the electrically evoked release of substance P from dorsal root ganglion neurons: methods and dihydropyridine sensitivity. *J Neurosci* 8:463-471
162. Holz GG, Kream RM, Spiegel A, Dunlap K (1989) G proteins couple α -adrenergic and GABA_B receptors to inhibition of peptide secretion from peripheral sensory neurons. *J Neurosci* 9:657-666
163. Holz GG, Rane SG, Dunlap K (1986) GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 319:670-672
164. Horn JP, McAfee DA (1979) Norepinephrine inhibits calcium-dependent potentials in rat sympathetic neurons. *Science* 204:1233-1235
165. Horn JP, McAfee DA (1980) Alpha-adrenergic inhibition of calcium-dependent potentials in rat sympathetic neurones. *J Physiol* 301:191-204
166. Hoshi T, Rothlein J, Smith SJ (1984) Facilitation of Ca^{2+} -channel currents in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5871-5875
167. Huganir RL, Greengard P (1990) Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* 5:555-567
168. Ikeda SR (1991) Double-pulse calcium current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol* 439:181-214
169. Ikeda SR (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 380:255-258
170. Ikeda SR (1997) Heterologous expression of receptors and signaling proteins in adult mammalian sympathetic neurons by microinjection. *Methods Mol Biol* 83:191-202
171. Ikeda SR, Dunlap K (1999) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33:131-151
172. Ikeda SR, Schofield GG (1987) Tetrodotoxin-resistant sodium current of rat nodose neurones: monovalent cation selectivity and divalent cation block. *J Physiol* 389:255-270
173. Jackson MB, Konnerth A, Augustine GJ (1991) Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:380-384
174. Jakobs KH, Schultz G, Gaugler B, Pfeuffer T (1983) Inhibition of NS-protein-stimulated human-platelet adenylate cyclase by epinephrine and stable GTP analogs. *Eur J Biochem* 134:351-354
175. Johnson MI, Argiro V (1983) Techniques in the tissue culture of rat sympathetic neurons. *Methods Enzymol* 103:334-47
176. Jones LP, DeMaria CD, Yue DT (1999) N-type calcium channel inactivation probed by gating-current analysis. *Biophys J* 76:2530-2552
177. Jones SW (1990) Whole-cell and microelectrode voltage clamp. In: Boulton AA, Baker GB, Vanderwolf CH (ed) *NeuroMethods*, Vol 14: Neurophysiological techniques: basic methods and concepts. The Humana Press, Clifton, NJ pp 143-192

- 178 Jones SW (1991) Time course of receptor-channel coupling in frog sympathetic neurons. *J Biophys J* 60:502-507
- 179 Jones SW (1998) Overview of voltage-dependent calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 30 299-312
- 180 Jones SW, Elmslie KS (1997) Transmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Membr Biol* 155:1-10
- 181 Jones SW, Marks TN (1989a) Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. I. Activation kinetics and pharmacology. *J Gen Physiol* 94:151-167
- 182 Jones SW, Marks TN (1989b) Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. II *Inactivation*. *J Gen Physiol* 94:169-182
183. Kaczmarek LK, Levitan IB (1987) What is neuromodulation? En: Kaczmarek LK, Levitan IB (ed) *Neuromodulation. The biochemical control of neuronal excitability*. Oxford University Press, New York, NY pp 3-17
184. Kammermeier PJ, Ruiz-Velasco V, Ikeda SR (2000) A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both $G\alpha_{q/11}$ and $G\beta\gamma$. *J Neurosci* 20:5623-5629
185. Kasai H (1991) Tonic inhibition and rebound facilitation of a neuronal calcium channel by a GTP-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8855-8859
186. Kasai H (1992) Voltage- and time-dependent inhibition of neuronal calcium channels by a GTP-binding protein in a mammalian cell line. *J Physiol* 448:189-209
- 187 Kasai H, Aosaki T (1989) Modulation of Ca -channel current by an adenosine analog mediated by a GTP-binding protein in chick sensory neurons. *Pflügers Arch* 414:145-149
- 188 Kasai H, Aosaki T, Fukuda J (1987) Presynaptic Ca -antagonist ω -conotoxin irreversibly blocks N-type Ca -channels in chick sensory neurons. *Neurosci Res* 4:228-235
189. Katada T, Oinuma M, U_i M (1986a) Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *J Biol Chem* 261:5215-5221
- 190 Katada T, Oinuma M, U_i M (1986b) Two guanine nucleotide-binding proteins in rat brain serving as the specific substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. Interaction of the alpha-subunits with beta gamma-subunits in development of their biological activities. *J Biol Chem* 261:8182-8191
191. Katz A, Wu D, Simon MI (1992) Subunits $\beta\gamma$ of the heterotrimeric G-protein activate the $\beta 2$ isoform of phospholipase C. *Nature* 360:686-689
- 192 Kehoe JS, Marty A (1980) Certain slow synaptic responses: their properties and possible underlying mechanisms. *Annu Rev Biophys Bioeng* 9:437-465
193. Kerr LM, Yoshikami D (1984) A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature* 308:282-284
194. Kostyuk PG (1981) Calcium channels in the neuronal membrane. *Biochem Biophys Acta* 650:128-150
195. Kostyuk PG, Shuba YaM, Savchenko AN (1988) Three types of calcium channels in the membrane of mouse sensory neurons. *Pflügers Arch* 411:661-669
196. Kriegstein AR, Suppes T, Prince DA (1987) Cellular and synaptic physiology and epileptogenesis of developing rat neocortical neurons in vitro. *Brain Res* 431:161-171
197. Lee HK, Elmslie KS (2000) Reluctant gating of single N-type calcium channels during neurotransmitter-induced inhibition in bullfrog sympathetic neurons. *J Neurosci* 20:3115-3128
198. Leonard JP, Nargeot J, Snutch TP, Davidson N, Lester HA (1987) Ca channels induced in *Xenopus* oocytes by rat brain mRNA. *J Neurosci* 7:875-881
199. Lester RA, Jahr CE (1990) Quisqualate receptor-mediated depression of calcium currents in hippocampal neurons. *Neuron* 4:741-749
- 200 Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1963) Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory

- and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Dev Biol* 7:653-659
201. Levitan IB, Kaczmarek LK (1997) *The neuron. Cell and molecular biology*. 2nd Ed. Oxford University Press, New York, NY
202. Lewin MJM, Cheret AM (1989) Cell isolation techniques: use of enzymes and chelators. *Methods Enzymol* 171:444-461
203. Lewis DL, Ikeda SR (1997) Inhibition of M-type K^+ and N-type Ca^{2+} channels by the human gonadotropin-releasing-hormone receptor heterologously expressed in adult neurons. *Neuroendocrinology* 66:235-245
204. Lin Z, Haus S, Edgerton J, Lipscombe D (1997) Identification of functionally distinct isoforms of the N-type Ca^{2+} channel in rat sympathetic ganglia and brain. *Neuron* 18:153-166
205. Lipscombe D, Kongsamut S, Tsien RW (1989) α -Adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* 340:639-642
206. Litosch I (1997) G-protein $\beta\gamma$ subunits antagonize protein kinase C-dependent phosphorylation and inhibition of phospholipase C- β_1 . *Biochem J* 326:701-707
207. Llinas R, Sugimori M, Cherksey B (1989b) Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann N Y Acad Sci* 560:103-111
208. Llinas R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B (1992b) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca^{2+} channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* 15:351-355
209. Llinas R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B (1989a) Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FIX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1689-1693
210. Llinas R, Yarom Y (1981a) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol*. 315:549-567
211. Llinas R, Yarom Y (1981b) Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. *J Physiol* 315:569-584
212. Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* 325:321-326
213. Lopez HS, Brown AM (1991) Correlation between G protein activation and reblocking kinetics of Ca^{2+} channel currents in rat sensory neurons. *Neuron* 7:1061-1068
214. Luebke JI, Dunlap K (1994) Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflügers Arch* 428:499-507
215. Lundy PM, Frew P (1993) Pharmacological characterization of voltage-sensitive Ca^{2+} channels in autonomic nerves. *Eur J Pharmacol* 231:197-202
216. Mains RE, Patterson PH (1973) Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. I. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties. *J Cell Biol* 59:329-345
217. Marchant JS, Parker I (2000) Functional interactions in Ca^{2+} signaling over different time and distance scales. *J Gen Physiol* 116:6912001-09-14
218. Marchetti C, Carbone E, Lux HD (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflügers Arch* 406:104-111
219. Marchetti C, Robello M (1989) Guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) modifies kinetics of voltage-dependent calcium current in chick sensory neurons. *Biophys J* 56:1267-1272
220. Marrion NV, Smart TG, Brown DA (1987) Membrane currents in adult rat superior cervical ganglia in dissociated tissue culture. *Neurosci Lett* 77:55-60
221. Mathie A, Bemheim L, Hille B (1992) Inhibition of N- and L-type calcium channels by muscarinic receptor activation in rat sympathetic neurons. *Neuron* 8:907-914
222. McCleskey EW, Fox AP, Feldman D, Tsien RW (1986) Different types of calcium channels. *J Exp Biol* 124:177-190

- 223 McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, Yoshikami D (1987) ω -Conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4327-4331
- 224 McDonough SI, Swartz KJ, Mintz IM, Boland LM, Bean BP (1996) Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by ω -conotoxin MVIIC. *J Neurosci* 16:2612-2623
- 225 McFadzean I, Mullaney I, Brown DA, Milligan G (1989) Antibodies to the GTP binding protein, G_{α} , antagonize noradrenaline-induced calcium current inhibition in NG108-15 hybrid cells. *Neuron* 3:177-182
- 226 Miller R (1990) Receptor-mediated regulation of calcium channels and neurotransmitter release. *FASEB J* 4:3291-3299
- 227 Mintz IM, Adams ME, Bean BP (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9:85-95
- 228 Moronov SL, Lux HD (1992) Glutamate selectively increases the high-threshold Ca^{2+} channel current in sensory and hippocampal neurons. *Brain Res* 580:341-344
- 229 Monod J, Changeux JP, Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 6:306-329
- 230 Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965) On the nature of allosteric transitions. A plausible model. *J Mol Biol* 12:88-118
- 231 Monkawa H, Mima H, Uga H, Shoda T, Kazuhiko F (1999) Opioid potentiation of N-type Ca^{2+} channel currents via pertussis-toxin-sensitive G proteins in NG108-15 cells. *Pflügers Arch* 438:423-426
- 232 Mudge AW, Leeman SE, Fischbach GD (1979) Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:526-530
- 233 Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249-257
- 234 Neer EJ, Lok JM, Wolf LG (1984) Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylate cyclase. *J Biol Chem* 259:14222-14229
- 235 Neher E (1992) Nobel lecture Ion channels for communication between and within cells. *Neuron* 8:605-612
- 236 Neher E, Sakmann B (1976) single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802
- 237 Neher E, Sakmann B, Seibach JH (1978) The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch* 375:219-228
- 238 Nerbonne JM, Gurney AM (1989) Development of excitable membrane properties in mammalian sympathetic neurons. *J Neurosci* 9:3272-3286
- 239 Newton AC (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Op Cell Biol* 9:161-167
- 240 Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW (1985) A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316:443-446
- 241 Nishizuka Y (1984) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225:1365-1370
- 242 Nishizuka Y (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-665
- 243 Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614
- 244 Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443
- 245 Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, de Santos V, Cruz LJ (1985) Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 230:1338-1343
- 246 Page K, Stephens G, Berrow N, Dolphin A (1997) The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E type calcium channel. *J Neurosci* 17:1330-1338

247. Park D, Dunlap K (1998) Dynamic regulation of calcium influx by G-proteins, action potential waveform, and neuronal firing frequency. *J Neurosci* 18:6757-6766
248. Park D, Dunlap K (1998) Dynamic regulation of calcium influx by G-proteins, action potential waveform, and neuronal firing frequency. *J Neurosci* 18:6757-6766
249. Patil PG, Brody DL, Yue DT (1998) Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron* 20:1027-1038
250. Patil PG, de Leon M, Reed RR, Dubel S, Snutch TP, Yue DT (1996) Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophys J* 71:2509-2521
251. Pattillo JM, Artim DE, Simples JE, Meriney (1999) Variations in onset of action potential broadening: effects on calcium current studied in chick ciliary ganglion neurones. *J Physiol* 514:719-728
252. Perez-Reyes E, Castellano A, Kim H, Bertrand P, Bagstrom E, Lacerda A, Wei X, Birnbaumer, L (1992) Cloning and expression of cardiac/brain β subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* 267:1792-1797
253. Perri V, Sacchi O, Casella C (1970) Electrical properties and synaptic connections of the sympathetic neurons in the rat and guinea-pig superior cervical ganglion. *Pflügers Arch* 314:40-54
254. Plant TD (1988) Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 404:731-747
255. Plummer MR, Hess P (1991) Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels. *Nature* 351:657-659
256. Plummer MR, Logothetis DE, Hess P (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* 2:1453-1463
257. Plummer MR, Rittenhouse A, Kanevsky M, Hess P (1991) Neurotransmitter modulation of calcium channels in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 11:2339-2348
258. Pollo A, Lovallo M, Sher E, Carbone E (1992) Voltage-dependent noradrenergic modulation of omega-conotoxin-sensitive Ca^{2+} channels in human neuroblastoma IMR32 cells *Pflügers Arch* 422:75-83
259. Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Direct interaction of G $\beta\gamma$ with a C-terminal G $\beta\gamma$ -binding domain of the Ca^{2+} channel α_1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8866-8871
260. Rane SG, Dunlap K (1986) Kinase C activator 1,2-oleoylacylglycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:184-188
261. Rane SG, Holz GG, Dunlap K (1987) Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium channel current and substance P release. *Pflügers Arch* 409:361-366
262. Rane SG, Walsh MP, McDonald JR, Dunlap K (1989) Specific inhibitors of protein kinase C block transmitter-induced modulation of sensory neuron calcium current. *Neuron* 3:239-245
263. Regan LJ, Sah DWY, Bean BP (1991) Ca^{2+} channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin. *Neuron* 6, 269-280
264. Reuter H (1967) The dependence of slow inward current in Purkinje fibers on the extracellular calcium concentration. *J Physiol* 192:479-492
265. Reuter H (1974) Localization of beta adrenergic receptors, and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents and tension in mammalian cardiac muscle. *J Physiol* 242:429-451
266. Roche J, Anantharam V, Treisman S (1995) Abolition of G protein inhibition of α_1A and α_1B calcium channels by coexpression of the β_3 subunit. *FEBS Lett* 371:43-46
267. Roche J, Treisman S (1998) The Ca^{2+} channel β_3 subunit differentially modulates G-protein sensitivity of α_1A and α_1B Ca^{2+} channels. *J Neurosci* 18:878-886

- 268 Rodbell M (1980) The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284:17-22
- 269 Ruegg UT, Burgess GM (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but non-specific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10:218-220
- 270 Ruiz-Velasco V, Ikeda SR (2000) Multiple G-protein $\beta\gamma$ combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons. *J Neurosci* 20:2183-2191
- 271 Sabatini BL, Regehr WG (1999) Timing of synaptic transmission. *Annu Rev Physiol* 61:521-542
- 272 Sala F (1991) Activation kinetics of calcium currents in bull-frog sympathetic neurones. *J Physiol* 437:221-238
- 273 Schofield GG (1990) Norepinephrine blocks a calcium current of adult rat sympathetic neurons via an α_2 -adrenoreceptor. *Eur J Pharmacol* 180:37-47
- 274 Schofield GG, Ikeda SR (1988) Sodium and calcium currents of acutely isolated adult rat superior cervical ganglion neurons. *Pflügers Arch* 411:481-490
- 275 Scott BS (1977) Adult mouse dorsal root ganglia neurons in cell culture. *J Neurobiol* 8:417-427
- 276 Scott BS (1982) Adult neurons in cell culture: electrophysiological characterization and use in neurobiological research. *Prog Neurobiol* 19:187-211
- 277 Scott RH, Dolphin AC (1986) Regulation of calcium currents by a GTP analogue: potentiation of (-)-baclofen-mediated inhibition. *Neurosci Lett* 69:59-64
- 278 Scott RH, Dolphin AC (1990) Voltage-dependent modulation of rat sensory neurone calcium channel currents by G protein activation: effect of a dihydropyridine antagonist. *Br J Pharmacol* 99:629-630
- 279 Shapiro R, Silberberg SD, Ginsburg S, Rahamimoff R (1987) Activation of protein kinase C augments evoked transmitter release. *Nature* 325:58-60
- 280 Shapiro MS, Hille B (1993) Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron* 10:11-20
- 281 Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B (1994a) Angiotensin II inhibits calcium and M current channels in rat sympathetic neurons via G proteins. *Neuron* 12:1319-1329
- 282 Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B (1994b) Modulation of Ca^{2+} channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:7109-7116
- 283 Shapiro MS, Zhou J, Hille B (1996) Selective disruption by protein kinases of G-protein-mediated Ca^{2+} channel modulation. *J Neurophysiol* 76:311-320
- 284 Shearman MS, Sekiguchi K, Nishizuka Y (1989) Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family. *Pharmacol Rev* 41:211-237
- 285 Shekter L, Taussig R, Gillard E, Miller R (1997) Regulation of human neuronal calcium channels by G protein $\beta\gamma$ subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 52:282-291
- 286 Shepherd GM (1988) *Neurobiology*. 2nd Ed. Oxford University Press, New York, NY
- 287 Siegel GJ (Ed). *Basic Neurochemistry*. 5a ed. 1994, New York, Raven Press
- 288 Sigel E, Baur R (1988) Activation of protein kinase C differentially modulates neuronal Na^+ , Ca^{2+} , and γ -aminobutyrate type A channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6192-6196
- 289 Song SY, Saito K, Noguchi K, Konishi S (1989) Different GTP-binding proteins mediate regulation of calcium channels by acetylcholine and noradrenaline in rat sympathetic neurons. *Brain Res* 494:383-386
- 290 Song SY, Saito K, Noguchi K, Konishi S (1991) Adrenergic and cholinergic inhibition of Ca^{2+} channels mediated by different GTP-binding proteins in rat sympathetic neurones. *Pflügers Arch* 418:592-600
- 291 Stea A, Soong TW, Snutch TP (1995) Determinants of PKC-dependent modulation

- of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* 15:929-940
292. Stephens G, Brice N, Berrow N, Dolphin AC (1998a) Facilitation of rabbit α_{1B} calcium channels: involvement of endogenous $G\beta\gamma$ subunits. *J Physiol* 509:15-27
293. Stephens G, Canti C, Page K, Dolphin AC (1998b) Role of domain I of neuronal Ca^{2+} channel α_1 subunits in G protein modulation. *J Physiol* 509:163-169
294. Sternweis PC, Robishaw JD (1984) Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 259:13806-13813
295. Stotz SC, Zamponi GW (2001) Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca^{2+} channels. *Trends Neurosci* 24:176-181
296. Strong JA, Fox AP, Tsien RW, Kaczmarek LK (1987) Stimulation of protein kinase C recruits covert calcium channels in *Aplysia* cell bag neurons. *Nature* 325:714-717
297. Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC, Nairn AC, Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by a D_1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14:385-397
298. Swandulla D, Armstrong CM (1988) Fast-deactivating calcium channels in chick sensory neurons. *J Gen Physiol* 92:197-218
299. Swandulla D, Carbone E, Lux HD (1991) Do calcium channel classifications account for neuronal calcium channel diversity? *Trends Neurosci* 14:46-51
300. Swartz KJ (1993) Modulation of Ca^{2+} channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron* 11:305-320
301. Swartz KJ, Mernt A, Bean BP, Lovinger DM (1993) Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca^{2+} channels and synaptic transmission. *Nature* 361:165-168
302. Tanaka C, Nishizuka Y (1994) The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci* 17:551-567
303. Tareilus E, Roux M, Qin N, Olcese R, Zhou J, Stefani E, Birnbaumer J. (1997) A *Xenopus* oocyte β subunit: Evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1703-1708
304. Tillotson D (1979) Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1497-1500
305. Toselli M, Lang J, Costa T, Lux HD (1989) Direct modulation of voltage-dependent calcium channels by muscarinic activation of a pertussis toxin-sensitive G-protein in hippocampal neurons. *Pflügers Arch* 415:255-261
306. Toth PT, Bindokas VP, Bleakman D, Colmers WF, Miller RJ (1993) Mechanism of presynaptic inhibition by neuropeptide Y at sympathetic nerve terminals. *Nature* 364:635-639
307. Tsien RW (1987) Calcium currents in heart cells and neurons. En: Kaczmarek LK, Levitan IB (ed) *Neuromodulation. The biochemical control of neuronal excitability*. Oxford University Press, New York, NY pp 206-242
308. Turner TJ, Adams ME, Dunlap K (1992) Calcium channels coupled to glutamate release identified by ω -Aga-IVA. *Science* 258:310-313
309. Ueda N, Iniguez-Lluhi JA, Lee E, Smrcka AV, Robishaw JD, Gilman AG (1994) G protein $\beta\gamma$ subunits. Simplified purification and properties of novel isoforms. *J Biol Chem* 269:4388-4395
310. Usowicz MM, Sugimori M, Cherksey B, Llinas R (1992a) P-type calcium channels in the somata and dendrites of adult cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 9:1185-1199
311. Viana F, Bayliss DA, Berger AJ (1994) Postnatal changes in rat hypoglossal motoneuron membrane properties. *Neuroscience* 59:131-148
312. Wakshull E, Jonson MI, Burton H (1979) Postnatal rat sympathetic neurons in culture. I. A comparison with embryonic neurons. *J Neurophysiol* 42:1411-1425
313. Walker D, Bichet D, Campbell KP, De Waard M (1998) A β_4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-

- dependent Ca^{2+} channel α_{1v} subunit. *J Biol Chem* 273:2361-2367
- 314 Walker D, Bichet D, Geib S, Mori E, Cornet V, Snutch TP, Mori Y, De Waard M (1999) A new β subtype-specific interaction in α_{1A} subunit controls P/Q-type Ca^{2+} channel activation. *J Biol Chem* 274:12383-12390
- 315 Walker D, De Waard M (1998) Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca^{2+} channels. role in channel function. *Trends Neurosci* 21:148-154
- 316 Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozzan T, Meldolesi J (1987) Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca^{2+} current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4313-4317
- 317 Watson AJ, Katz A, Simon MI (1994) A fifth member of the mammalian G-protein β -subunit family. Expression in brain and activation of the β_2 isotype of phospholipase C. *J Biol Chem* 269:22150-22156
- 318 Werz MA, Elmslie KS, Jones SW (1993) Phosphorylation enhances inactivation of N-type calcium channel current in bullfrog sympathetic neurons. *Pflügers Arch* 424:538-545
- 319 Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel α_1 subunit. *Neuron* 9:1099-1115
- 320 Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264:107-111
- 321 Wickman K, Clapham D (1995) Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* 75:865-885
- 322 Wilding TJ, Womack MD, McCleskey EW (1995) Fast, local signal transduction between the mu opioid receptor and Ca^{2+} channels. *J Neurosci* 15:4124-4132
- 323 Williams ME, Brust PF, Feldman DH, Patthi S, Simerson S, Maroufi A, McCue AF, Velicelbi G, Ellis SB, Harpold M (1992) Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257:389-395
- 324 Williams ME, Brust PF, Feldman DH, Patthi S, Simerson S, Maroufi A, McCue AF, Velicelbi G, Ellis SB, Harpold MM (1992) Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257:389-395
- 325 Williams S, Serafin M, Muhlethaler M, Bernheim L (1997) Facilitation of N-type calcium current is dependent on the frequency of action potential-like depolarizations in dissociated cholinergic basal forebrain neurons of the guinea pig. *J Neurosci* 17:1625-1632
- 326 Wollmuth LP, Shapiro MS, Hille B (1995) Pancreatic polypeptide inhibits calcium channels in rat sympathetic neurons via two signaling pathways. *J Neurophysiol* 73:1323-1328
- 327 Yan K, Gautam N (1996) A domain on the G protein β subunit interacts with both adenylyl cyclase 2 and the muscarinic atrial potassium channel. *J Biol Chem* 271:17597-17600
- 328 Yan K, Kalyanaraman V, Gautam N (1996) Differential ability to form the G protein $\beta\gamma$ complex among members of the β and γ subunit families. *J Biol Chem* 271:7141-7146
- 329 Yang J, Tsien RW (1993) Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* 10:127-136
- 330 Yavin E, Yavin Z (1974) Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. *J Cell Biol* 62:540-546
- 331 Zamponi GW, Bounnet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha 1 subunit. *Nature* 385:442-446
- 332 Zamponi GW, Snutch TP (1998) Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol* 8:351-356
- 333 Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW (1996a) Multiple structural elements in voltage-dependent Ca^{2+} channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* 17:991-1003
- 334 Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Hoine WA, Sather WA, Fanabe T, Schwarz TL, Tsien RW (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their

- possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32:1075-1088
- 335 Zhang S, Coso OA, Lee C, Gutkind JS, Simonds WF (1996b) Selective activation of effector pathways by brain-specific G protein β_5 . *J Biol Chem* 271:33575-33579
- 336 Zhou J, Shapiro MS, Hille B (1997) Speed of Ca^{2+} channel modulation by neurotransmitters in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 77:2040-2048
- 337 Zhu Y, Ikeda SR (1994) Modulation of Ca^{2+} -channel currents by protein kinase C in adult rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 72:1549-1560
338. Zong X, Lux HD (1994) Augmentation of calcium channel currents in response to G protein activation by GTP γ S in chick sensory neurons. *J Neurosci* 14:4847-4853
339. Zucker RS (1996) Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17:1049-1055

*"If I go insane
please don't put your wires
in my brain."*

R. Waters, 1970

13. ANEXOS: TRABAJOS PUBLICADOS

The Journal of Neuroscience, November 15, 1998, 18(22):9163-9170

G-Protein β -Subunit Specificity in the Fast Membrane-Delimited Inhibition of Ca^{2+} Channels

David E. García,^{1,5} Bin Li,³ Rafael E. García-Ferreiro,⁵ Erick O. Hernández-Ochoa,⁵ Kang Yan,⁴ Narasimhan Gautam,⁴ William A. Catterall,³ Ken Mackie,^{1,2} and Bertil Hille¹

Departments of ¹Physiology and Biophysics, ²Anesthesiology, and ³Pharmacology, University of Washington, Seattle, Washington 98195, ⁴Department of Anesthesiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110, and ⁵Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70250, C.P. 04510, México, Distrito Federal México

We investigated which subtypes of G-protein β subunits participate in voltage-dependent modulation of N-type calcium channels. Calcium currents were recorded from cultured rat superior cervical ganglion neurons injected intracellularly with DNA encoding five different G-protein β subunits. $\text{G}\beta_1$ and $\text{G}\beta_2$ strongly mimicked the fast voltage-dependent inhibition of calcium channels produced by many G-protein-coupled receptors. The $\text{G}\beta_3$ subunit produced much weaker effects than $\text{G}\beta_1$ and $\text{G}\beta_2$, whereas $\text{G}\beta_3$ and $\text{G}\beta_4$ were nearly inactive in these electrophysiological studies. The specificity implied by these results was confirmed and extended using the yeast two-hybrid system to test for protein-protein interactions. Here, $\text{G}\beta_1$ or

$\text{G}\beta_2$ coupled to the GAL4-activation domain interacted strongly with a channel sequence corresponding to the intracellular loop connecting domains I and II of a α_1 subunit of the class B calcium channel fused to the GAL4 DNA-binding domain. In this assay, the $\text{G}\beta_3$ subunit interacted weakly, and $\text{G}\beta_3$ and $\text{G}\beta_4$ failed to interact. Together, these results suggest that $\text{G}\beta_1$ and/or $\text{G}\beta_2$ subunits account for most of the voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels and that the linker between domains I and II of the calcium channel α_1 subunit is a principal receptor for this inhibition.

Key words: G-proteins; calcium channel; norepinephrine; yeast 2-hybrid; sympathetic neurons; ion channel modulation

Inhibition of neuronal calcium currents by G-protein-coupled receptors probably occurs in every type of neuron. It is a ubiquitous mode of modulation of electrical activity and synaptic function by neighboring neurons. A common form uses a signaling pathway whose components appear to be restricted to the cell membrane (membrane-delimited), develops in <1 sec, and is voltage-dependent, i.e., the inhibition can be partially relieved by a strong depolarizing pulse (for review, see Hille, 1994). A well studied example is the inhibition of N-type calcium channels by norepinephrine (NE) acting on α_2 adrenergic receptors in superior cervical ganglion (SCG) neurons. This type of inhibition is mediated by β -subunits of G-proteins, apparently acting directly on the channel (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996).

The specificity for $\text{G}\beta$ and $\text{G}\gamma$ subunits has not been investigated, and the target site for the interaction of G-protein β subunits with calcium channels is the subject of some debate. By analogy with other $\text{G}\beta\gamma$ -effector proteins, several investigators have proposed that the target site on voltage-gated calcium channels includes a QXXER motif in the intracellular loop connecting domains I and II ($\text{L}_{1,11}$) of the α_1 subunits of classes A, B, and E (the P/Q-, N-, and R-type) calcium channels (De Waard et al.,

1997; Herlitze et al., 1997; Page et al., 1997; Zamponi et al., 1997). This QXXER sequence overlaps with the region required for interaction with the calcium channel β subunit. In contrast, some investigators argue that an interaction of $\text{G}\beta\gamma$ -subunits with the C terminus of calcium channel α_1 subunit is the functionally important one (Zhang et al., 1996a; Qin et al., 1997). Here, we inject DNA for various G-protein β subunits into the nucleus of adult rat SCG neurons and find that only certain $\text{G}\beta$ subunits will induce inhibition of the endogenous N-type Ca^{2+} currents. Then, we used the yeast two-hybrid assay to look for interactions between $\text{G}\beta$ subunits and a domain of the channel. We find that exactly the same $\text{G}\beta$ subunits that inhibit current also interact well with the linker between domains I and II of the α_1 subunit of the class B (N-type) calcium channel. Together, these results identify the $\text{G}\beta$ subunits that can mediate fast, membrane-delimited, and voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels, and they identify a target domain of the channel that has the appropriate binding specificity.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and intranuclear microinjection. Single SCG neurons were enzymatically dissociated from 5-week-old male rats (Sprague Dawley rats were used for the experiments in Figs. 1–3 in Seattle, and Wistar rats were used in the experiments in Figs. 4 and 5 in Mexico) as described previously (Beech et al., 1991; Bernheim et al., 1991). After a 4 hr wait for attachment to the substrate, the neurons were intranuclearly microinjected using an Eppendorf S242 pressure microinjector and 5171 microinjection system (Eppendorf, Madison, WI). The injection solution contained varying amounts of G-protein expression plasmids mixed with two injection markers, 1 mg/ml 10,000 kDa dextran-thioretin (Molecular Probes, Eugene, OR), and green fluorescent protein (GFP) plasmid as an expression reporter. Injection at pressures of 10–20 kPa for

Received July 1, 1998; revised Aug. 26, 1998; accepted Aug. 27, 1998.

This work was supported by the W. M. Keck Foundation, an Alexander von Humboldt Stiftung Fellowship, DGAPA Universidad Nacional Autónoma de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, and National Institutes of Health Grants NS01588, DA08934, DA00266, NS08174, NS22625, and GM46963. N.G. is an Established Investigator of the American Heart Association. We thank D. Anderson, S. Benson, and L. Miller for technical help.

Correspondence should be addressed to Dr. Bertil Hille, Department of Physiology and Biophysics, Box 357290, University of Washington, Seattle, WA 98195-7290.

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1411-98.2000

Copyright © 1998 Society for Neuroscience 0270-6474/98/189163-08\$05.00/0

0.5–0.8 sec resulted in no obvious increase in cell volume. After 12–16 hr, successfully injected neurons were identified by their characteristic greenish-blue GFP fluorescence using an inverted microscope equipped with epifluorescence and fluorescein optics.

Electrophysiological recording. Currents were recorded using the whole-cell voltage-clamp technique (Hamill et al., 1981) with a patch-clamp amplifier at room temperature. Pipettes (0.85–2 M Ω) were pulled from microhematocrit glass and fire polished. During recording, neurons were constantly perfused locally (1–2 ml/min) with the appropriate external solution. Solution reservoirs were selected by means of solenoid valves, and solution changes were accomplished in <10 sec. Voltage protocols were generated, and data were digitized, recorded, and analyzed using BASIC-FASTLAB (Indec Systems, Cupertino, CA).

To measure calcium currents, we used two sets of solutions. In the experiments of Figures 1–3, the pipette solution contained (in mM): 125 N-methyl-D-glucamine, 20 TEA-Cl, 10 HEPES, 0.1 tetraethylammonium-BAPTA, 4 MgCl₂, 0.1 leupeptin, 4 Na₂ATP, and 0.3 Na₂GTP, pH adjusted to 7.2 with methanesulfonic acid. The external solution contained (in mM): 140 TEA-OH, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 15 glucose, 0.0001 TTX, and 0.002 nifedipine, pH adjusted to 7.3 with methanesulfonic acid. In the experiments of Figures 4 and 5, the pipette solution contained (in mM): 125 methanesulfonic acid, 20 TEA-Cl, 10 HEPES, 0.1 tetraethylammonium-BAPTA, 4 MgCl₂, 5 MgATP, 0.3 Na₂GTP, and 0.1 leupeptin, pH adjusted to 7.2 with CsOH. The external solution contained (in mM): 162.5 TEA-Cl, 10 HEPES, 8 glucose, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.0002 TTX, and 0.002 nifedipine, pH adjusted to 7.3 with TEA-OH.

The Ca^{2+} current of rat SCG neurons is carried ~85–90% in N-type channels and the remainder in L-type channels, with no detectable P/Q component (Mintz et al., 1992). Therefore, the N-type Ca^{2+} current could be defined as the component of the current sensitive to 100 μ M Cd²⁺ in the presence of 2 μ M nifedipine. Currents were sampled at 10 kHz. To emphasize the effects of kinetic slowing of Ca^{2+} current activation, current amplitudes were always taken as the mean value of recorded points between 5 and 6 msec after the start of the depolarizing test pulse. This time is before the current reaches a peak. Because the magnitude of the Ca^{2+} current was dependent on cell size, aggregate current data are presented as current densities normalized to cell capacitance. To avoid one source of systematic bias, experimental and control measurements were alternated whenever possible, and concurrent controls were always performed. Where appropriate, data are expressed as mean \pm SE.

Plasmids and materials. The DNAs encoding $G\beta_2$, $G\beta_3$, and $G\beta_4$ were cloned in pCDNA1 plasmid, $G\beta_3$ was cloned in pCDM8, $G\beta_4$ was cloned in pCIS, $G\gamma_3$ was cloned in pCI (all from M. Simon, Caltech, Pasadena, CA), and GFP was cloned in pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA). Although not in identical vectors, all G-protein-containing plasmids were driven by the cytomegalovirus promoter. DNA encoding the L₄₋₁₁ loop of rat brain N-type calcium channel (α_1B) was subcloned into the pAS2-1 vector (Clontech) as an *EcoRI*–*BamHI* fragment (nt 1069–1449; aa 357–483) to express a GAL4 DNA-binding domain (GBD) hybrid protein. The bovine G-protein β_1 subunit and β_2 subunit genes were subcloned into the pACT vector (Clontech) to express GAL4-activation domain (GAD) hybrid proteins. The plasmids pACT- $G\beta_1$, pACT- $G\beta_2$, and pACT- $G\beta_3$ were described previously (Yan et al., 1996). Plasmids were purified using commercial kits (Qiagen, Valencia, CA). The yeast strain was PJ69-4A (*MAT a urp1-901 leu2-3,112 ura 3-52 his3-200 gal4 Δ gal 80 Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL-HIS3 met2::GAL7-lacZ*) (a gift of Dr. Philip James, University of Wisconsin) (James et al., 1996). This strain contains three reporters (*ADE2*, *HIS3*, and *LacZ*) that can be activated as a result of protein–protein interaction by reconstituted GAL4 transactivator function.

Tetraethylammonium-BAPTA was obtained from Molecular Probes, and all other salts were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Yeast two-hybrid assay. Plasmids were made expressing hybrid proteins consisting either of a specific $G\beta$ subunit coupled to a GAD or an intracellular loop of the α_1 N-type calcium channel fused to a GBD. A plasmid expressing one of the GBD hybrids and the plasmid expressing the GAD hybrid were cotransformed into yeast strain PJ69-4A (usually without introducing any mammalian G γ subunit). Cells were first plated on a tryptophan-free leucine-free medium to select Trp⁺ Leu⁺ transformed cells containing the GBD hybrid- and GAD hybrid-expressing plasmids. To detect protein–protein interactions, these transformants were then transferred onto medium that also lacked adenine and histidine.

Immunoblotting. To check the expression of G-protein subunit hybrids

in yeast, transformed yeast cells were grown to saturation phase. Cultures (1.5 ml) were harvested and resuspended in 150 μ l of Z buffer (in mM: 30 Na₂HPO₄, 35 NaHPO₄, 10 KCl, and 0.4 MgSO₄, pH 7.0) with 5% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 1 μ g/ml aprotinin, and 2 μ g/ml leupeptin, followed by addition of 0.1 gm of 425–600 μ m glass beads (Sigma). The cells were vortexed for 4 min and centrifuged for 10 min at 4°C. The supernatants were saved, and 20 μ l cell lysates were fractionated on a SDS gel. The separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed with anti-GAD antibody (0.2 μ g/ml; Clontech), followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:2000; Amersham, Piscataway, NJ). The GAD hybrid proteins were detected by the enhanced chemiluminescence method (Amersham).

RESULTS

We begin with the typical NE-induced modulation of N-type calcium currents. In control SCG neurons, a 20 msec depolarizing test pulse elicited a rapidly activating inward Ca^{2+} current (Fig. 1A, left), which was primarily carried in N-type channels because the medium contained 2 μ M nifedipine to block L-type channels. Perfusion with 10 μ M NE reduced the inward current amplitude by ~60% and slowed its rate of activation. To monitor current facilitation, as well as amplitude, we clamped the membrane potential using the voltage protocol in Figure 1A. Inward Ca^{2+} currents were evoked every 10 sec with a pair of 20 msec depolarizing test pulses to +10 mV from a holding potential of –80 mV, one before (test pulse 1) and the other after (test pulse 2) a 25 msec prepulse to +125 mV. The depolarizing prepulse transiently relieves much of the NE-induced inhibition, and the resulting facilitation can be seen by comparing currents in test pulse 2 with those in test pulse 1. The “facilitation ratio,” defined as the current during test pulse 2 (at 5–6 msec) divided by the current during test pulse 1, is a convenient measure of voltage-dependent membrane-delimited inhibition by certain G-proteins. In standard Ringer’s solution, this facilitation ratio is near 1.1, and after treatment with NE, it rises to 1.6.

Dose-dependent suppression of I_{Ca} by overexpression of $G\beta_2$

Previously, we had found that injection of RNA for $G\beta_2$ subunits, with and without RNA for $G\gamma_3$, into the cytoplasm of SCG neurons inhibited Ca^{2+} currents, increased the facilitation ratio, and partially occluded the actions of NE (Herlitze et al., 1996). Ikeda (1996) reported even stronger effects with intranuclear injection of DNA. To optimize conditions for intranuclear injection here, we first determined the dose–response relationship for the action of $G\beta_2$ by varying the concentration of $G\beta_2$ DNA injected, which was always coinjected with 100 ng/ μ l $G\gamma_3$ and 100 ng/ μ l GFP DNA. Injection of $G\beta_2$ plasmid at 10, 20, and 100 ng/ μ l induced progressively larger facilitation and kinetic slowing of activation in standard Ringer’s solution (Fig. 1B–D). Injection at 600 ng/ μ l (Fig. 1E) gave about the same facilitation as 100 ng/ μ l. Figure 1F shows the dose–response relationship for development of facilitation after these injections of DNA for $G\beta_2$ compared with that after injection of $G\beta_3$. Quite clearly, $G\beta_2$ has a much greater effect than $G\beta_3$. Injection with 100 or 500 ng/ μ l $G\beta_3$ DNA solution did not induce facilitation (Fig. 1F); indeed, injection of $G\beta_3$ slightly reduced facilitation below control levels (facilitation ratio, 1.03 ± 0.02 ; $n = 10$; $p < 0.05$).

The current traces after injection of $G\beta_2$ show that the progressive increase of facilitation was accompanied by a decreasing effectiveness of NE and a decrease in basal calcium current density. The increasing amounts of expressed $G\beta_2$ subunits presumably occlude the actions of NE and block N-type calcium channels. The facilitation ratio is consistently a more sensitive

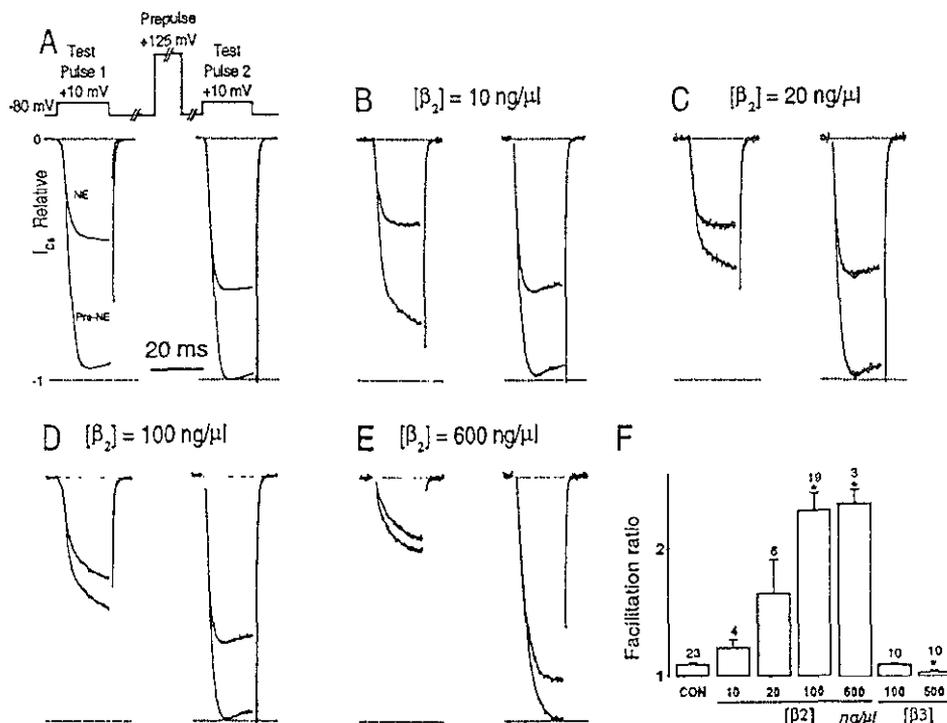


Figure 1. Injecting $\text{G}\beta_2$ DNA increases calcium current facilitation. *A–E*, Superimposed calcium current (I_{Ca}) traces during a 20 msec depolarization (test pulse) to +10 mV from a holding potential of -80 mV, in the absence (*bottom trace*) or presence (*top trace*) of NE ($10 \mu\text{M}$), before (*left*) or after (*right*) a 25 msec +125 mV prepulse. Successive panels show uninjected cells (*A*) and cells injected with increasing concentrations of $\text{G}\beta_2$ DNA (*B–E*). $\text{G}\beta_2$ DNA was coinjected with $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ $\text{G}\gamma_3$ DNA in all cases. *F*, Summary of facilitation ratios for injections of several concentrations of $\text{G}\beta_2$ and $\text{G}\beta_3$ DNA.

indicator of $\text{G}\beta_2$ actions than the occlusion of NE action or the basal current density. From the dose–response curves for these three actions (Fig. 2), we elected to use $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ $\text{G}\beta$ plasmids in the next experiments.

The dashed arrow in Figure 2*A* represents an extrapolated $\text{G}\beta_2$ DNA concentration ($7 \text{ ng}/\mu\text{l}$) that would be equivalent to the control basal facilitation levels, assuming that the facilitation ratio in the total absence of endogenous $\text{G}\beta$ would be the fitted value 0.94.

Identification of the $\text{G}\beta$ subtypes that modulate Ca^{2+} currents

The apparent inability of $\text{G}\beta_3$ to produce facilitation prompted us to undertake a more systematic study of the effectiveness of the various G-protein β subunits in calcium channel inhibition. As before, we measured facilitation, tonic inhibition, and occlusion of further inhibition by NE. Again in control cells, application of $10 \mu\text{M}$ NE strongly reduced the Ca^{2+} current magnitude (Fig. 3*A*, *left*). Figure 3, *B* and *D*, illustrates Ca^{2+} currents recorded from neurons that had been injected with $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ DNA for $\text{G}\beta_1$, $\text{G}\beta_2$, or $\text{G}\beta_3$, with GFP DNA but without coinjection of a $\text{G}\gamma$ DNA. In the absence of agonist, the Ca^{2+} currents in neurons injected with DNAs for $\text{G}\beta_1$ or $\text{G}\beta_2$ displayed kinetic slowing (Fig. 3, *left traces* of each pair) and facilitation (*right traces*) virtually identical to that produced by application of NE in

control cells. Coinjection with $\text{G}\gamma_3$ DNA did not change the results for $\text{G}\beta_1$ (data not shown) or $\text{G}\beta_2$ (Fig. 1). Only a small effect was observed in cells injected with $\text{G}\beta_3$ DNA, whether alone (Fig. 3*D*) or in combination with $\text{G}\gamma_3$ DNA (data not shown). Finally, in neurons injected with DNAs for $\text{G}\beta_3$, $\text{G}\beta_4$, or $\text{CB1}\lambda$ (a truncated, nonmembrane spanning form of the rat cannabinoid receptor in the pcDNA3 expression vector), the Ca^{2+} current activation was similar to that of uninjected neurons (data not shown).

The quantitative results of these DNA injections for the various $\text{G}\beta$ subunits are summarized in Figure 3, *E–G*. The $\text{G}\beta_1$ or $\text{G}\beta_2$ injections with and without $\text{G}\gamma_3$ give indistinguishable, strong, and highly significant effects when compared with cells injected with the control plasmid $\text{CB1}\lambda$ or to uninjected cells. In these $\text{G}\beta_1$ - or β_2 -injected neurons, the facilitation ratio is raised from a mean of 1.1 to 2.3, the inhibition by NE is lowered from 60 to 22%, and the basal calcium current density is lowered from 22 to 9 pA/pF. These actions are significant at the $p < 0.005$ level. Interestingly, both the depression of current and the increase in facilitation ratio are greater than those which occur with $10 \mu\text{M}$ NE on control cells. By comparison, the effects of injecting DNA for $\text{G}\beta_3$, $\text{G}\beta_4$, or $\text{G}\beta_3$ are weak or negligible, even in the presence of $\text{G}\gamma_3$. Of these, $\text{G}\beta_3$ appears the most active. Our results suggest that the different $\text{G}\beta$ subtypes have different efficacies in voltage-

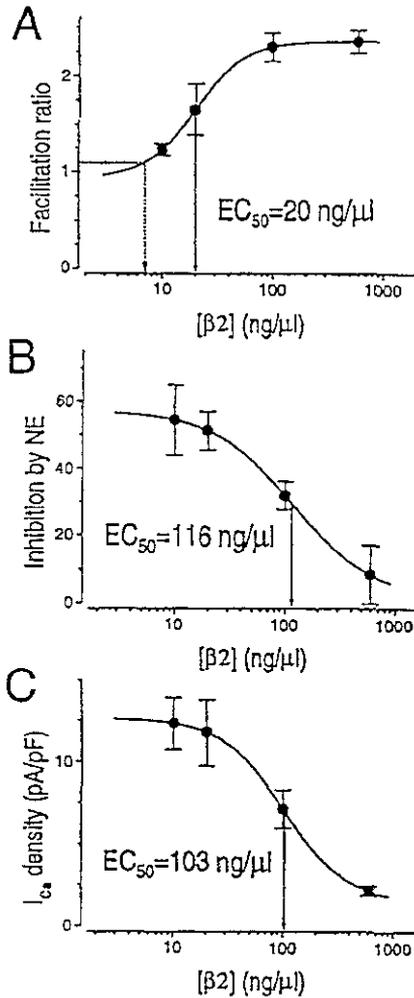


Figure 2. Concentration–response relationships for facilitation ratio, inhibition by NE, and I_{Ca} density. $G\beta_2$ DNA concentrations ($[\beta_2]$) are plotted on a logarithmic scale. Data were fitted to a Hill function, $y = [(A_1 - A_2)/(1 + ([\beta_2]/[\beta_2]_{50})^n)] + A_2$, with best fitting values of the midpoints, $[\beta_2]_{50} = 20.0, 156,$ and 103 ng/ μ l (vertical solid line); Hill coefficients, $n = 2.0, 1.2,$ and 1.51 ; low-concentration asymptotes, $A_1 = 0.94, 57,$ and 12.7 ; and high-concentration asymptotes, $A_2 = 2.4, 1.9,$ and 1.4 for *A*, *B*, and *C*, respectively. The horizontal dashed line in *A* indicates the facilitation ratio for control cells (1.1), and the vertical dashed line indicates a theoretical injected $G\beta_2$ DNA concentration (7.0 ng/ μ l) that would be equivalent to this basal facilitation ratio.

dependent inhibition of Ca^{2+} channels, with a rank order of effectiveness: $G\beta_1 = G\beta_2 > G\beta_3 \gg G\beta_4 = G\beta_5$.

Characterization of the weakly active $G\beta$ subtypes

We wanted to explore more fully the reasons for the weak effects of $G\beta_3, \beta_4,$ and β_5 DNA injections. Did the plasmids fail to induce proper synthesis of the corresponding proteins? Were the proteins really inactive on Ca^{2+} channels? Because convenient antibodies for verifying expression of specific $G\beta$ subunits in

single injected cells are lacking, we chose less direct approaches. We looked with increased sensitivity for electrophysiological effects on Ca^{2+} channels.

We made two changes in the electrophysiological assay. One was in the concentration of GFP DNA coinjected into the cells. In some systems, it has been found that the overexpression of GFP or other proteins from one plasmid leads to less expression from a second plasmid. Thus, the most brightly fluorescing cells express lower levels of protein from the second plasmid (N. Davidson, personal communication). Therefore, we lowered the concentration of GFP DNA in the injection solution from 100 to 10 ng/ μ l in the next experiments. A second factor that may have limited our sensitivity to detect occlusion of the NE response is the high concentration of NE we had used (10 μ M) in Figures 1, 2, and 3. This concentration is sufficiently above that needed to have a maximal NE action that a small shift of the sensitivity to NE could have been obscured. Therefore, we reduced the NE concentration to 2 μ M, which is submaximal.

Figure 4, *A–D*, illustrates Ca^{2+} currents recorded from an uninjected neuron and from neurons injected with $G\beta_3, G\beta_4,$ and $G\beta_5$ DNAs. In uninjected neurons, 2 μ M NE inhibited the Ca^{2+} current by $41 \pm 4\%$ (SEM; $n = 6$), compared with the 55% inhibition obtained with saturating NE (10 μ M) (Figs. 1–3). There were statistically significant changes in at least one of the experimental parameters for each injected neuron, suggesting expression of each $G\beta$ subunit. Facilitation was increased in the neurons injected with $G\beta_5$; the inhibition by 2 μ M NE was reduced by injection of $G\beta_4$ or $G\beta_5$, and the calcium current density was almost doubled by injection of $G\beta_3$. Further evidence that injection of $G\beta_3$ DNA affects cellular responses is seen in Figure 5, in which neurons were injected with $G\beta_1$ alone, $G\beta_3$ alone, or a mixture of $G\beta_1$ and $G\beta_3$ DNAs. As we have seen before, the facilitation ratio is strongly increased by $G\beta_1$ and not increased by $G\beta_3$; however, coinjection of $G\beta_3$ with the $G\beta_1$ gives significantly less facilitation than with $G\beta_1$ alone, consistent, for example, with competition between the $G\beta$ subunits for formation of active $G\beta\gamma$ complexes. These results show that $G\beta_3$ and $G\beta_4$ DNA injections do have specific electrophysiological effects, even if they do not mimic actions of NE on Ca^{2+} currents. Therefore, these $G\beta$ subunits are expressed at functionally significant levels in our injected neurons.

$G\beta_1$ and $G\beta_2$ interact strongly with the α_1 subunit of N-type calcium channels

It has been demonstrated that L_{1-11} of the α_1 subunits of classes A, B, and E (P/Q-, N-, and R-type) calcium channels interact directly with the $G\beta_1$ subunit (De Waard et al., 1997; Zamponi et al., 1997) and that this loop may mediate the inhibitory modulation by the activated G-protein (Herlitz et al., 1997; Page et al., 1997). Our results presented above suggest that this interaction is not the same for all of the $G\beta$ subunits. We sought to investigate the mechanism underlying the differential effects of the five different $G\beta$ subunit subtypes by testing the possibility that they interact with the channel with different affinities. We examined the interaction of L_{1-11} of α_{1B} with the $G\beta$ subunits using the two-hybrid assay, an assay that can detect protein–protein interactions *in vivo* in yeast (Fields and Song, 1989).

Plasmids encoding the GBD- L_{1-11} hybrid and the various GAD- $G\beta$ hybrids were introduced into a yeast reporter strain in which interactions between two hybrid proteins result in transcriptional activation of two reporter genes, *HIS3* and *ADE2*. These two reporter gene products are involved in histidine and

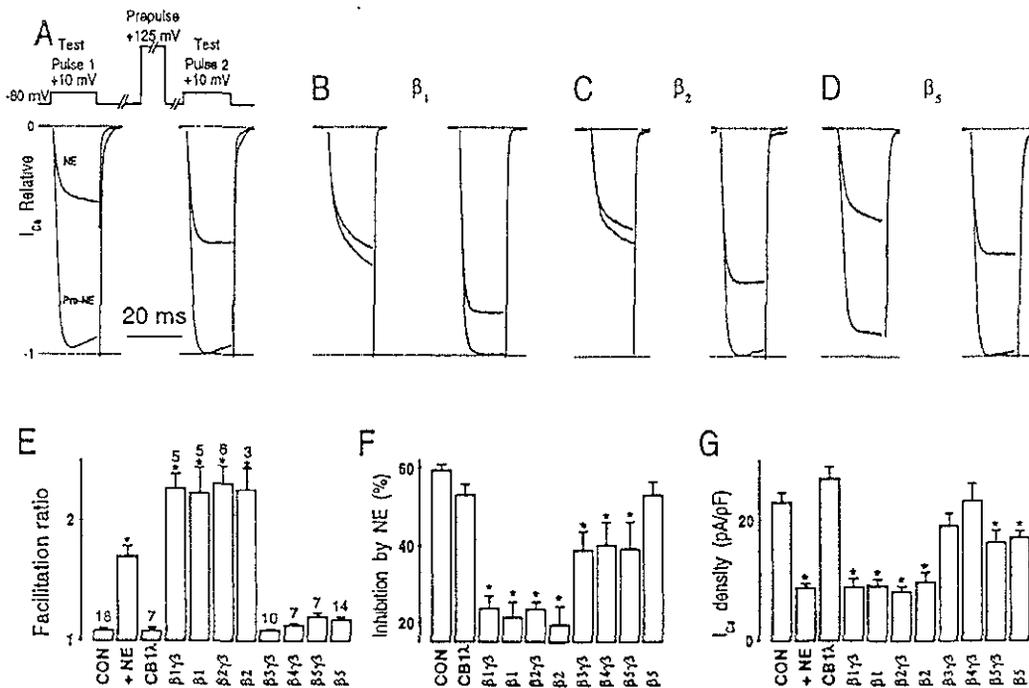


Figure 3. Identification of the G β subtypes that cause voltage-dependent modulation of Ca currents. Cells were injected with DNA for G-protein β and γ subunits, as indicated, and currents were recorded by the double-pulse protocol. *A–D*, Current records for uninjected control cell (*A*) and neurons injected with 100 ng/ μ l G β_1 , G β_2 , or G β_3 DNA (*B–D*). *E*, Summary data for facilitation ratios; numbers above individual columns represent the number of tested cells, and the same numbers apply to *F* and *G*. Data plotted as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; two-tailed *t* test versus control. *F*, Percent of I_{Ca} inhibited by NE (during test pulse 1). *G*, I_{Ca} density during test pulse 1 in the absence of NE.

adenine synthesis, respectively, and their activation allows the yeast cells to grow on medium lacking histidine and adenine. As shown in Figure 6*A*, coexpression of L_{1-11} with G β_1 or G β_2 results in robust growth of the yeast cells on the selection medium, whereas with G β_3 , the cells grow at a much slower rate. In the case of G β_3 and G β_4 , no transformed yeast cells were able to grow in the absence of histidine and adenine. The same results were obtained in five experiments. Because transcription signals resulting from the protein–protein interactions in the two-hybrid assay generally correlate with the binding affinity observed from *in vitro* experiments (Li and Fields, 1993; Yan et al., 1996), our data suggest that the order of affinity for L_{1-11} of α_{1B} is G β_1 = G β_2 > G β_3 >> G β_4 .

To exclude the possibility that the tighter binding between G β_1 , G β_2 , and L_{1-11} is attributable to their more efficient recruitment of endogenous yeast G γ subunits, we also performed the assay in the presence of overexpressed rat G γ_3 subunit. The results obtained were the same (data not shown), suggesting that G γ subunits are not a determinant of the interaction between G β and L_{1-11} in our assay. Hence, activation of the *HIS3* and *ADE2* genes in the assay might be the result of direct interactions between G β_1 , G β_2 , and G β_3 with the calcium channel L_{1-11} loop region.

Because an apparent differential affinity of G β subtypes for L_{1-11} of α_{1B} observed in the two-hybrid experiments could also be attributable to differences of their protein level in the yeast cell, we examined their expression by immunoblotting. This method

measures the level of expressed protein but does not test correct folding or association with G γ subunits. Immunoblots of the yeast cell lysates with anti-GAD antibody showed these GAD-hybrid proteins are expressed at similar levels (Fig. 6*B*, lanes 1–5). Densitometric scanning and normalization to the amount of total cellular protein in each extract showed that expression of G β_3 , G β_4 , and G β_5 was higher than expression of G β_1 and G β_2 . A second experiment gave the same result. These results support our conclusion that, in the yeast two-hybrid assay, G β_1 and G β_2 are more effective because they bind with higher affinity to L_{1-11} .

DISCUSSION

Our electrophysiological and protein–protein interaction experiments give concordant results for the β subunits of G-proteins. All G β subunits are not equal. Mimicry and occlusion of membrane-delimited voltage-dependent inhibition of N-type Ca^{2+} currents and interaction with the L_{1-11} loop of α_{1B} (N-type) calcium channels follow the sequence G β_1 = G β_2 > G β_3 >> G β_4 , G β_5 . The agreement of the two approaches adds weight to the proposal that the functional target of voltage-dependent G β interaction includes the L_{1-11} loop (De Waard et al., 1997; Herlitze et al., 1997; Page et al., 1997; Zamponi et al., 1997). The activity of overexpressed G β_1 and G β_2 has been documented before in SCG cells (Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996; Delmas et al., 1998). Unlike our results (Fig. 1), however, Ikeda (1996) and Delmas et al. (1998), who studied only G β_1 , found that a G γ subunit had to be coexpressed with G β_1 to have an effect on calcium channels.

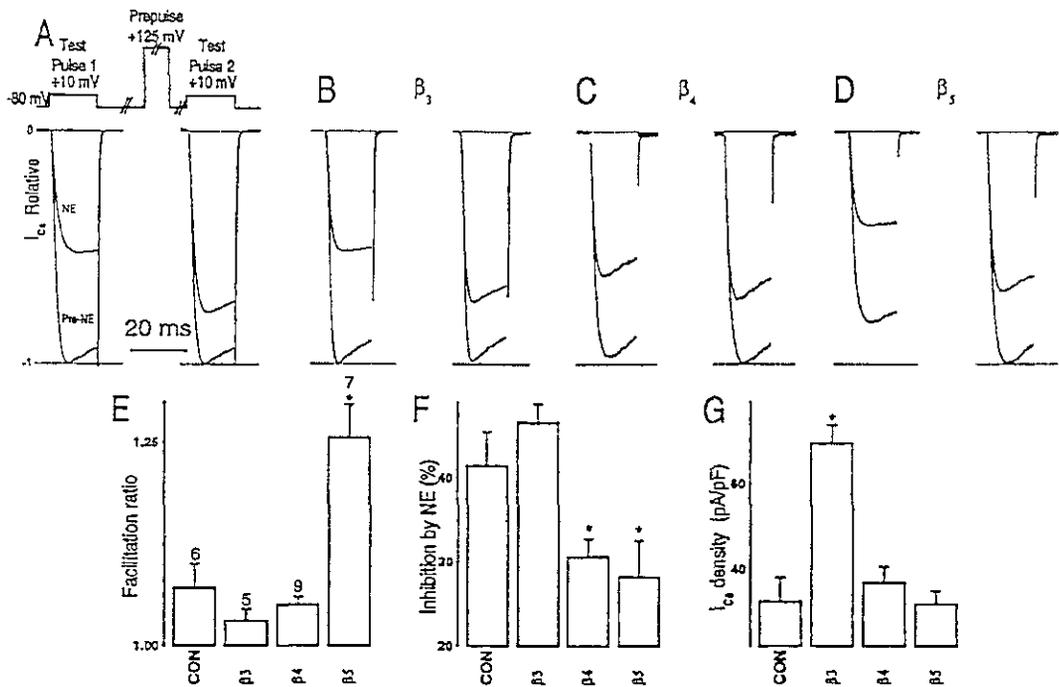


Figure 4. Three weakly active $G\beta$ subtypes. *A–D*, Current records for uninjected control cell (*A*) and neurons injected with 100 ng/ μ l $G\beta_3$, $G\beta_4$, or $G\beta_5$ DNA (*B–D*). To accentuate possible weak actions by $G\beta_3$, $G\beta_4$, and $G\beta_5$, the concentration of the reporter plasmid (pEGFP-N1) was decreased tenfold to 10 ng/ μ l, and NE was decreased to 2 μ M. *E–G*, Summary data for facilitation ratio, inhibition by NE, and current density in these cells. Note that the axes have been expanded to reveal smaller differences.

We do not know any reason for this clear difference from our work. They tested only $G\gamma_2$, and we tested only $G\gamma_3$. If $G\beta\gamma$ dimers are needed for mimicking action of NE, the $G\beta$ subunits must have combined with endogenous $G\gamma$ subunits when we did not inject $G\gamma$ DNA. The endogenous complement of $G\gamma$ subunits is not known for SCG neurons.

Although the vectors for $G\beta_3$ and $G\beta_4$ did not mimic voltage-dependent Ca^{2+} current inhibition by NE, they did alter electrophysiological properties of the cells. Thus, they were expressed. Unexpectedly, expression of $G\beta_3$ led to a near doubling of the Ca^{2+} current density (Fig. 4). Because the percent of inhibition by NE was unchanged in these cells, the increased current density was primarily caused by an increase in N-type Ca^{2+} current. On the other hand, expression of $G\beta_4$ led to a reduction in modulation by NE, without an increase in facilitation or a decrease in current density. These effects of $G\beta_3$ and $G\beta_4$ might have been caused by interactions with signaling systems in the cell that alter gene expression or act in other ways on the channel. They could also represent direct interactions of $G\beta_3$ and $G\beta_4$ with parts of the channel that do not have the binding specificity we found for the L_{1-11} loop. It is not likely that $G\beta_3$ or $G\beta_4$ failed to pair with coinjected $G\gamma_3$ subunit, because it has been found previously that this subunit pairs efficiently with the $G\beta_3$ and $G\beta_4$ subunits (Yan et al., 1996). Indeed, in comparison with $G\beta_2\gamma_3$, the reporter activity in a yeast-two-hybrid assay was 55% for $G\beta_3\gamma_3$, 72% for $G\beta_4\gamma_3$, and 83% for $G\beta_5\gamma_3$ (Yan et al., 1996).

The literature does not contain much information on specificity of the actions of $G\beta$ subunits. From our results, the strong

membrane-delimited voltage-dependent modulation of N-type calcium channels seen in many neurons is almost certainly mediated by $G\beta_3$ and/or $G\beta_2$ subunits. A similar conclusion may be drawn for the activation of G-protein-coupled inward rectifier K^+ (GIRK) channels. A two-hybrid screen with residues 1–83 of the GIRK1 channel showed interaction with $G\beta_1$ and $G\beta_2$ but not with $G\beta_3$, $G\beta_4$, or $G\beta_5$ (Yan and Gautam, 1996), suggesting that $G\beta_1$ and $G\beta_2$ may be generally involved in membrane-delimited modulation of ion channels. Functional tests of $G\beta_3$, $G\beta_4$, or $G\beta_5$ on GIRK channels have not been published.

Specificity has been investigated in a few other systems. Kleuss et al. (1991, 1992, 1993) used injection of antisense oligonucleotides directed against specific members of the G-protein heterotrimer to study agonist-induced inhibition of L-type calcium channels in GH_3 cells. They established that $G\alpha_{o1}/\beta_1/\gamma_4$ mediates inhibition acting via m_4 muscarinic receptors, whereas $G\alpha_{o2}/\beta_3/\gamma_3$ mediates inhibition by somatostatin receptors. The molecular mechanisms of these signaling pathways have not been worked out, and it is possible that the very high specificity lies at the level of the receptors rather than the (unknown) effector(s). This contrasts with work on adenylyl cyclase II in the two-hybrid system in which all β subunits interact to some degree, and the rank order of interaction was $\beta_1 > \beta_2 > \beta_3 = \beta_4 > \beta_5$ (Yan and Gautam, 1996). Interestingly, β_1 stimulates, whereas β_2 inhibits adenylyl cyclase II (Bayewitch, 1998). Both interactions were strong in the two-hybrid system.

Other systems in which G-protein subtype specificity has been examined include inhibition of adenylyl cyclase I (no difference

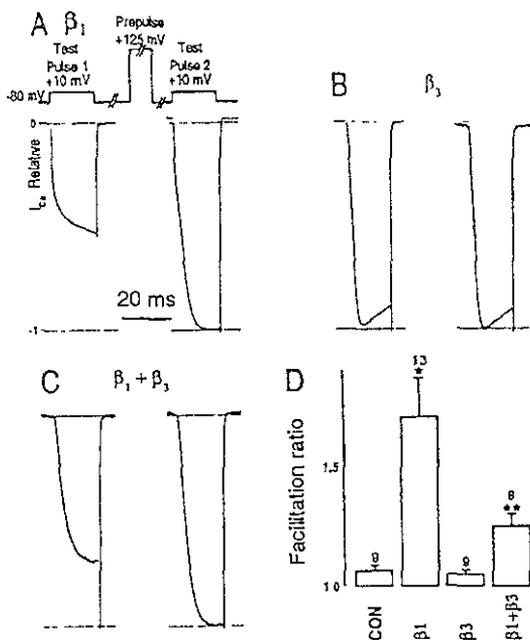


Figure 5. Coinjection of $G\beta_1$ and $G\beta_3$ DNAs. *A–C*, Current traces for cells were injected with 100 ng/ μ l $G\beta_1$ (*A*) or $G\beta_3$ (*B*) or with 100 ng/ μ l $G\beta_1$ plus 100 ng/ μ l $G\beta_3$ DNAs (*C*). Same experimental conditions as in Figure 3. *D*, Mean facilitation ratios for these cells. * indicates data significantly different from control. ** indicates data for $G\beta_1$ plus $G\beta_3$ significantly different from control, $G\beta_1$, or $G\beta_3$.

between β_1 and β_3 ; Bayewitch, 1998), activation of MAP kinase (β_1 more efficient than β_3 ; Zhang et al., 1996b), activation of phospholipase β_2 (no difference between β_1 and β_3 ; Zhang et al., 1996b), and binding to G-protein receptor kinases (GRKs) (β_1 and β_2 , but not β_3 , bind to GRK2, and β_1 , β_2 , and β_3 all bind to GRK3; Daaka, 1997). Thus, in the case of classical G-protein effectors (adenylyl cyclase, phospholipase, and ion conducting channels) specificity of interactions with G-protein β subunit types has previously been noted only in β_3 compared with β_1 . However, this is not entirely surprising considering that β_3 is a unique β subunit type that is only 53% identical to the rest and is primarily expressed in brain (Watson et al., 1994). The differential activity of β_1 and β_2 subunits compared with the β_3 and β_4 subunits seen here on Ca^{2+} channels is of interest, because these β subunit types are very similar. In fact, β_1 and β_2 are more similar to β_4 (~90% identity) than β_3 to β_4 (~80% identity) (Yan et al., 1996). The functional differences must, however, be caused by structural difference(s) between the two pairs of proteins. A scan of the sequences to identify residues common to $G\beta_1$ and $G\beta_2$, but different in β_3 and β_4 , yields seven residues: R19, S31, N35, P39, A193, R197, and A305, using $G\beta_1$ numbering. Most of these residues are near regions thought to interact with the $G\gamma$ subunit. The molecular basis for the functional difference between β_1/β_2 versus β_3/β_4 may not be restricted to these residues, because β_3 and β_4 diverge individually with respect to the each other, as well as β_1 and β_2 subtypes at many positions in their amino acid sequences. This divergence is also consistent with the differential effects of β_1 compared with β_4 on Ca^{2+} channel properties (Fig.

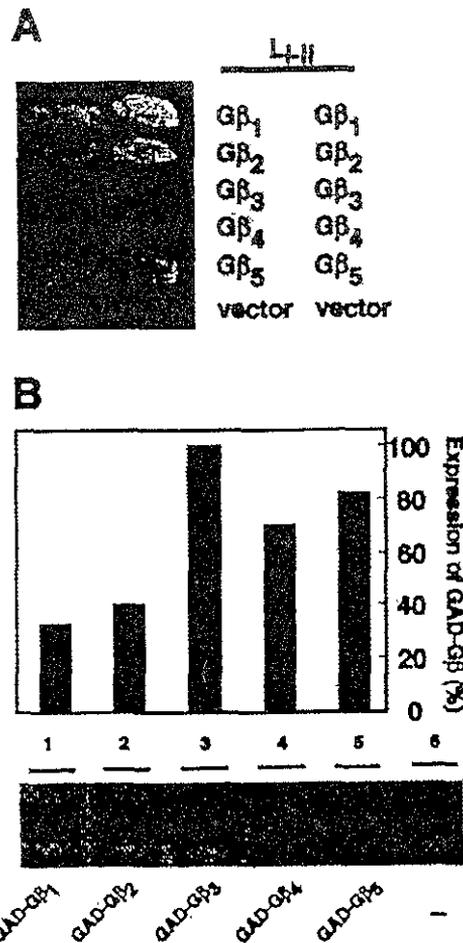


Figure 6. $G\beta_1$ and $G\beta_2$ interact strongly with the α_1 subunit of N-type calcium channels. *A*, Yeast reporter strain PJ69-4A was cotransformed with plasmids encoding GBD-L_{1,II} and the indicated GAD-G β subunits. Cells were first plated onto synthetic sucrose medium SS/-Trp/-Leu to select cotransformants. The cotransformants were then replica-plated onto medium SS/-Trp/-Leu/-Ade/-His to select for colonies having successful GBD-GAD interactions. *B*, Expression of GAD-G β hybrid proteins in yeast. Yeast lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. The blot was probed with anti-GAD monoclonal antibody and horseradish peroxidase-conjugated to anti-mouse IgG. The proteins were detected by ECL. Yeast lysate without GAD hybrid proteins was loaded in lane 6 as a negative control. Total protein amounts in the 20 μ l lysates quantified by the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA) were 1.94, 1.30, 0.72, 0.80, and 1.70 μ g in lanes 1–5, respectively. Intensity of individual GAD-G β bands on the immunoblot was determined by densitometry (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA), normalized to the protein amount in their respective lysates, and plotted as a percent of GAD-G β_3 to show the relative levels of these hybrid proteins.

4). A recent major study by Ford et al. (1998) has looked for residues in $G\beta_1$ that affect interaction with five different effectors, including N-type calcium channels containing α_{1D} subunits. They mutated 15 residues within the interaction domain for $G\beta$ subunits with $G\alpha$ subunits and found eight that affected the calcium

channel facilitation. However, because all of the 15 residues tested are identical among $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$, and $G\beta_4$, these results do not help to explain why two of the subunits are so efficacious and two of them are ineffective on N-type calcium channels.

As mentioned before, the $G\beta_5$ subunit stands out among $G\beta$ subunits. Unlike the others, it is reported to couple almost exclusively to the $G\alpha_q$ subunit in a manner that can prevent the others from binding (Fletcher et al., 1998). In our experiments, injection of the vector encoding $G\beta_5$ produced a small but reliable voltage-dependent inhibition of the Ca^{2+} current and partial occlusion of NE-induced inhibition (Fig. 4). Using a $G\beta_5$ antibody (provided by M. Simon, Caltech) (Watson et al., 1994), we found that SCG neurons express $G\beta_5$ (data not shown), as anticipated from its enrichment in brain, and therefore stimulation of $G\alpha_q$ via m_1 muscarinic or angiotensin II receptors in SCG cells should release $G\beta_5$ subunits. Together, these three results suggest that the small but fast component of calcium channel inhibition seen with receptors linked to $G\alpha_q$ in SCG neurons (such as m_1 muscarinic receptors) (Zhou et al., 1997) could be attributable to $G\beta_5$.

The putative sites of interaction of the G-protein β subunit with the calcium channel have been controversial (e.g., Dolphin, 1998). Typically, experiments examining this interaction have relied on overexpression of appropriately engineered calcium channels in cell lines or *Xenopus* oocytes or on the demonstration of protein-protein interactions with recombinant proteins *in vitro*. We have taken a complementary approach with the two-hybrid system, and our results strongly support the hypothesis that the interaction of $G\beta$ subunits with the linker between homologous domains I and II of the α_1 subunit determines the subunit specificity for voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. Although it is likely that G-protein β subunits interact with other regions of the calcium channel, further experimentation will be necessary to determine whether these additional interactions contribute to the voltage-dependent inhibition.

REFERENCES

- Bayewitch ML, Avidor-Reiss T, Levy R, Pfeuffer T, Nevo I, Simonds WF, Vogel Z (1998) Differential modulation of adenylyl cyclases I and II by various G β subunits. *J Biol Chem* 273:2273-2276.
- Beech DJ, Bernheim L, Mathie A, Hille B (1991) Intracellular Ca^{2+} buffers disrupt muscarinic suppression of Ca^{2+} -current and M-current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:652-656.
- Bernheim L, Beech DJ, Hille B (1991) A diffusible second messenger mediates one of the pathways coupling receptors to calcium channels in rat sympathetic neurons. *Neuron* 6:859-867.
- Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD, Lefkowitz RJ (1997) Receptor and $G\beta\gamma$ isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2180-2185.
- Delmas P, Brown DA, Dayrell M, Abogadie FC, Caulfield MP, Buckley NJ (1998) On the role of endogenous G-protein $\beta\gamma$ subunits in N-type Ca^{2+} current inhibition by neurotransmitters in rat sympathetic neurons. *J Physiol (Lond)* 506:319-329.
- De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VES, Gurnett CA, Campbell KP (1997) Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385:446-450.
- Dolphin AC (1998) Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J Physiol (Lond)* 506:3-11.
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-247.
- Fletcher JE, Lindorfer MA, DeFilippo JM, Yasuda H, Guilford M, Garrison JC (1998) The G protein β_5 subunit interacts selectively with the Gq α subunit. *J Biol Chem* 273:636-644.
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein beta gamma subunits with effectors. *Science* 280:1271-1274.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100.
- Herlitze S, García DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996) Modulation of Ca^{2+} channels by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 380:258-262.
- Herlitze S, Hockerman GH, Scheuer T, Catterall WA (1997) Molecular determinants of inactivation of G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel α_{1A} subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1512-1516.
- Hille B (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17:531-536.
- Ikeda SR (1991) Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurons. *J Physiol (Lond)* 409:181-214.
- James P, Halladay J, Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.
- Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, Rosenthal W, Schultz G, Wittig B (1991) Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* 353:43-48.
- Kleuss C, Scherubi H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B (1992) Different β -subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature* 358:424-426.
- Kleuss C, Scherubi H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B (1993) Selectivity in signal transduction determined by γ subunits of heterotrimeric G proteins. *Science* 259:832-834.
- Li B, Fields S (1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J* 7:957-963.
- Mintz IM, Adams ME, Bean BP (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9:85-95.
- Page KM, Stephens GJ, Berrow NS, Dolphin AC (1997) The intracellular loop between domains I and II of the B-type calcium channel confers aspects of G-protein sensitivity to the E-type calcium channel. *J Neurosci* 17:1330-1338.
- Qin N, Platano D, Olcese R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Direct interaction of $G\beta\gamma$ with a C-terminal $G\beta\gamma$ -binding domain of the Ca^{2+} channel α_1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8866-8871.
- Watson AJ, Katz A, Simon MI (1994) A fifth member of the mammalian G-protein beta-subunit family. Expression in brain and activation of the beta 2 isotype of phospholipase C. *J Biol Chem* 269:22150-22156.
- Yan K, Gautam N (1996) A domain on the G protein subunit interacts with both adenylyl cyclase 2 and the muscarinic atrial potassium channel. *J Biol Chem* 271:17597-17600.
- Yan K, Kalyanaraman V, Gautam N (1996) Differential ability to form the G protein $\beta\gamma$ complex among members of the β and γ subunit families. *J Biol Chem* 271:7141-7146.
- Zamponi GW, Bourinett E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997) Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α_1 subunit. *Nature* 385:442-446.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW (1996a) Multiple structural elements in voltage-dependent Ca^{2+} channels support their inhibition by G proteins. *Neuron* 17:991-1003.
- Zhang S, Cossó OA, Lee C, Gutkind JS, Simonds WF (1996b) Selective activation of effector pathways by brain-specific G protein β_5 . *J Biol Chem* 271:33575-33579.
- Zhou J, Shapiro MS, Hille B (1997) Speed of Ca^{2+} channel modulation by neurotransmitters in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 77:2040-2048.



Original Article

Modulation of N-type Ca^{2+} channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons

Rafael E. García-Ferreiro¹, Erick O. Hernández-Ochoa¹ and David E. García¹

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, Apdo. Post. 70250, C. P. 04510, Mexico, D.F., Mexico

E-mail: erasmio@servidor.unam.mx
 Phone: +52-5-5-232391
 Fax: +52-5-5-232241

Received: 30 November 2000 / Accepted: 11 May 2001

/ Published online: 6 July 2001

Abstract. The protein kinase C activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) has been used extensively in studies of G protein modulation of Ca^{2+} channels. PMA has been shown to be a powerful tool for inducing phosphorylation and interrupting G-protein-mediated signaling pathways. Here we re-examine the effects of PMA on whole-cell N-type Ca^{2+} -channel currents in rat sympathetic neurons. We found that, along with an increase in the current amplitude previously reported by others, PMA pretreatment leads to alterations in current activation and inactivation kinetics. These alterations in current kinetics are voltage-dependent and are not reproduced by internal dialysis with the G protein inhibitor GDP β S. Alterations in current kinetics by PMA may therefore indicate the existence of a modulated state, presumably phosphorylated, of N-type Ca^{2+} channels. We propose that the increase in current amplitude is due primarily to alterations in current kinetics rather than to removal of tonic inhibition.

Keywords. Ca channel modulation · GDP β S · G protein · N-type Ca channel · Protein kinase C (PKC) · Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) · Rat sympathetic neurons · Superior cervical ganglion (SCG)

Introduction

N-type Ca^{2+} channels have long been proposed to play a critical role in Ca^{2+} entry into presynaptic nerve terminals [1,3]. Ca^{2+} currents conducted by N-type channels have been consistently shown to increase as

a result of stimulation of protein kinase C (PKC) by phorbol esters in sympathetic neurons [28, 30, 31]. Furthermore, PKC activation can disrupt Ca^{2+} channel inhibition by G-protein-coupled receptors [26, 28, 31], and by direct activation of G proteins by GTP γ S [2, 28, 31]. G-protein-mediated signaling is present in sympathetic neurons even in the absence of any exogenously applied neurotransmitters, producing a tonic inhibition of Ca^{2+} channels [15, 28, 30, 31]. For these reasons, it has been suggested that the PKC-induced enhancement of basal Ca^{2+} channel current may result from removal of this tonic inhibition [28, 31]. A recent report has extended this interpretation to propose that tonic inhibition removal is the sole effect induced by PKC activation on N-type Ca^{2+} channels [3] if this were true, the effects induced by phorbol esters should be indistinguishable from those induced by a G protein inhibitor. Our intent was to clarify this situation through a detailed analysis of the effects induced by the two treatments on whole-cell N-type Ca^{2+} channel currents recorded in primary cultures of superior cervical ganglion (SCG) neurons. Our experiments therefore compared the effects induced by the PKC activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) with those induced by the non-hydrolysable GDP analogue GDP β S. Our results show that the treatments do not produce identical effects. Though the effects of GDP β S are comparable to those induced by a conditioning prepulse in control neurons, PMA pretreatment induces voltage-dependent changes in current kinetics and in voltage-dependent inactivation, which cannot be explained by the removal of tonic inhibition. A preliminary account of some of these results has been presented [9].

Materials and methods

Cell culture

SCG neurons were enzymatically dissociated from 5-week-old male Wistar rats. After dissection, ganglia were desheathed, cut into eight to ten small, nearly identical pieces, and transferred to a modified Hank's solution containing 20 U/ml papain. After 20 min at 37°C, papain solution was replaced with a solution containing 1 mg/ml collagenase type 1 and 10 mg/ml dispase. Ganglia were incubated for 40 min in this solution and mechanically triturated every 20 min. The preparation was then centrifuged and resuspended twice in Leibovitz's L-15 medium and once in Dulbecco's modified Eagle's medium, both

supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. Neurons were then plated on polystyrene culture dishes coated with poly-L-lysine and stored in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air at 37°C. Neurons were studied between 8 and 18 h after plating. All recordings were obtained at room temperature (19–22°C).

Solutions

Neurons were constantly perfused during recording (1–2 ml/min) with a solution designed to isolate Ba²⁺ currents flowing through N-type Ca²⁺ channels. The N-type Ca²⁺ channel current was defined as the component of the current sensitive to 100 μM Cd²⁺ in the presence of 5 μM nifedipine [8]. Bath solutions contained (in mM): 162.5 TEA-Cl, 2 BaCl₂, 10 HEPES, 8 glucose, 1 MgCl₂, 0.0001 TTX and 0.005 nifedipine, and were adjusted to pH 7.4 with TEA-OH. For most recordings, internal solutions contained (in mM): 140 CsCl, 10 HEPES, 11 EGTA, 1 CaCl₂, 5 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 0.3 Na₂GTP and 0.1 leupeptin, and were adjusted to pH 7.4 with CsOH. Where noted, 0.3 mM Na₂GTP was replaced with 2 mM Li₂GDPβS or with 0.3 mM Li₂GTPγS. In an attempt to minimize run-down in the experiments reported in Fig. 3, the ATP and Mg²⁺ concentrations in the internal solution were raised each to 10 mM, and the Ba²⁺ concentration in the bath solution was raised to 5 mM. All recordings were started no less than 5 min after membrane rupture and access to whole-cell patch-clamp recording. Nifedipine-containing external solution was prepared daily from 25 mM absolute ethanol stock solution, and protected from light whenever possible. For toxin application, ω-conotoxin GVIA (ω-CgTx GVIA) was stored as a 1 mM stock solution in distilled water, and diluted to 10 μM in the external recording solution immediately prior to use. It was applied by pressure injection from a large bore pipette (tip diameter approximately 3–5 μm) located 20–50 μm from the neuron under study.

Preincubation with PMA

Solutions containing PMA were made daily from stock solution containing 1.5 mM PMA in DMSO and dissolved in Ringer's solution to a final concentration of 500 nM PMA and 0.03% (v/v) DMSO. Neurons were incubated in the PMA-containing solution during 7 min at 37°C just prior to recording. This pretreatment procedure allowed us to exclude PMA and DMSO from the recording solution, thus minimizing the possibility of

direct or non-specific effects [14]. Additional controls for PMA-specific actions were conducted by replacing PMA with 4-α-phorbol, or by incubating the neurons for 10 min with the protein kinase inhibitor staurosporine (500 nM, dissolved in DMSO) and then for 7 min with both 500 nM staurosporine and 500 nM PMA. All PMA-related effects reported here were observed in the vast majority of cells tested (>80%, n=40), and even after relatively long periods (up to 1 h) after incubation. The preincubation with PMA ensured consistent results, judged by the fact that N-type Ca²⁺-channel currents in PMA-pretreated neurons behaved with consistent and clearly distinct current kinetics (see below).

PMA and 4-α-phorbol were obtained from Calbiochem (La Jolla, Calif., USA), ω-CgTx GVIA from Alomone Labs (Jerusalem, Israel) and all other chemicals from Sigma (St. Louis, Mo., USA).

Current measurements and analysis

Membrane currents were measured in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique [17] using a List EPC-7 patch-clamp amplifier and Sylgard 184 (Dow Corning) coated pipettes of borosilicate glass with resistance of 0.8–1.5 MΩ when filled with the standard intracellular solution. Current recordings were filtered at 3 to 10 kHz (3-pole Bessel filter) and digitized using a 12-bit A/D Tecmar Lab Master board (maximum digitization rate 125 kHz). Steady-state currents were sampled at 10 kHz and tail currents at 50 kHz using a "split-clock" protocol. Lower sampling frequencies were used during 500-ms prepulses (10 kHz for the first and last 10 ms, and 1 kHz otherwise). Capacity transients were compensated using the EPC-7 cancellation circuitry, and series resistance (1.8±0.45 MΩ, mean±SD) was compensated to >70%. Voltage protocols were generated and data were digitized and recorded using BASIC FASTLAB (Indec Systems, Capitola, Calif., USA).

Care was taken to select spherical cells of small diameter with no evident processes. Cell capacitance was 54.4±17.6 pF (mean ±SD). Current-voltage relationships and current traces were not corrected for linear leakage current. Periods of 200–300 μs at the onset and of 100–200 μs at the end of the command step were removed from all current records to eliminate spurious points due to incomplete capacitive compensation. Continuous lines in current traces in the figures correspond to the zero-current level. Because the magnitude of the Ca²⁺ channel current was dependent on cell size, current data are presented as a current density normalized to cell capacitance. Where appropriate, data are expressed as mean ±SEM.

Statistical significance was determined using the unpaired Student's *t*-test. Results were considered significant if $P < 0.05$.

Results

Effects of PMA and GDP β S on voltage dependence and the time course of activation of N-type Ca²⁺-channel currents

As expected from tonic inhibition relief [15], internal dialysation with GDP β S enhances whole-cell Ba²⁺ currents. The effects of GDP β S are comparable to those induced by a conditioning prepulse in control conditions (for review see [17]). Both procedures result in an enhancement of the current that is more pronounced for negative test potentials (Fig. 1A, B) than for positive potentials (Fig. 1C, D) around the *I-V* maximum (Fig. 1E). Current enhancement at negative test potentials is not accompanied by any significant change in activation kinetics (Fig. 1F).

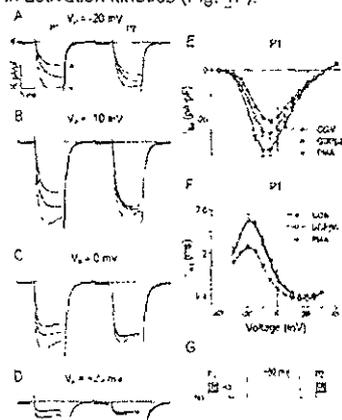


Fig. 1A-G Effects of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and the G-protein inhibitor GDP β S on the current-voltage relationship and current activation kinetics of whole-cell Ca²⁺ channel currents. A-D: Same currents (*I*_{Ca}) evoked by stepwise depolarizations to the voltages indicated in each graph (*V*_h) using the voltage-clamp protocol in G. Superimposed *I*_{Ca} traces represent the average *I*_{Ca} from control ($n=16$), GDP β S-dialysed ($n=11$), and PMA-pretreated neurons ($n=17$). Same calibration bars for A-D. Voltage-clamp protocol (G) consisted of two identical 10-ms test pulses (P1, P2) with stepwise increasing depolarizations followed by a 10 ms partial repolarization. P1 and P2 were separated by 1 s, and P2 was preceded (15 ms) by a 50 ms conditioning prepulse. E: Average current-voltage relationship for same neurons in A-D during P1. *I*_{Ca} density determined as the mean current value of recorded points between 3 and 4 ms after the onset of the test pulse. F: Time constant (τ_{act}) of a single exponential fitted to the activation phase of the current initiated after the transient positive-going current had decayed back to baseline (200-300 μ s after the onset of the test pulse).

Similarly to effects of prepulses or GDP β S, brief preincubations with PMA result in a voltage-dependent increase in current density. Current amplitude during weak depolarizations (Fig. 1A, B) increases more than current during larger depolarizations (Fig. 1C, D). However, two differences stand out. First, PMA recruits more current than do prepulses or GDP β S (Fig. 1E). Second, unlike the case with prepulses or GDP β S, PMA-induced enhancement is accompanied by marked changes in current kinetics. Specifically, following PMA pretreatment, current activates more rapidly at negative test pulses and shows an enhanced step-current inactivation (Fig. 1A-D). These observations are related as can be seen in Fig. 1E. The *I-V* relationship in this figure includes current amplitudes recorded near the onset of the test pulses (average of recorded points between 3-4 ms after the onset of the test pulse), and therefore reflects early differences in current amplitude. Figs. 1A-D show that the differences in current amplitude are time dependent and much less pronounced if the amplitude measurement is made near the end of the 10-ms depolarization. The marked changes induced by PMA are therefore related to alterations in current kinetics.

The time course of the rising phase of the current recordings could be described by an exponential with a single time constant (τ_{act}). The τ_{act} versus voltage relationship is bell-shaped [15], reaching a maximum near -20 mV and decreasing at both more negative and more positive potentials. Similarly to Ikeda [15], we found that prepulses significantly reduce τ_{act} at potentials more positive than those eliciting maximal inward current and do not have any effect at more negative potentials (data not shown). A similar effect is seen upon treatment by GDP β S (barely visible in Fig. 1F). In contrast, τ_{act} is significantly reduced ($P < 0.05$) in a -30 to +5 mV voltage range by PMA (Fig. 1F), with a $\approx 26\%$ reduction in maximal value for τ_{act} (at -20 mV). Also note that step-current inactivation is increased during the 10-ms depolarizations in Figs. 1A-D. This effect is even more evident during longer depolarizing steps (500 ms; Fig. 5). Significant changes in current kinetics are therefore seen after PMA but not following GDP β S.

In contrast to the control, prepulses failed to facilitate step currents in either PMA-pretreated or GDP β S-dialysed neurons. This observation suggests that tonic inhibition removal might be a feature common to both treatments [28]. The effect of voltage-dependent, G-protein-mediated inhibition on steady-state activation curves has been extensively documented [3, 15]. We therefore searched for evidence of removal of tonic inhibition by analysing tail currents recorded at a potential of -40 mV following the termination of 10-ms

test pulses to various potentials (Fig 1G) The relationship between averaged tail current amplitudes and the test pulse potentials for the neurons of Fig. 1 are illustrated in Fig. 2A-C. Consistent with Ikeda [15], tonic inhibition in the control results in asymmetrical activation curves around the point of half-maximal activation (Fig. 2A, closed circles). Therefore, activation curves are represented as the sum of two Boltzmann functions (smooth curves show fits):

$$I(V) = I_1 [1 - \exp(-(V - V_{1/2,1})/k_1)] + I_2 [1 - \exp(-(V - V_{1/2,2})/k_2)] - 1$$

where $I(V)$ is tail current density as a function of test pulse potential V . For each component, I , $V_{1/2}$ and k are the amplitude, half-activation voltage and slope factor, respectively (see Table 1). In the model proposed by Bean [3], the lower (first) and higher (second) voltage Boltzmann components correspond to pools of unmodulated and G-protein-inhibited channels, respectively. Correspondingly, tonic inhibition relief by prepulses (Fig 2A; open circles) or GDPβS (Fig. 2B) results in more symmetrical activation curves [15], consistent with the activation of a more homogeneous population of mostly unmodulated channels. In fact, following prepulses, the tail current activation curve with GDPβS was nearly symmetrical and was therefore fit to a single Boltzmann function (Fig. 2B; open squares). The mean values derived from double Boltzmann fits to average tail current activation curves are summarized in Table 1. In control conditions, the fractional amplitude of the first component is ≈76% suggesting that ≈24% of maximal Ca²⁺ channel current is under tonic inhibition. Prepulses affect the relative amplitudes of both Boltzmann components, but not slope and midpoint parameters, after prepulse, the fractional amplitude of the first component is increased to >92%. In the presence of GDPβS, tonic inhibition is reduced to less than 15%, and prepulses almost eliminate the second component. From data in Table 1 we calculated the Boltzmann component for each voltage. The plot of lower and higher Boltzmann components (Fig. 2D) shows that the increase in first component amplitude caused by GDPβS is associated with a decrease in the second component. A similar scenario can explain the effects of prepulses (data not shown). The enhanced current amplitude at a mid-level depolarizing test pulse after GDPβS (Figs 1E, 2B) or prepulses (Fig. 2A) can therefore be accounted for by changes in the fractional current amplitude of the two voltage-Boltzmann components [15].

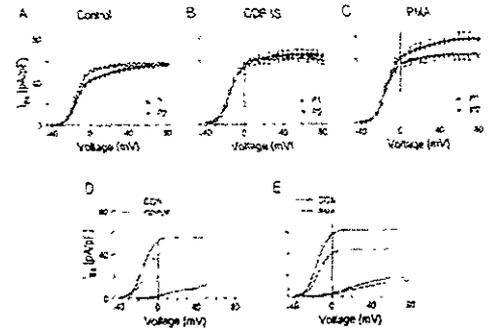


Fig. 2A-E Effects of PMA and GDPβS on tail current-voltage relationship of Ca²⁺ channel currents. A-C Average tail current-voltage relationship for the same neurons of Fig. 1 Tail I_{Ca} density was measured as the average I_{Ca} density over a 100-μs period starting 400 μs after partial repolarization to -40 mV. Smooth, continuous curves represent the best fit to the sum of two Boltzmann functions. D, E Separate plot of the single Boltzmann components from double Boltzmann fits for the P1 test pulse (parameters in Table 1)

Table 1. Parameters derived from double Boltzmann fits to tail I_{Ca} -voltage relationships of averaged data from Fig. 2A-C

		I_1 (pA/pF)	I_2 (pA/pF)	$V_{1/2,1}$ (mV)	$V_{1/2,2}$ (mV)	k_1 (mV)	k_2 (mV)
Control	(P1)	42.6	11.3	-14.3	23.8	5.2	15.4
Control	(P2)	51.9	4.5	-15.1	17.2	4.4	18.0
GDPβS	(P1)	55.5	8.7	-15.5	12.4	5.3	8.5
GDPβS	(P2)	60.4	-	-15.1	-	5.9	-
PMA	(P1)	60.2	16.9	-15.6	20.6	5.2	14.8
PMA	(P2)	54.4	8.5	-16.2	12.5	5.3	13.2

We expected to find similar effects on tonic inhibition after PMA. Surprisingly, even though we find that tail current densities at most potentials are larger in PMA-pretreated neurons (Fig. 2C), tail current activation curves in these cells proved to be as asymmetrical around the point of half-maximal activation as those from the control. Double Boltzmann fits show that the half-activation voltage and slope factor of each component are not substantially different from the control (Table 1). The main effect can be ascribed to a marked enhancement in the amplitude of the first component. The amplitude of the second component is unexpectedly similar to that in control conditions (Fig. 2E). Thus, even though the enhancement in the first component is similar to that seen after prepulses in GDPβS-dialysed neurons, it is noteworthy that the relative amplitude of each component (approximately 78 and 22%, respectively) is not significantly altered with respect to the control. In consequence, the PMA-induced increase in Ca²⁺ channel current amplitude

cannot be accounted for by changes in the relative amplitude of each Boltzmann component, as in the case of prepulses and GDP β S

Effects of PMA in GDP β S-dialysed cells

The presence of a prominent second voltage Boltzmann component of activation curves from PMA-pretreated neurons may suggest that tonic inhibition could still be present in such conditions. If this were true, both the increase in current amplitude and the alterations in current kinetics induced by PMA should be unrelated to removal of such tonic inhibition. In consequence, PMA should still induce both effects under conditions where tonic inhibition was previously removed by GDP β S dialysis. Figure 3 shows that in the absence of any appreciable prepulse-induced facilitation, the external application of PMA for 2 min enhances peak Ca^{2+} channel current amplitude and changes its kinetics. During PMA application current amplitude increases rapidly, reaching a $\approx 14\%$ plateau of current enhancement after approximately 1 min (Fig. 3A). This is not the only effect induced by PMA. Step-current inactivation during 50-ms depolarizations is increased from about 20% to more than 34% (Fig. 3B), and prepulses cause a marked decrease in current amplitude (Fig. 3A). Interestingly, these effects not only persist after terminating PMA application, but they become even more prominent upon returning to normal external solution (Fig. 3E). Current amplitude enhancement further increases by $\approx 8\%$ to reach a $\approx 25\%$ enhancement with respect to current amplitude before PMA (Fig. 3A), and step-current inactivation increases to $>40\%$ (Fig. 3B). Even more striking is the fact that perceptible changes in the activation time constant (τ_{act}) were not statistically significant until PMA perfusion ceased (Fig. 3C). During perfusion τ_{act} is reduced from 1.82 ± 0.38 ms to 1.74 ± 0.35 ms ($P > 0.05$) whereas after perfusion ceases it reduces to 1.28 ± 0.25 ms ($P < 0.001$). These observations suggest that phorbol esters may have non-specific actions on Ca^{2+} channels [1-4] even when they are present at low concentrations (500 nM) in the recording solution. This effect was not further investigated but it supports the convenience of using preincubation procedures. Finally, it should be noted that the tail current activation curve obtained at the end of the experiment (Fig. 3F) is much more symmetrical than that recorded from PMA-pretreated neurons (Fig. 2C). Double Boltzmann fits show that half activation voltage (-17.7 mV and 12.1 mV, for V_{h1} and V_{h2} , respectively) and slope factor (4.5 and 12.3 mV, for k_1 and k_2 , respectively) of each component are not substantially different from those seen in PMA-pretreated neurons (Table 1). However, the fractional amplitude of the second Boltzmann

component is reduced to less than 10% (Fig. 3F). This is 50% lower than the fractional amplitude of the second component in PMA-pretreated neurons (Fig. 2E). This observation suggests that GDP β S effectively removed tonic inhibition before PMA was applied.

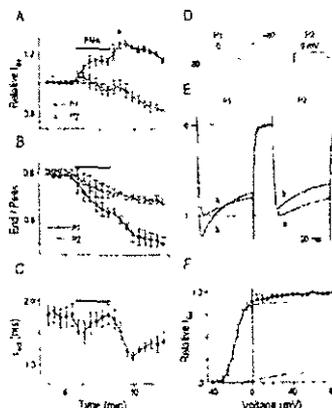


Fig. 3A-F Effects of PMA on Ca^{2+} channel currents in GDP β S dialysed cells. A Time course of the action of PMA on peak Ca^{2+} channel current recorded in GDP β S-dialysed neurons ($n=6$). Current was elicited using the voltage-clamp protocol in D delivered every 20 s. The voltage-clamp protocol (D) was similar to that in Fig. 1G, excepting that P1 and P2 were each 50 ms with step-wise depolarizations to 0 mV. PMA (500 nM) was dissolved in external solution and directly applied to the neurons under study where indicated by the solid bar. To correct for rundown peak current measurements immediately before application of PMA were fitted with a linear function which was used to calculate values of peak current at the time of the actual current recorded in the presence of PMA. Peak current amplitude was normalized to the control before PMA application. B Fraction of the initial peak current that remains at the end of the 50-ms test pulses. C Time constant (τ_{act}) of the activation phase of the current determined as in Fig. 1F. E Superimposed I_h traces represent the average I_h recorded at times marked in A. F Average tail current voltage relationship for the same neurons in A-C recorded at the end of the experiment. Voltage-clamp protocol was identical to that in Fig. 1G, excepting that a single pulse (P3) was used. Data were normalized to the current amplitude obtained after a step pulse to 80 mV. Smooth continuous curves represent the best fit to the sum of two Boltzmann functions. Added curves represent the separate plot of the single Boltzmann components from the double Boltzmann fit.

PMA pretreatment enhances inactivation of N-type Ca^{2+} channel current

It has been demonstrated that prepulses or GDP β S can enhance step-current inactivation [15, 20]. However, our brief test pulse records from Fig. 1A-D and Fig. 3E indicate an even more enhanced step-current inactivation following PMA that might be responsible for the marked decrease in step and tail current amplitude caused by prepulses. Therefore, we decided to investigate the effects of GDP β S and PMA on voltage-dependent inactivation. The experiments of Fig. 4 employ a variation on the three-pulse protocol used by

Cox and Dunlap [6] to measure the inactivation of N-type Ca^{2+} current in chick sensory neurons. The voltage protocol (Fig. 4F) consisted of two 10-ms test pulses to 0 mV given before and after a 500-ms conditioning pulse. The amplitude of the current during the last test pulse (P3) is used as an indicator of the extent of inactivation produced by the conditioning pulse (P2).

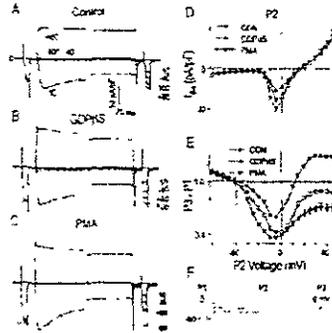


Fig. 4A-F Effects of PMA and GDP β S on steady-state inactivation of Ca^{2+} channel currents. A-C Superimposed i_{Ca} traces represent the average i_{Ca} from control ($n=6$), GDP β S-dialysed ($n=12$), and PMA-pretreated neurons ($n=13$) recorded with the voltage-clamp protocol in F, with P2 potentials to the voltages indicated in B. Same apply to C and D. Numbers next to each P3 i_{Ca} trace refer to P2 potentials. Same calibration bars for B-D. All current traces were scaled to the maximum current amplitude in P1. D Average peak current-voltage relationship for i_{Ca} during P2. E P3/P1 peak current as a function of the P2 potential. P2 voltage in F applies to E. F Voltage protocol. i_{Ca} densities were measured during three successive depolarizing voltage pulses (P1, P2, P3) separated by 15-ms intervals. P1 and P3 were each 10 ms long and variable in amplitude.

Inactivation of Ca^{2+} channel current as a function of prepulse potential (Fig. 4E) shows the complex voltage dependence described for N-type channels in bullfrog sympathetic neurons [18, 29], chick sensory neurons [6] and transfected HEK293 cells [20]. Inactivation is maximal around the point of P2 peak current (Fig. 4D) and decreases both at more negative and more positive potentials (Fig. 4E). Even though this behaviour suggests current-dependent inactivation [6], it has been demonstrated that a strictly voltage-dependent model of inactivation can explain it [18, 29]. In particular, the presence of appreciable inactivation at prepulse potentials below the threshold of current activation (Fig. 4A, -40 mV P2 potential) has been attributed to current-independent, closed-state inactivation [20].

We used the first test pulse (P1) current to correct the relations between P3 current and P2 potential for rundown and for a component of inactivation that recovered slowly if at all, within the 10-s intervals between sweeps. The relationship between P2 potential

and peak current amplitude evoked by P3 divided by that evoked by P1 is U shaped (Fig. 4E, see [6, 20]). Control currents inactivate only partially during the 500-ms prepulse; maximal inactivation reaches approximately 41% after P2 depolarizations to -10 mV. Nearly half-maximal inactivation (18%) is attained with P2 depolarizations to -40 mV that do not produce appreciable P2 current, supporting a preferential voltage-dependent model of inactivation for the N-type Ca^{2+} channels. Prepulses of over +30 mV facilitate control currents, reaching a $\approx 27\%$ plateau at potentials over +50 mV. This facilitation is dependent on tonic inhibition since it is absent in the presence of internal GDP β S. After GDP β S the current shows some recovery with increasing depolarization but recovery is incomplete, reaching a $\approx 10\%$ plateau of current inactivation with prepulses over +60 mV. This is not the only effect induced by GDP β S. Maximal inactivation is increased to more than 57%, and inactivation at more negative potentials than those inducing maximal inactivation is significantly increased. However, this increase in the magnitude of current inactivation does not involve any significant shift in the voltage dependence of current inactivation since half-maximal inactivation ($\approx 30\%$) is attained at the same potential as in the control (-40 mV). The $\approx 24\%$ tonic inhibition in our recording conditions (from Table 1) therefore has two main effects on the inactivation curve: a $\approx 28\%$ reduction in maximal inactivation, and a $\approx 27\%$ over-recovery at potentials positive to +30 mV.

On the other hand, three main effects are induced by PMA pretreatment (Fig. 4E). First, maximal inactivation reaches about 60%. This is 50% greater than control and also significantly larger than after GDP β S ($P < 0.05$). Second, a single Boltzmann fit to the inactivation curve at negative potentials (between -80 and -10 mV, data not shown) shows a midpoint of -53 mV for PMA-pretreated neurons, in contrast to -31 and -36 mV for control and GDP β S, respectively. Thus, PMA induces a -20 mV shift in the voltage dependence of inactivation. This shift cannot be accounted for by shifts in the activation curve (Fig. 4D). Therefore, this result strongly suggests an enhanced closed-state inactivation upon PMA. Third, recovery of the prepulse inactivation curve is reduced at positive voltages, resulting in an $\approx 25\%$ lower plateau of the inactivation curve at potentials positive to +50 mV.

Both GDP β S and PMA enhanced step-current inactivation during 500-ms depolarizations (Fig. 5). However, two main differences are seen between their effects. First, the fraction of peak current remaining at the end of the 500-ms depolarization is strongly reduced by PMA (End/Peak ratio in Fig. 5C). Second, PMA markedly changes the time course of inactivation

(Fig. 5A) The time course of inactivation after depolarization to the peak of inward current was well fit to the sum of two exponentials (Table 2). A substantial fraction of the current does not inactivate at all on this time scale (500 ms). The enhancement of step-current inactivation upon GDP β S is consistent with changes in the relative amplitudes of the components of inactivation, with little change in the second time constant (Table 2). By contrast, PMA not only induces an even more marked change in the relative amplitude of the components of inactivation, but also induces a marked decrease ($P < 0.05$ with respect to both control and GDP β S) in both time constants (Table 2). PMA therefore induces changes in the amount of step-current inactivation, in its voltage dependence (Figs. 4E, 5C), and in its time course (Fig. 5A, Table 2).

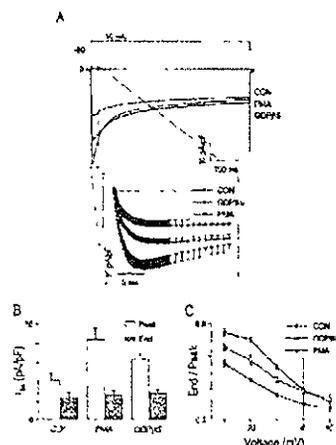


Fig. 5A-C Effects of PMA and GDP β S on step current inactivation. A Superposition of averaged I_{Ca} traces from control, GDP β S-dialysed, and PMA-pretreated neurons from Fig. 4 recorded during P2 depolarizations to -10 mV. Inset shows the first 20 ms of current traces with error bars. B Average peak current (Peak) and mean current during the last 1 ms of the 500 ms depolarization (End). C Peak/End ratio as a function of the voltage range of P2 in Fig. 4E that elicits inward current

Table 2 Effects of PMA and GDP β S on steady-state inactivation of Ca $^{2+}$ channel current inactivation kinetics. The time course of inactivation during a 500-ms depolarization to -10 mV was fitted to the sum of two exponentials, plus a constant (non-inactivating) component (A_0). Data are presented as mean \pm SEM

	Time constants (ms)		Amplitudes (% of total current)		
	τ_1	τ_2	A_0	A_1	A_2
Control	33.8 \pm 2.4	308.1 \pm 33.5	17.6 \pm 3.1	27.3 \pm 3.1	55.1 \pm 2.4
GDP β S	39.4 \pm 2.7	252.7 \pm 22.4	27.6 \pm 4.1*	29.8 \pm 2.3	42.6 \pm 2.7**
PMA	23.9 \pm 1.6**	202.5 \pm 13.5*	45.5 \pm 2.0**	23.3 \pm 0.5	31.2 \pm 2.7**

*Significantly different from the control at $P < 0.05$. PMA values marked with ** are significantly different with respect to both control and GDP β S at $P < 0.05$.

Figure 5A summarizes the major finding with respect to step-current kinetics. First, the current peaks are faster after PMA pretreatment. In the inset of Fig. 5A, the time to peak at -10 mV is decreased from 13 \pm 3 ms in the control to 8 \pm 2 ms after PMA, $P < 0.01$ (mean \pm SD). Second, peak current amplitude is augmented by PMA (Fig. 5B). Thus, early current is enhanced by PMA (Fig. 1A). However, the faster decay of the current during sustained depolarization does not result in substantial differences at the end of the 500-ms depolarization (Fig. 5B). Therefore, as suggested above, the enhancement in current amplitude exerted by PMA is strongly time-dependent.

Specific effects of PMA on N-type Ca $^{2+}$ channels

The results presented here clearly show that PMA pretreatment alters Ca $^{2+}$ channel current kinetics. Figure 6 shows that both in control (Fig. 6A) and in PMA-pretreated neurons (Fig. 6B), the specific N-type Ca $^{2+}$ channel blocker ω -CgTx GVIA (10 μ M, see [23]) blocks most (>80%) of the Ca $^{2+}$ channel current under our recording conditions (in the presence of 5 μ M nifedipine). The amplitude of the remaining current does not change upon pretreatment with PMA. The effects of PMA on current amplitude can therefore be attributed to the specific modulation of N-type Ca $^{2+}$ channels. Interestingly, the current remaining after ω -CgTx GVIA in PMA-pretreated neurons shows enhanced inactivation compared to that remaining in the control (Fig. 6E), suggesting that the toxin-resistant current might also be modulated by PMA pretreatment [2, 3]. However, its overall contribution to the effects reported here is expected to be less than \approx 15%.

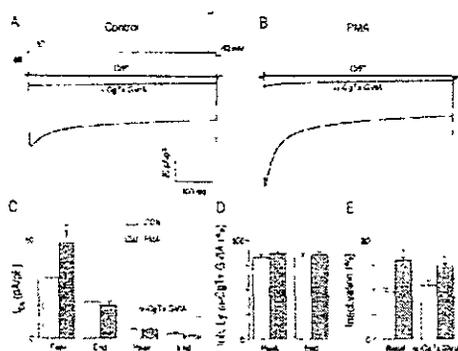


Fig. 8A-E ω -Conotoxin GVIA blocks most of the Ca^{2+} channel current. A. B. Superposition of averaged I_{Ca} traces from control (A, $n=7$) and PMA-pretreated neurons (B, $n=8$) recorded during 500-ms depolarizations to -10 mV. Upper traces show blockage by 10 μM ω -conotoxin GVIA (ω -CgTx GVIA) and 100 μM Cs^+ . C. Average peak current (Peak) and mean current during the last 1 ms of the 500-ms depolarization (End) in the absence and presence of ω -CgTx GVIA. D. Percent of peak and end current blockage by ω -CgTx GVIA. E. Percent of current inactivation during the 500-ms depolarization.

On the other hand, direct or non-specific actions of phorbol esters on N-type channels are not expected to account for the observed effects for three reasons: first, our pretreatment method allowed us to exclude PMA from the recording solution, minimizing any extracellular effects of the phorbol ester [24], second, the same pretreatment procedure with the inactive PMA analogue 4- α -phorbol does not reproduce the PMA actions ($n=5$, data not shown); and third, preincubations with the kinase inhibitor staurosporine [24], prior to and during PMA pretreatment, blocked all PMA-induced effects. Ca^{2+} channel currents from these neurons were indistinguishable from the control ($n=6$; data not shown). Taken together, the results with 4- α -phorbol and staurosporine support the interpretation that PMA-induced effects result from protein phosphorylation. Several pieces of evidence favour the idea that this phosphorylation can be mediated through activation of PKC

- 1 PMA is a well-known and widely used phorbol ester, with proven ability to activate PKC in SCG neurons when used at 500 nM concentration [2, 26, 28, 37].
- 2 4- α -phorbol does not activate PKC [4].
- 3 Staurosporine is a potent but not selective PKC inhibitor [24].

- 4 Evidence suggests that reconstituted N-channel currents are up-modulated by PMA via a still unknown mechanism [10] that involves PKC-dependent phosphorylation of the α_1 subunit of N-type Ca^{2+} channels (α_{1B} ; see [10, 27]).

PMA pretreatment and G protein activation induce opposite effects on N-type Ca^{2+} channel currents

We have shown that PMA-induced modulation of N-type Ca^{2+} channels is characterized by an enhancement in current amplitude accompanied by fast activation and fast inactivation kinetics. This modulation therefore results in nearly the opposite behaviour of the current than that seen under conditions favouring the activation of G-proteins. It was therefore of special interest to compare the current traces obtained from PMA-pretreated neurons with that seen following internal dialysis with GTP γ S, a non-hydrolysable GTP analogue that directly and permanently activates G proteins [23]. Figure 7A compares the current traces obtained in both conditions with the aid of the three-pulse voltage protocol (Fig. 4), with P2 depolarization to the peak of inward current. Note that, in sharp contrast to PMA pretreatment, internal dialysis with GTP γ S results in a reduction of Ca^{2+} channel current amplitude that can be partially accounted for by the well documented slowing of the activation phase of the current (for review see [7, 12, 17]). In addition, following internal GTP γ S, step-current inactivation is nearly eliminated (but not completely; see [17]). These opposite patterns in current activation and inactivation result in time-dependent differences in step-current amplitude: near the onset of a depolarizing test pulse the amplitude of current density is three to four times larger in PMA-pretreated neurons than in GTP γ S-dialysed ones, while measurement after prolonged depolarizations shows less marked differences. Note that the large differences in current amplitude in P1 and in peak P2 current ($P < 0.05$) are virtually absent in P3 ($P > 0.45$) due to the enhanced inactivation during P2 in PMA-pretreated neurons (Fig. 7B). We may therefore presume that the main difference in the behaviour of the current under the two conditions is due to a component of the current, in PMA-pretreated neurons, which inactivates almost completely during the 500-ms depolarization. If this is the case, the main difference in the current between the two conditions may be represented by the current trace obtained by subtracting the current trace in GTP γ S from that after PMA. This current trace is shown in Fig 8A. It should be noted that the difference current thus obtained

retains the main characteristics of the current in PMA-pretreated neurons, fast activation and fast inactivation kinetics, so we designate this the F_sF_i component. The activation phase of this difference current can be described by a single exponential function with a time constant of 1.52 ms. This value is in good agreement with that obtained from PMA-pretreated neurons (1.43 ± 0.11 ms, $r=13$). Interestingly, the time course of current activation in GTP γ S-dialysed neurons (Fig. 7A) is clearly biphasic and, when fitted to the sum of two exponential functions, the faster time constant was found to match the single time constant of the F_sF_i component (1.45 ± 0.19 ms, $r=6$). This coincidence in activation time-constant values led us to speculate that a small F_sF_i component might also contribute to the whole-cell current in the presence of GTP γ S. The amplitude of this component would correspond to the amplitude of the fast component of the double exponential function. Figure 8B shows the F_sF_i component on a scale that would hypothetically correspond to the GTP γ S-dialysed neurons. If this F_sF_i curve is subtracted from the GTP γ S current trace, the difference current is a slowly activating and non-inactivating (S_sN) component that activates with a single time constant of 47.15 ms (continuous line in Fig. 8C shows fit). This value is in agreement with the second time constant for current activation of GTP γ S-dialysed neurons (45.6 ± 13.4 ms, $r=6$). Thus the complex current kinetics seen with internal GTP γ S [17] might be explained as a mixture of the behaviour of two populations of channels, each with simple kinetics (Fig. 8B). We propose that each of these two populations (scaled to unity in Fig. 8C) represents the extreme behaviours of the N-type Ca^{2+} channel current under G-protein- (S_sN) and phorbol-ester-induced (F_sF_i) modulatory pathways.

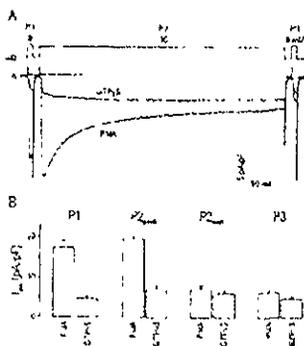


Fig. 7A, B. Comparison of current inactivation in PMA-pretreated and GTP γ S-dialysed neurons. A Superposition of averaged I_{Ca} traces recorded from PMA-pretreated (same neurons in Fig. 4) and GTP γ S dialysed

neurons ($n=6$) using the three-pulse voltage protocol. B Aggregated data for peak currents during P1, P2 ($P2_{max}$) and P3, and mean current during the last 1 ms of P2 ($P2_{min}$).

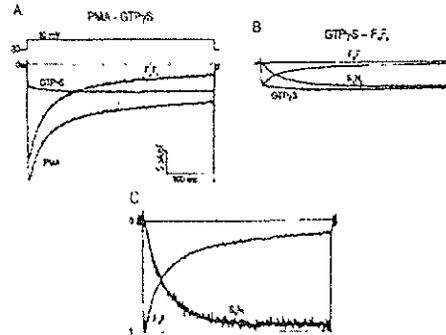


Fig. 8A-C. Hypothetical behavior of N-type Ca^{2+} channel current under the influence of PMA- or G-protein induced modulations. A Superposition of averaged I_{Ca} traces elicited by 500-ms steps in GTP γ S-dialysed and PMA-pretreated neurons (P2 I_{Ca} traces from Fig. 6A). The point-to-point subtraction indicated isolates a fast-activating, fast-inactivating component (F_sF_i). B F_sF_i was scaled down to the amplitude of the first component of a double-exponential fit to the activation phase of the current in GTP γ S (solid curve shows fit). The scaled F_sF_i was then subtracted from the current in GTP γ S, revealing a slowly activating, non-inactivating (S_sN) component. C Superposition of F_sF_i and S_sN scaled to the maximum current. Solid curve through S_sN shows fit to a single exponential function.

Discussion

Previous work carried out using SCG neurons has focused mainly on the ability of phorbol esters to disrupt G-protein-mediated inhibition [26, 28, 31]. Here we ask if all phorbol-ester-induced effects are related solely to the prevention of G-protein-induced inhibition [2]. Our primary conclusion is that, besides the enhancement of the Ca^{2+} channel current reported in previous studies, phorbol ester PMA leads to alterations in the activation and inactivation kinetics of the whole-cell Ca^{2+} channel current that cannot be explained by the relief of tonic G-protein-mediated inhibition.

PMA-induced enhancement of Ca^{2+} channel currents does not involve tonic inhibition removal

The results from experiments with prepulses and GDP β S clearly demonstrate the existence of a tonic form of Ca^{2+} channel inhibition in basal conditions in SCG neurons [2, 15, 28, 31]. Thus, PMA might act by disrupting this basal inhibition and enhancing Ca^{2+} channel currents [29]. However, two pieces of evidence

favour the idea that the increase in Ca^{2+} channel current amplitude induced by PMA is unrelated to the removal of such tonic inhibition. First, the second-voltage Boltzmann component of activation curves in PMA-pretreated neurons (Fig. 2E) matches the description of a voltage-dependently inhibited population of channels [3]. In addition, prepulses do have an effect on this population since activation curves after prepulses are much more symmetrical than those in the absence of a prepulse (Fig. 2C). Furthermore, this second component is reduced to less than 10% if neurons are dialysed with GDP β S prior to PMA treatment (Fig. 3F). Thus, if this second component represents tonically inhibited channels [15], PMA pretreatment does not remove tonic inhibition. In this regard, our results might echo the report of enhanced N-type Ca^{2+} channel current after application of the phorbol ester PDBu, which does not involve the reversal of tonic inhibition in frog sympathetic neurons [30]. We propose, therefore, that tonic inhibition is still present in cells treated with PMA.

Second, PMA still enhances current amplitude in cells whose tonic inhibition has been previously removed by GDP β S dialysis (Fig. 3A). Thus, PMA-induced enhancement must arise from an independent effect on the non-modulated population. Interestingly, it has been demonstrated that α_{1B} currents expressed in oocytes are up-modulated by PMA independently of its effects on G-protein-mediated inhibition [19, 27]. This independent effect of PMA has been reported to result in a 50% increase in whole-cell channel current [19]. Thus, it is at least possible that the increase in current amplitude upon PMA could be explained without evoking tonic inhibition removal. If this were the case, this might be one of the mechanisms by which PMA gives rise to voltage-independent increases in tail current amplitudes in SCG neurons [23, 37].

Several studies have shown that previous treatment with PMA results in a more or less significant attenuation of subsequent agonist-induced Ca^{2+} channel current inhibition [9, 26, 28, 31]. However, the ability of PMA to reverse previous Ca^{2+} channel inhibition through direct activation of G proteins by GTP γ S depends on the use of very long lasting (>50 ms), highly depolarizing prepulses [2, 28]. This indicates that the "order of application" [3] is critical to the effects of PMA [2]. Therefore, PMA may be able to prevent G-protein-mediated inhibition only if its effects are established before the activation of G proteins. We can use this supposition to explain the persistence of tonic inhibition after application of PMA.

PMA-induced changes in activation and inactivation kinetics

As in the case of current amplitude enhancement, we find that neither the alterations in the activation time constant nor those related to voltage-dependent inactivation can be accounted for by tonic inhibition removal for the following reasons. First, removal of tonic inhibition by prepulses or GDP β S has only marginal effects on the time course of current activation, and these effects are seen only at potentials more positive than those eliciting maximal inward current (Fig. 1F). It follows that the reduced activation time constant at negative potentials after PMA pretreatment (Fig. 1F) cannot be explained by tonic inhibition removal. Instead, this result suggests alterations in the activation kinetics of the non-modulated population. Accordingly, PMA still changes Ca^{2+} channel current kinetics in cells where tonic inhibition was previously eliminated by GDP β S dialysis (Fig. 3E). A similar effect on the time constant for Ca^{2+} channel current activation was reported for this preparation using the PKC activators diC8 [1] and PMA [28]. However, the action of PMA on the activation time constant at potentials negative to those eliciting maximal inward current has not been previously reported.

Second, we found that tonic inhibition removal by GDP β S shifts the relative amplitude of the components of inactivation rather than producing a change in the time constants (Table 2) or in the voltage dependence of inactivation (Fig. 4E). This interpretation is consistent with that of Bean [3], who found that agonist-induced, G-protein-mediated inhibition has only small effects on the voltage dependence of inactivation. Thus, the marked effects induced by PMA in the voltage dependence of inactivation, (Fig. 4E), and in the time constants of step-current inactivation (Table 2) cannot be explained by the relief of tonic inhibition. We find that these alterations in the inactivation pattern are consistent with the predictions of the model proposed by Patil et al. [20]. On one hand, small increments in open state inactivation (Fig. 5) result in a substantial reduction in the plateau of inactivation curves at saturating depolarization (Fig. 4E). On the other hand, shifts in the midpoint of prepulse inactivation toward more negative voltages (Fig. 4E) are predicted if there is an increased number of closed states from which substantial inactivation occurs. Thus, both open- and closed-state inactivation are certainly affected by PMA. These results support the suggestion of Swartz [28], that PMA-induced phosphorylation might control an inactivation process independently of its effects on G-protein-mediated inhibition. This effect of phosphorylation on N-type Ca^{2+} channels is in

agreement with the conclusions of Werz et al. [29]. These authors found that the phosphatase inhibitor okadaic acid enhances voltage-dependent inactivation of these channels in bullfrog sympathetic neurons, and concluded that this effect results from phosphorylation since it was prevented by staurosporine.

It has been shown that pharmacologically identified N-type Ca^{2+} channels in single neurons can inactivate with marked differences in the rate and extent of inactivation [16, 18, 22]. Interestingly, Plummer and Hess [21] have shown that individual N-type channels can switch between inactivating and non-inactivating modes of gating. We favour the proposition by Werz et al. [29] that N-type channels might inactivate via these pathways depending on their state of phosphorylation (Fig. 8).

Physiological implications of PMA-induced modulation

An increase of Ca^{2+} current by phosphorylation has already been proposed as a possible mechanism by which PKC activation could lead to an increase in transmitter release during brief depolarizations [28, 30, 31]. However, it is interesting to speculate that the enhanced voltage-dependent inactivation seen after phosphorylation may influence the extent of current inactivation during a train of action potentials. Thus, while G protein inhibition may be partly relieved during an action potential train leading to a progressive increase in Ca^{2+} influx [19], it is expected that the initial potentiation of Ca^{2+} entry through phosphorylated channels will be followed by a strong depression due to cumulative voltage-dependent inactivation between action potentials. This proposed pattern of Ca^{2+} entry through phosphorylated channels during a burst of activity could be one of the mechanisms explaining why an initial potentiation of neurotransmitter release may be followed by an enhanced synaptic depression in conditions favouring PKC activation (e.g. [25]).

Acknowledgements: Supported by DGAPA-UNAM IN213400 CONACYT 33942-N and Alexander von Humboldt Stiftung. We would like to thank Dr Michael Delay for greatly improving the manuscript.

References

- 1 Abrahams TP, Schofield GG (1992) Norepinephrine-induced Ca^{2+} current inhibition in adult rat sympathetic neurons does not require protein kinase C activation. *Eur J Pharmacol* 227:189-197
- 2 Barrett CF, Rittenhouse AR (2000) Modulation of N-type calcium channel activity by G proteins and protein kinase C. *J Gen Physiol* 115:277-286
- 3 Bean BP (1985) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 314:153-156
- 4 Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257:7847-7851
- 5 Chen Y, Penington NJ (1997) Order of application determines the interaction between phorbol esters and GTP- γ -S in dorsal raphe neurons: evidence that the effect of 5-HT is modified upstream of the G protein-Ca channel interaction. *J Neurophysiol* 77:2697-2703
- 6 Cox D, Dunlap K (1994) Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. *J Gen Physiol* 104:311-335
- 7 Dolphin AC (1998) Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J Physiol (Lond)* 506:3-11
- 8 Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B (1998) G-protein β -subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca^{2+} channels. *J Neurosci* 18:9163-9170
- 9 Garcia-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, Garcia DE (2000) PMA selectively prevents voltage-dependent inhibition of N-type calcium currents induced by G-protein activation [abstract]. *Biophys J* 78:105A
- 10 Hamid J, Nelson D, Spaetgens R, Dubel SJ, Snutch TP, Zamponi GW (1999) Identification of an integration center for cross-talk between protein kinase C and G protein modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem* 274:6195-6202
- 11 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100
- 12 Hille B (1994) Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17:531-538
- 13 Hirning LD, Fox AP, McCleskey EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ, Tsien RW (1988) Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239:57-61
- 14 Hockberger P, Toselli M, Swandulla D, Lux HD (1989) A diacylglycerol analogue reduces neuronal calcium currents independently of protein kinase C activation. *Nature* 338:340-342
- 15 Ikeda SR (1991) Double-pulse calcium current facilitation in adult rat sympathetic neurons. *J Physiol (Lond)* 439:181-214
- 16 Jones SW (1998) Overview of voltage-dependent calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:299-312
- 17 Jones SW, Emslie KS (1997) Transmitter modulation of neuronal calcium channels. *J Membr Biol* 155:1-10
- 18 Jones SW, Marks JT (1989) Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. II. Inactivation. *J Gen Physiol* 94:169-182
- 19 Park D, Dunlap K (1998) Dynamic regulation of calcium influx by G proteins: action potential waveform and neuronal firing frequency. *J Neurosci* 18:6757-6765

- 20 Patel PG, Brody DL, Yue DJ (1998) Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron* 20:1027-1038
- 21 Plummer MR, Hess P (1991) Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels. *Nature* 351:657-659
- 22 Plummer MR, Logothetis DE, Hess P (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* 2:1453-1463
- 23 Plummer MR, Pritenhouse A, Kanevsky M, Hess P (1991) Neurotransmitter modulation of calcium channels in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 11:2339-2348
- 24 Ruegg UT, Burgess GM (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but non-specific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10:218-220
- 25 Snapira R, Silberberg SD, Ginsburg S, Rahamimoff R (1987) Activation of protein kinase C augments evoked transmitter release. *Nature* 325:58-60
- 26 Shapiro MS, Zhou J, Hile B (1996) Selective disruption by protein kinases of G-protein-mediated Ca^{2+} channel modulation. *J Neurophysiol* 76:311-320
- 27 Stea A, Soong TW, Snutch TP (1995) Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron* 15:929-940
- 28 Swartz KJ (1993) Modulation of Ca^{2+} channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G-protein-mediated inhibition. *Neuron* 11:305-320
- 29 Werz MA, Elmslie KS, Jones SW (1993) Phosphorylation enhances inactivation of N-type calcium channel current in bullfrog sympathetic neurons. *Pflügers Arch* 424:538-545
- 30 Yang J, Tsien RW (1993) Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* 10:127-136
- 31 Zhu Y, Ikeda SR (1994) Modulation of Ca^{2+} -channel currents by protein kinase C in adult rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 72:1549-1560