



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**TRANSFERENCIA DE LA REGULACIÓN POR SUBUNIDAD
BETA DE LOS CANALES DE Ca^{2+} DE ALTO UMBRAL A
CANALES DE Ca^{2+} DE BAJO UMBRAL**

**ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN
ARTÍCULO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JUAN MANUEL ARIAS MONTAÑO

ASESOR: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR



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 padres Antonio y Tirsa, en quienes siempre he encontrado el apoyo y el amor para continuar adelante en la vida.

Transferencia de la regulación por subunidad beta de canales de Ca²⁺ de alto umbral a canales de Ca²⁺ de bajo umbral.

Juan Manuel Arias,^{a,c} Janet Murbartián,^a Iuliia Vitko,^a Jung-Ha Lee,^b Edward Perez-Reyes^a

^aDepartment of Pharmacology,
University of Virginia,
Charlottesville VA 22908
USA

^bDepartment of Life Science,
Sogang University,
Shinsu-dong, Seoul 121-742,
Korea

^cDirección actual:
Department of Physiology and Biophysics,
Dalhousie University,
Halifax NS B3H 1X5,
Canada

ÍNDICE

Resumen	ii
1. Introducción	1
2. Métodos	
2.1 Construcción de los canales de calcio quiméricos	3
2.2 Registros electrofisiológicos y análisis de los datos	3
2.3 Espectroscopía de dicroísmo circular	4
3. Resultados y discusión	
3.1 Las subunidades β no modulan las propiedades biofísicas de los canales tipo T	6
3.2 Transferencia de la regulación por las subunidades β	7
3.3 La estructura del enlace IS6-AID es esencial para la regulación por las subunidades β	11
3.4 Estudios por dicroísmo circular	13
3.5 Evidencia de que el segmento IS6 está involucrado en la apertura y cierre del canal	13
3.6 Conclusiones	15
Bibliografía	17
Apéndice	21

RESUMEN

El calcio proveniente del influjo a través de los canales de calcio dependientes del voltaje sirve como un mensajero intracelular que controla una gran variedad de procesos, los cuales van desde la forma cómo pensamos hasta cómo nuestros músculos se contraen (Berridge et al., 1998). Por ello, la actividad de estos canales se encuentra fuertemente regulada por sus subunidades auxiliares, las subunidades de las proteínas G, las cinasas de proteínas y la calmodulina (Catterall, 2000). Los canales de calcio dependientes del voltaje de alto umbral (HVA, por sus siglas en inglés) son complejos multiméricos los cuales contienen la subunidad principal α_1 , responsable de la formación del poro, y las subunidades auxiliares $\alpha_2\delta$ ($\text{Ca}_v\alpha_2\delta$), β ($\text{Ca}_v\beta$) y en ocasiones la γ_1 ($\text{Ca}_v\gamma_1$).

La apertura y el cierre (denominados colectivamente *gating*) así como la expresión de los canales de calcio de alto umbral (HVA) están controlados por sus subunidades auxiliares β . A pesar de que se conoce la estructura molecular de sus sitios de interacción con la subunidad α_1 , aún no se determina cómo la subunidad β modula el *gating* de estos canales. Con el fin de investigar al respecto, se aprovechó el hecho de que las subunidades α_1 de los canales de calcio de bajo umbral $\text{Ca}_v3.1$ no son reguladas por las subunidades β , y se crearon canales quiméricos con funciones adicionales. Basado en la creación de tales canales, la regulación por la subunidad β fue transferida a un canal de calcio de bajo umbral (LVA). En este estudio se muestra que esta regulación depende de la existencia de una estructura rígida en la región que conecta el segmento IS6 con el dominio de interacción de la subunidad α_1 (AID). Además, los canales quiméricos evidenciaron la participación del segmento IS6 en el *gating* del canal. En conjunto, los resultados apoyan un modelo de acople directo, donde las subunidades β alteran los movimientos del segmento IS6 que ocurren conforme el canal transita entre los estados cerrado, abierto e inactivado.

1. INTRODUCCIÓN

El calcio proveniente del influjo a través de los canales de calcio dependientes del voltaje sirve como un mensajero intracelular que controla una gran variedad de procesos, los cuales van desde la forma cómo pensamos hasta cómo nuestros músculos se contraen (Berridge et al., 1998). Por ello, la actividad de estos canales se encuentra fuertemente regulada por sus subunidades auxiliares, las subunidades de las proteínas G, las cinasas de proteínas y la calmodulina (Catterall, 2000). Los canales de calcio dependientes del voltaje de alto umbral (HVA, por sus siglas en inglés) son complejos multiméricos los cuales contienen la subunidad principal α_1 , responsable de la formación del poro, y las subunidades auxiliares $\alpha_2\delta$ ($Ca_v\alpha_2\delta$), β ($Ca_v\beta$) y en ocasiones la γ_1 ($Ca_v\gamma_1$). Las subunidades β controlan la dependencia al voltaje de la activación y de la inactivación, la probabilidad de apertura, la sensibilidad a los fármacos y la expresión de los canales HVA en la superficie celular (Chien et al., 1998; Perez-Reyes y Schneider, 1994; Wakamori et al., 1999). Las subunidades β se unen a una secuencia consensual, el dominio de interacción de la subunidad alfa (AID, por sus siglas en inglés), presente en el asa intracelular que une los repetidos I y II de los canales HVA (Pragnell et al., 1994). Las mutaciones en el AID que desestabilizan la unión de la subunidad β con la subunidad α_1 reducen de igual forma su habilidad para aumentar la expresión de los canales en la superficie celular y para regular sus propiedades (Pragnell et al., 1994), lo cual condujo a la hipótesis de que todas las formas de regulación por las subunidades β dependerían de esta interacción. Sin embargo, en estudios subsecuentes ha sido posible separar estos efectos (Canti et al., 2001; Gerster et al., 1999; Restituito et al., 2001; Tareilus et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998). Empleando proteínas de fusión que contienen la secuencia del AID, la afinidad de esta interacción fue estimada entre 6-10 nM por dos diferentes metodologías (De Waard et al., 1996; Geib et al., 2002). La interacción es reversible, permitiendo a una sola subunidad β el servir de chaperona a varias subunidades α_1 para inducir su expresión en la membrana plasmática (Restituito et al., 2001; Tareilus et al., 1997). La estructura de las subunidades β se resolvió recientemente en la presencia de péptidos del AID (Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegam et al., 2004). Se encontró que los aminoácidos cruciales de la subunidad α_1 (De Waard et al., 1996) se unen a la subunidad β en una cavidad hidrofóbica de esta última. De forma notoria, los péptidos del AID empleados en estos estudios no incluyen la secuencia que separa el AID del último

segmento transmembranal del repetido I (IS6). A pesar de la comprensión detallada de la interacción α_1 - β , el mecanismo mediante el cuál las subunidades β alteran el *gating* del canal aún no se conoce. Con el fin de investigar al respecto, se aprovechó el hecho de que las subunidades α_1 de los canales de calcio de bajo umbral $Ca_v3.1$ no son reguladas por las subunidades β , y se crearon canales quiméricos con funciones adicionales. En este estudio se muestra que las subunidades β están acopladas directamente al segmento IS6. Debido a que la sustitución del IS6 afecta profundamente el *gating* del canal, se concluye que las subunidades β modulan los canales de calcio tipo HVA alterando la movilidad de este segmento.

2. MÉTODOS

2.1 Construcción de los canales de calcio quiméricos

Las quimeras fueron confeccionadas empleando la técnica de la extensión del empalme por la PCR (Horton et al., 1993), usando 0.5 U de la polimerasa del DNA KOD1 (Novagen, Madison, WI). De acuerdo con el protocolo del productor, se aplicaron condiciones con dos etapas por ciclo. El producto final de la PCR fue clonado en el vector pCR4 mediante el uso del *kit* Zero Blunt® TOPO® PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las construcciones quiméricas completas se realizaron por subclonación de fragmentos del pCR4 en el cDNA del Cav3.1 ($\alpha_{13.1}$), obtenido del cerebro de la rata y contenido en el vector pcDNA3 (Perez-Reyes et al., 1998). Las sustituciones de poli-Gly (PG6) y poli-Ala (PA6) en el asa I-II de la quimera G12B se introdujeron mediante la técnica del Quikchange® (Stratagene, La Jolla, CA) empleando 1 U de la polimerasa del DNA *Pfu*. Las secuencias de todas las clonas se confirmó en la región empleada para la mutagénesis.

2.2 Registros electrofisiológicos y análisis de los datos

La metodología usada para el registro y el análisis de las corrientes de célula completa se ha descrito previamente (Gómora et al., 2002). Las células derivadas del riñón de embrión humano (293; American Type Culture Collection, Manassas, VA) fueron transfectadas transitoriamente con el cDNA de los canales de la rata $\alpha_{3.1}$, $\alpha_{2.2}$ (cerebral) o quiméricos, en la presencia o ausencia de las subunidades auxiliares β_{1b} , β_{2a} , β_3 o β_4 de la rata (Perez-Reyes y Schneider, 1994), todos ellos clonados en el vector pcDNA3 (Invitrogen). Las células positivas se identificaron mediante la cotransfección con un plásmido que contenía el cDNA para la proteína verde fluorescente (pGreen Lantern, Invitrogen). La composición de la solución externa de registro fue (en mM): 5 CaCl₂ (o 10 BaCl₂ para el $\alpha_{12.2}$), 166 cloruro de tetraetil amonio (TEA) y 10 HEPES (pH ajustado a 7.4 con TEA-OH). Los estudios iniciales con la quimera NI-II se realizaron expresándola en el sistema de ovocitos del *Xenopus* empleando 10 mM Ba²⁺ como el acarreador de la carga y con la metodología descrita previamente (Lee et al., 1999). La solución interna en las pipetas de registro contenía (en mM): 125 CsCl, 10 EGTA, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 0.3 Na₃GTP y 10 HEPES (pH ajustado a 7.2 con CsOH). La resistencia de acceso promedio en la configuración de célula completa fue 4.4 M Ω . Los registros de las células con una resistencia de acceso mayor a los 7.5 M Ω fueron eliminados. La resistencia de acceso se

compensó al menos al 70 % entre los protocolos (predicción y corrección, retraso 10 μ s), lo que resulta en un error residual de 1.6 mV como máximo en la estimación del voltaje en las relaciones corriente-voltaje (I - V). La dependencia al voltaje de la activación se calculó por el ajuste de los puntos en la relación I - V a la siguiente fórmula

$$I = \frac{G_{\max} \cdot (V_m - V_{rev})}{1 + \exp((V_{50} - V_m) / k)},$$

donde I es la corriente al pico para cada potencial de prueba, V_{rev} es el potencial de inversión aparente, V_{50} es el punto medio de la activación y k es el factor de la pendiente. La conductancia (G) se calculó empleando una versión modificada de la ley de Ohm

$$G = \frac{I}{(V_m - V_{rev})}.$$

La densidad de la corriente se calculó empleando el valor al pico en la relación I - V dividida por la capacitancia de la célula. La capacitancia promedio de las células fue de 11.6 pF.

2.3 Espectroscopía de dicroísmo circular

Los péptidos correspondientes a los primeros 19 aminoácidos, ya sea de α_1 2.2 (GEFAKERERVENRRAFLKL), G12B-PA6 (GEFAKERERAAAAAFLKL) o G12B-PG6 (GEFAKERERGGGGGGFLKL) fueron sintetizados en la Unidad de Investigación Biomolecular de la Universidad de Virginia (University of Virginia Biomolecular Research Facility). La identidad y la pureza de los péptidos se confirmó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y por espectrometría de masas. Los péptidos se disolvieron a una concentración de 1 mg·ml⁻¹ en un regulador de fosfatos de potasio 1.2 mM (pH 6.9) con metanol al 88 % (Krittanaí y Johnson Jr., 2000). Los registros de dicroísmo circular se colectaron ya sea con los péptidos disueltos sólo en un regulador de fosfatos de potasio 10 mM (pH 6.9) o con la presencia adicional de 15 mM de 2,2,2-trifluoroetanol. Los espectros se obtuvieron en un espectropolarímetro AVIV modelo 215 (Aviv Biomedical, Lakewood, NJ). El promedio de tres barridos de las muestras (miligrados, θ), hechos a 25° C, se sustrajo de un número igual de

barridos en soluciones que carecían de los péptidos. La elipticidad media del residuo ($[\theta]$) y la fracción de hélices se calcularon como se ha descrito previamente (Pace et al., 1997; Rohl et al., 1996).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Las subunidades β no modulan las propiedades biofísicas de los canales tipo T

Las subunidades β de los canales de calcio ($\text{Ca}_v\beta$) se unen a un dominio de 18 aminoácidos en la subunidad α_1 (AID) localizado en el asa intracelular que conecta los repetidos I y II (Pragnell et al., 1994). En tanto que la secuencia del AID en las subunidades α_1 está claramente conservada en las familias de los canales de calcio tipo HVA (Ca_v1 y Ca_v2), en la familia de los canales tipo LVA (Ca_v3) se halla pobremente conservada. De forma notoria, en las subunidades α_1 de los canales Ca_v3 (Figura 1A), 2 de los 5 aminoácidos que establecen contacto con las subunidades β no están presentes (Chen et al., 2004; Opatowsky et al., 2004; Van Petegam et al., 2004). La evidencia que indica la ausencia de regulación de los canales nativos Ca_v3 por las subunidades β fue provista por experimentos del bloqueo de la expresión con oligonucleótidos antisentido, los cuales mostraron que la eliminación de las subunidades β sólo alteraron las corrientes tipo HVA pero no las tipo LVA (Lambert et al., 1997). Los canales recombinantes $\alpha_13.1$ fueron coexpresados con cada una de las cuatro subunidades β con el propósito de evaluar si acaso pudieran ser regulados por estas subunidades. Por si mismo, $\alpha_13.1$ indujo la expresión de fuertes conductancias con todas las propiedades típicas de las corrientes de bajo umbral tipo T (Perez-Reyes et al., 1998). La coexpresión de cualquiera de las subunidades β no tuvo ningún efecto significativo en la expresión, la dependencia al voltaje o en la cinética de los canales $\alpha_13.1$ (en las Figuras 1B y C se muestran sólo los resultados de la coexpresión con la subunidad β_2a). En contraste, la subunidad β_2a estimuló más de cuatro veces la expresión de las corrientes $\alpha_12.2$, modificó la dependencia al voltaje de su activación e hizo más lenta su inactivación (Figuras 1D y E). Efectos similares de las subunidades β se han reportado previamente en el sistema de expresión de los ovocitos del *Xenopus* (Wakamori et al., 1999). Estos resultados muestran por tanto la eficacia de las células 293 para la expresión y detección de los efectos de las subunidades β , y además confirman que éstas no afectan el *gating* de los canales $\alpha_13.1$ (Dubel et al., 2004). En consecuencia, se postuló que la inserción de la secuencia del AID de los canales de calcio tipo HVA en los canales tipo LVA podrían conferir en éstos últimos la regulación por las subunidades β .

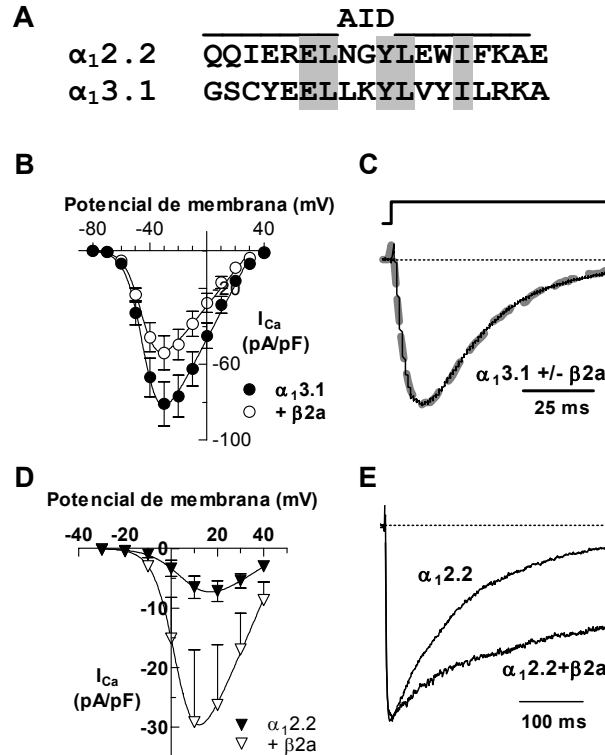


Figura 1. Las subunidades β sólo regulan a los canales de Ca^{2+} HVA. (A) Alineamiento de la secuencia del AID del $\alpha_1 2.2$ con la región homóloga del $\alpha_1 3.1$. Los aminoácidos idénticos en ambas secuencias están resaltados en gris. La zona central contiene aminoácidos que forman contactos claves con las subunidades β (L-GY-WI). Aunque estos aminoácidos se conservan en todas las subunidades α_1 de los canales HVA, no lo están en las subunidades LVA. (B,C) La coexpresión de la subunidad $\beta 2a$ con el $\alpha_1 3.1$ no tuvo un efecto significativo sobre la densidad de corriente o las cinéticas. (D,E) La coexpresión de la subunidad $\beta 2a$ con el $\alpha_1 2.2$ aumenta la densidad de corriente y hace más lenta la cinética de la inactivación. Las curvas suavizadas representan el ajuste del promedio de los datos a la ecuación indicada en la Sección 2. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media (S.E.M.). La cantidad de células estudiadas se encuentra en la Tabla 1. En todas las figuras se empleó el mismo esquema de símbolos, donde α_1 se representa con símbolos rellenos y $\alpha_1 + \beta 2a$ con símbolos vacíos. Se muestran trazos de corrientes representativas en la presencia o ausencia de $\beta 2a$ (línea gris punteada). El protocolo de estimulación incluyó una despolarización a -40 mV (C) o $+20$ mV (E), a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. Los datos se normalizaron con respecto al valor máximo.

3.2 Transferencia de la regulación por las subunidades β

La primera quimera, NI-II, se creó empleando la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el cDNA del $\alpha_1 2.2$ que codifica para los primeros 111 aminoácidos del asa I-II, y posteriormente fue subclonado en el $\alpha_1 3.1$ usando los sitios de restricción HindIII y BspEI

(Figura 2A). Esto resultó en una quimera que retuvo los primeros 32 y los últimos 7 aminoácidos del asa I-II del $\alpha_13.1$ (Figura 2B). Ni la dependencia al voltaje de la activación, ni la cinética de la quimera NI-II se afectaron por la subunidad $\beta 2A$ (Tabla 1). Este resultado indica que la simple adición de un asa que contenga la secuencia del AID no necesariamente confiere la regulación por la subunidad β a un canal tipo LVA. La estructura secundaria predicha por el algoritmo SOPMA (Geourjon y Deleage, 1995) identifica con precisión al AID como una hélice α (Chen et al., 2004; Van Petegam et al., 2004), y de igual forma predice como una hélice α a la mayor parte de la región que conecta el segmento IS6 y el AID (Figura 2C). De forma notoria, la secuencia de esta región está mejor conservada en las tres subunidades α_1 de los canales Ca_v2 del humano, de la rata y del ratón, que el propio AID (sólo 1 sustitución contra 4, respectivamente). En contraste, en la secuencia adicional de la misma región del $\alpha_13.1$, y que precede a la secuencia homóloga del AID, se predice la existencia de dos zonas en espiral al azar (*random coil*), y esta secuencia se retuvo en la quimera NI-II.

¿Podrían estas regiones en espiral al azar impedir la habilidad de las subunidades β para regular la actividad de los canales quiméricos? Para contestar a esta pregunta se creó la quimera G12B, donde el extremo final del segmento IS6 del $\alpha_13.1$ y el inicio del asa del $\alpha_12.2$ se fusionaron directamente (Figura 2B). De forma inesperada, la introducción de secuencias de un canal de calcio tipo HVA en uno tipo LVA condujo a la expresión de un canal que se activó en voltajes incluso más negativos; tanto la relación $I-V$ como la h_∞ (relación $I-V$ en el estado estacionario) fueron desviados en -20 mV (Tabla 1). Este corrimiento en la apertura de los canales tipo LVA sugiere que su asa I-II tiene una función importante en la determinación de su dependencia al voltaje. Un segundo resultado no esperado fue que la corriente del canal quimérico fue mayor que la del tipo nativo (G_{\max} $\alpha_13.1$, 15 ± 2 , $n = 10$; G12B, 33 ± 6 , $n = 15$, $p < 0.05$). Se ha mostrado que el asa I-II de los canales de calcio tipo HVA contienen una señal para retención en el retículo endoplásmico (RE) (Bichet et al., 2000), por lo cual la expresión de la quimera debería haberse reducido. El hallazgo de un incremento en la corriente es más consistente con la hipótesis de que otros segmentos intracelulares de los canales de calcio tipo HVA participan en la formación de la señal para retención en el RE (Cornet et al., 2002). El resultado es asimismo consistente con la desarticulación de una señal para retención en el RE en los canales de calcio tipo LVA. La coexpresión de la quimera G12B con cualesquiera de las

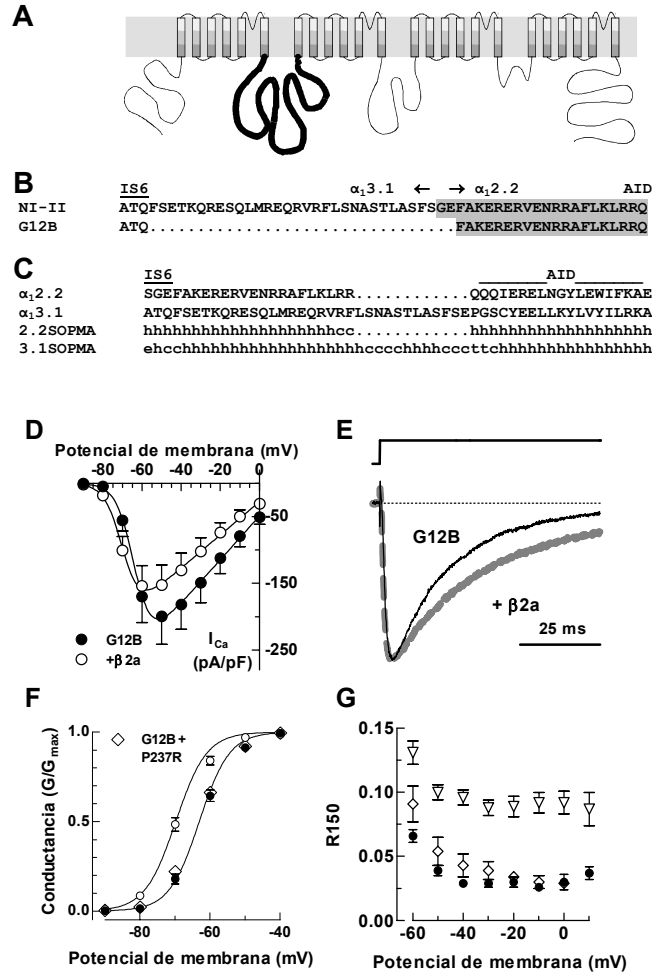


Figura 2. La transferencia del asa I-II de un canal HVA confiere la regulación por las subunidades β a un canal LVA. (A) Esquema que ilustra los cuatro repetidos del $\alpha_1.3.1$ y el asa intracelular I-II transferida del $\alpha_2.2$ (línea gruesa). (B) Secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal del asa I-II, y la localización de las uniones $\alpha_1.3.1-2.2$ en las quimeras NI-II y G12B. Los puntos representan una discontinuidad en el alineamiento. (C) Secuencias de aminoácidos en la misma región de las subunidades $\alpha_1.3.1$ y $\alpha_2.2$. La estructura secundaria predicha se representa con una h para las hélices α ; e para la hoja β ; c para la espiral al azar (*random coil*) y t para el giro beta. (D) Relaciones corriente-voltaje para la quimera G12B registrada en la ausencia (●) o la presencia de $\beta 2a$ (○). Los datos representan el promedio \pm S.E.M. de 12-13 células. (E) Trazos de corrientes normalizadas obtenidas durante la depolarización a -40 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. (F) Gráficas de la corriente normalizada, (G) y del R_{150} que también incluyen los datos de las células transfectadas con G12B + la mutante P237R de $\beta 2a$ (◇, $n = 5$). Resultados similares se obtuvieron cuando se empleó 10 mM Ba^{2+} como acarreador de la carga y estímulos con incrementos de 5 mV entre los potenciales de prueba.

subunidades β no tuvo efecto significativo sobre la densidad de la corriente (e. g., G_{max} para G12B + $\beta 2a$, 24 ± 3 , $n = 21$, $p < 0.15$; Figura 2D). Este resultado es consistente con la hipótesis

de que las subunidades β incrementan la densidad de corriente al enmascarar una señal para retención en el RE, y que tales señales no están funcionando en la quimera.

Tabla 1. Resumen de las propiedades biofísicas del $\alpha_{13.1}$ y de las quimeras y de su regulación por las subunidades β .

	Activación		Inactivación		R_{150}
	V_{50} (mV)	k (mV)	V_{50} (mV)	k (mV)	
$\alpha_{13.1}$	-42.9 ± 0.7	6.2 ± 0.2 (9)	-74.2 ± 0.8	-4.7 ± 0.1 (8)	2.2 ± 0.3 (9)
$\alpha_{13.1} + \beta_{2a}$	-44.1 ± 0.4	6.2 ± 0.1 (4)	-75.4 ± 0.3	-4.6 ± 0.2 (4)	2.4 ± 0.2 (4)
NI-II	-51.4 ± 0.9	4.7 ± 0.1 (9)	-72.2 ± 0.9	-4.1 ± 0.2 (9)	1.1 ± 0.5 (9)
NI-II + β_{2a}	-52.2 ± 0.5	4.6 ± 0.2 (9)	-72.7 ± 0.7	-4.1 ± 0.2 (9)	1.3 ± 0.6 (9)
G12B	-63.1 ± 0.7	4.3 ± 0.1 (12)	-93.1 ± 0.8	-4.0 ± 0.1 (11)	2.9 ± 0.2 (12)
G12B + β_{2a}	$-69.8 \pm 0.8^{**}$	4.4 ± 0.1 (13)	-94.4 ± 0.4	-3.9 ± 0.1 (8)	9.6 ± 0.6 (13)**
G12B-PG6	-62.3 ± 0.9	4.6 ± 0.2 (6)	-95.3 ± 2.4	-3.3 ± 0.3 (5)	0.8 ± 0.3 (6)
G12B-PG6+ β_{2a}	-63.8 ± 0.5	4.4 ± 0.1 (7)	-93.9 ± 0.4	-3.7 ± 0.1 (6)	1.2 ± 0.3 (7)
G12B-PA6	-64.2 ± 0.5	4.4 ± 0.2 (10)	-91.5 ± 0.7	-3.7 ± 0.1 (10)	1.6 ± 0.2 (10)
G12B-PA6+ β_{2a}	$-68.8 \pm 0.7^{**}$	4.7 ± 0.1 (9)	-92.6 ± 0.5	-3.6 ± 0.1 (9)	4.9 ± 0.7 (9)**

Los datos se expresan como el promedio \pm S.E.M. La cantidad de células se muestra entre paréntesis. Los valores de las corrientes residuales normalizadas (R_{150}) corresponden a los datos registrados en la cercanía del pico de la corriente de la curva $I-V$: -20 mV para el $Ca_v3.1$ y -40 mV para las quimeras. El R_{150} se calculó dividiendo la corriente medida después de 150 ms del inicio del pulso despolarizante, por el pico de la corriente observada en ese mismo pulso. Los cambios estadísticamente significativos ($p < 0.01$) inducidos por la subunidad β_{2a} se indican con dos asteriscos.

De mayor importancia para los objetivos de este trabajo, las propiedades biofísicas de la quimera G12B fueron reguladas por las subunidades β . La coexpresión del canal G12B con la subunidad β_{2a} desplazó en 7 mV, en la dirección hiperpolarizante, su dependencia al voltaje de la activación, hizo significativamente más lenta su cinética de inactivación y redujo la magnitud de su inactivación, medida por la corriente residual al final del pulso (R_{150} , cociente de la corriente a los 150 ms con respecto a la corriente máxima; Figura 2D-G, Tabla 1). Un desplazamiento similar en la dependencia al voltaje de la activación fue observado con la subunidad β_{1b} (V_{50} desplazado -5 mV, Tabla 1). Una propiedad que no fue transferida a la quimera fue la habilidad de las subunidades β para desplazar la curva de inactivación en el estado estacionario. Aunque esta no es una propiedad compartida por todas las subunidades β , ya que β_{2a} tiene poco o ningún efecto mientras que el resto de las isoformas desplazan la curva h_{∞} .

del $\alpha_{12.2}$ a potenciales más hiperpolarizados (Pan y Lipscombe, 2000). Como control negativo, el canal G12B se coexpresó con la mutante P237R de la subunidad β_{2a} , la cual ha mostrado interrumpir la regulación de β_{2a} (Chien et al., 1998; De Waard et al., 1994). Las propiedades de los canales registrados en la presencia de la mutante P237R fueron indistinguibles de las registradas de los canales G12B en ausencia de las subunidades β (Figura 2F-G).

Estudios recientes sugieren que el asa I-II puede actuar directamente para obliterar el poro del canal (Kim et al., 2004). De ser así, las subunidades β podrían estar regulando esta interacción. Para evaluar si acaso la región del asa I-II distal al AID está involucrada en la regulación de las subunidades β se construyó la quimera GAIDB. Esta quimera tiene la misma unión $\alpha_{13.1-2.2}$ que presenta G12B (Figura 2B), pero se modificó la unión $\alpha_{12.2-3.1}$ en uno cuantos aminoácidos en seguida del AID (termina en AATKK), por lo cual se elimina la mayor parte del asa I-II del $\alpha_{12.2}$ y se conservó la del $\alpha_{13.1}$ (a partir de RSGQE...). La regulación por β_{2a} de GAIDB fue similar a la observada con la quimera G12B: la subunidad β_{2a} desplazó la dependencia al voltaje de la curva de activación en -6 mV y aumentó la corriente residual 1.8 veces (Tabla 1). En conjunto, estos resultados muestran claramente la transferencia de la regulación por las subunidades β a un canal tipo LVA, indicando la importancia de la región que une el AID al segmento IS6 y sugieren que la región a continuación del AID no participa en esta regulación.

3.3 La estructura del enlace IS6-AID es esencial para la regulación por las subunidades β

La tendencia natural de los aminoácidos para contribuir a la estructura secundaria de las proteínas está perfectamente establecida: en tanto que las alaninas estabilizan las hélices α , las glicinas las interrumpen. Para probar si acaso la región que une el IS6 al AID fuese una hélice α , los seis aminoácidos centrales en la quimera G12B se reemplazaron con seis glicinas sucesivas (G12B-PG6, Figura 3A). Como control, estos mismos aminoácidos fueron mutados con alaninas (G12B-PA6). La zona central de la hélice se eligió para no modificar ni el IS6 ni el AID, conservando al menos 7 aminoácidos de la secuencia original en ambos extremos. El análisis por el algoritmo SOPMA indica que mientras que la hélice en G12B-PG6 se interrumpe, en G12B-PA6 se conserva (Figura 3A). Ambas quimeras generaron fuertes corrientes ($150-200$ pA·pF⁻¹). De forma anticipada, la actividad de la quimera G12B-PG6 no fue regulada por las subunidades β , y éstas no mostraron efectos significativos ni en la curva de activación, ni en la

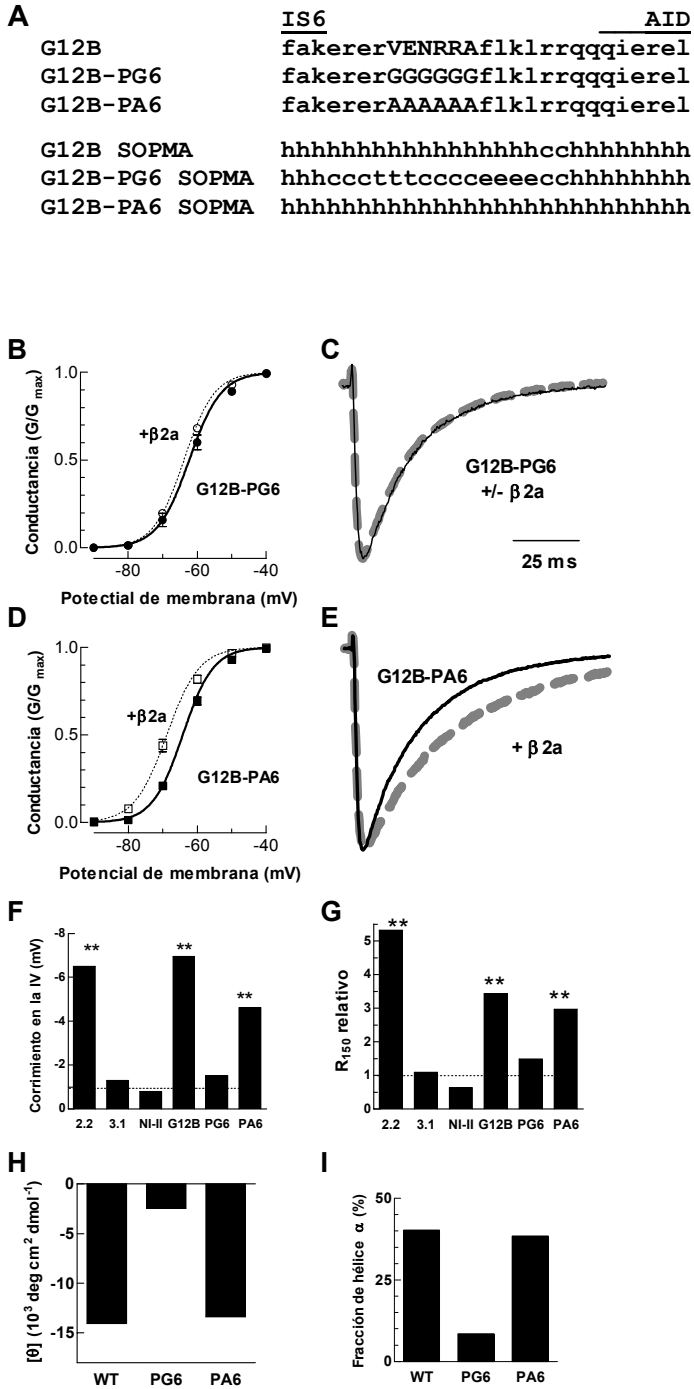


Figura 3. Interrupción de la estructura del enlace que separa el segmento IS6 y el AID. (A) Secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal del asa I-II de las quimeras G12B, G12B-PG6 (poli-glicina) y G12B-PA6 (poli-alanina). Se muestra la predicción de la estructura secundaria (algoritmo SOPMA) usando el mismo código que en la Figura 2. La coexpresión con la subunidad $\beta 2a$ no tuvo efecto alguno sobre la dependencia al voltaje (B) o en la cinética de las corrientes (C) de los canales G12B-PG6 ($n = 6-7$). En contraste, la subunidad $\beta 2a$ desplazó la curva de activación (D) y aumentó la corriente residual (E) de los canales G12B-PA6 ($n = 9-10$). Los datos obtenidos se muestran en la ausencia (símbolos rellenos) o presencia (símbolos vacíos) de $\beta 2a$. Las gráficas de barras resumen la habilidad de la subunidad $\beta 2a$ para desplazar la dependencia de la activación (F) y para aumentar la corriente residual (G). Las corrientes residuales del $\alpha 13.1$ y de las quimeras se midieron a los 150 ms del pulso despolarizante en el pico de la curva $I-V$ ($\alpha 13.1$, -20mV ; quimeras, -40mV), mientras que las del $\alpha 12.2$ se midieron a los 350 ms del pulso despolarizante a $+20\text{mV}$. La escala del tiempo se aplica a los paneles C y E. Los efectos estadísticamente significativos están marcados con asteriscos ($p < 0.01$). (H) La elipticidad media de los aminoácidos a los 222 nm se determinó de los espectros de dicroísmo circular de los péptidos correspondientes al tipo nativo (WT), G12B-PG6 (PG6) y G12B-PA6 (PA6). Los espectros se obtuvieron a 25°C en metanol al 88%. (I) Fracción de hélice α para los tres péptidos calculada de la elipticidad media de los aminoácidos a los 222 nm.

cinética de inactivación o en la corriente residual (Figura 3B-C). En contraste, las subunidades β modularon todas estas propiedades en la quimera G12B-PA6 (Figura 3D-E). La habilidad de β 2a para desplazar la curva $I-V$ y el incremento en el cociente R_{150} de todos los canales nativos y quiméricos se ilustran en la Figura 3F-G (datos en la Tabla 1).

3.4 Estudios por dicroísmo circular

Como prueba adicional, la espectroscopia de dicroísmo circular (DC) se empleó para mostrar que la región entre el segmento IS6 y el AID puede formar una hélice α . El espectro de DC de las proteínas que contienen hélices tienen picos negativos en la región de 210-230 nm, y la fracción helical ($F_{\text{hélice}}$) puede calcularse a partir de los barridos por DC a los 222 nm (Rohl et al., 1996). Los ensayos de DC de los péptidos sintéticos correspondientes a la hélice amino terminal de la ribonucleasa A ha revelado que el plegamiento apropiado depende de muchos factores, incluida la presencia de solventes orgánicos como el metanol y el trifluoroetanol (Brown y Klee, 1971). De forma similar, un efecto del solvente se observó en la estructura de los péptidos de 19 aminoácidos de longitud y que corresponden al enlace entre el segmento IS6 y el AID; los valores de $F_{\text{hélice}}$ presentaron el siguiente orden: metanol > trifluoroetanol > sin solvente, con valores de 42 %, 19 % y 7 %, respectivamente. En las tres condiciones, el péptido con la sustitución de poli-glicina interrumpió la formación de la hélice, mostrando valores de $F_{\text{hélice}}$ de 8.5 %, 3.4 % y 1 %, respectivamente. El péptido con la sustitución de poli-alanina presentó propiedades similares a las del nativo (la comparación de los tres péptidos en metanol se muestra en la Figura 3H-I). Aunque la fracción de hélice del péptido nativo es menor al 100 %, los resultados son parecidos a los obtenidos con péptidos basados en la hélice α de la ribonucleasa T₁ (Myers et al., 1998), y es probable que se deban a restricciones estructurales en los extremos del péptido (Rohl et al., 1992). Se concluye por tanto que el enlace entre el segmento IS6 y el AID es capaz de formar una hélice α , y que las sustituciones de poli-glicina y poli-alanina presentaron las alteraciones de esta estructura en la manera como se predijo.

3.5 Evidencia de que el segmento IS6 está involucrado en la apertura y cierre del canal

Un mecanismo común del *gating* de los canales iónicos involucra la apertura de las paredes del canal en las cercanías al citoplasma (Jiang et al., 2002; Yellen, 2002), lo cual en los canales operados por el voltaje representa el movimiento de sus segmentos S6. Los estudios sobre la

se obtuvieron cuando la unión se desplazó aún más de manera tal que el segmento IS6 ahora incluía seis amino ácidos del $\alpha_12.2$ (GG), en tanto que el moverla unos cuantos aminoácidos más tuvo poco efecto adicional (HIS6). En comparación con el $\alpha_13.1$, estas últimas quimeras mostraron los siguientes cambios en su actividad: una tasa de inactivación más lenta; una inactivación más incompleta (i. e. corrientes residuales mayores); una cinética de activación más lenta en los potenciales cercanos al umbral para la apertura del canal; y una dependencia al voltaje más pronunciada de su activación. Estos resultados revelan una participación importante del segmento IS6 en mediar las transiciones de los canales entre los estados cerrado, abierto e inactivado. La abrupta transición entre los últimos 2-6 aminoácidos en el segmento IS6 indica que esta región es particularmente importante para el *gating* del canal, y al igual que se ha sugerido para los canales $\alpha_11.2$ (Shi y Soldatov, 2002), pudiera estar formando una puerta anular interna como la hallada en los canales de K^+ (Yellen, 2002). Contrario a lo esperado, la inclusión de estas glicinas no aumentó la medida en la que las subunidades β regulan a los canales; la subunidad β_2a desplazó la curva de activación del VG en -5 mV y la del GG en 7 mV, y aumentó el R_{150} del VG 3.3 veces y el del GG 1.4 veces ($p < 0.01$ en todos los casos). Estos resultados indican que el extremo carboxilo del segmento IS6, distal al motivo conservado GS, se mueve como una estructura rígida tanto en los canales tipo HVA como en los tipo LVA, de forma análoga a lo observado previamente en los canales de K^+ (Jiang et al., 2002; Jin et al., 2002; Sompornpisut et al., 2001).

3.6 Conclusiones

Se ha mostrado que la transferencia de una fracción del asa I-II de un canal de calcio de alto umbral (desde el final del IS6 hasta justo después del final del AID) es suficiente para conferir aspectos de la regulación por las subunidades β en un canal de bajo umbral. La falta de esta regulación en la quimera que retuvo una porción del asa I-II de los canales tipo LVA fue particularmente informativa, permitiendo el explorar la naturaleza del enlace que separa el segmento IS6 del sitio de unión de las subunidades β . La sustitución por seis glicinas sucesivas eliminó la regulación por las subunidades β . Este efecto no fue causado por una pérdida de secuencia específica, ya que la sustitución en las mismas posiciones por seis alaninas, que mantendría una estructura de hélice, también retuvo la regulación por las subunidades β . Los

estudios de la función del segmento IS6 han mostrado que éste tiene un papel primordial en la transición entre los estados de los canales. Se concluye entonces que uno de los mecanismos por los cuales las subunidades β regulan la activación y la cinética de los canales de calcio tipo HVA es por la alteración en la movilidad del segmento IS6, y que este efecto está mediado por un acople directo entre el segmento IS6 y el AID a través de una estructura rígida (Hering, 2002). La habilidad de las subunidades β para extender el grado de inactivación no fue transferida en estas quimeras LVA-HVA, indicando que existen mecanismos adicionales de regulación.

BIBLIOGRAFÍA

- Berridge, M. J., Bootman, M. D., Lipp, P. (1998). Calcium - A life and death signal. **Nature** 395, 645-648.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca²⁺ channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the β subunit. **Neuron** 25, 177-190.
- Brown, J. E., Klee, W. A. (1971). Helix-coil transition of the isolated amino terminus of ribonuclease. **Biochemistry** 10, 470-476.
- Canti, C., Davies, A., Berrow, N. S., Butcher, A. J., Page, K. M., Dolphin, A. C. (2001). Evidence for two concentration-dependent processes for β -subunit effects on α_1B calcium channels. **Biophysical Journal** 81, 1439-1451.
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 16, 521-555.
- Chen, Y.-H., Li, M.-H., Zhang, Y., He, L.-L. H., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., Shen, Y., Zhang, H., Tong, L., Yang, J. (2004). Structural basis of the α_1 - β subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Nature** 429, 675-680.
- Chien, A. J., Gao, T., Perez-Reyes, E., Hosey, M. M. (1998). Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the β_{2a} subunit. **Journal of Biological Chemistry** 273, 23590-23597.
- Cornet, V., Bichet, D., Sandoz, G., Marty, I., Brocard, J., Bourinet, E., Mori, Y., Villaz, M., De Waard, M. (2002). Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. **European Journal of Neuroscience** 16, 883-895.
- De Waard, M., Pragnell, M., Campbell, K. P. (1994). Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. **Neuron** 13, 495-503.
- De Waard, M., Scott, V. E. S., Pragnell, M., Campbell, K. P. (1996). Identification of critical amino acids involved in α_1 - β interaction in voltage-dependent Ca²⁺ channels. **FEBS Letters** 380, 272-276.
- Dubel, S. J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E., Nargeot, J. (2004). Plasma membrane expression of T-type calcium channel α_1 subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. **Journal of Biological Chemistry** 279, 29263-29269.
- Geib, S., Sandoz, G., Mabrouk, K., Matavel, A., Marchot, P., Hoshi, T., Villaz, M., Ronjat, M., Miquelis, R., Lévêque, C., De Waard, M. (2002). Use of a purified and functional recombinant calcium-channel β_4 subunit in surface-plasmon resonance studies. **Biochemical Journal** 364, 285-292.

- Geourjon, C., Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **Computer Applications in the Biosciences** 11, 681-684.
- Gerster, U., Neuhuber, B., Groschner, K., Striessnig, J., Flucher, B. E. (1999). Current modulation and membrane targeting of the calcium channel α_1C subunit are independent functions of the β subunit. **Journal of Physiology (London)** 517, 353-368.
- Gómora, J. C., Murbartián, J., Arias, J. M., Lee, J.-H., Perez-Reyes, E. (2002). Cloning and expression of the human T-type channel $\text{Ca}_v3.3$: insights into prepulse facilitation. **Biophysical Journal** 83, 229-241.
- Hering, S. (2002). β -subunits: fine tuning of Ca^{2+} channel block. **Trends in Pharmacological Sciences** 23, 509-513.
- Horton, R. M., Ho, S. N., Pullen, J. K., Hunt, H. D., Cai, Z., Pease, L. R. (1993). Gene splicing by overlap extension. **Methods in Enzymology** 217, 270-279.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., MacKinnon, R. (2002). The open pore conformation of potassium channels. **Nature** 417, 523-526.
- Jin, T., Peng, L., Mirshahi, T., Rohacs, T., Chan, K. W., Sánchez, R., Logothetis, D. E. (2002). The $\beta\gamma$ subunits of G proteins gate a K^+ channel by pivoted bending of a transmembrane segment. **Molecular Cell** 10, 469-481.
- Kim, J., Ghosh, S., Nunziato, D. A., Pitt, G. S. (2004). Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Neuron** 41, 745-754.
- Krittanai, C., Johnson Jr., W. C. (2000). The relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. **Proteins** 39, 132-141.
- Lambert, R. C., Maulet, Y., Mouton, J., Beattie, R., Volsen, S., De Waard, M., Feltz, A. (1997). T-type Ca^{2+} current properties are not modified by Ca^{2+} channel β subunit depletion in nodosus ganglion neurons. **Journal of Neuroscience** 17, 6621-6628.
- Lee, J.-H., Gómora, J. C., Cribbs, L. L., Perez-Reyes, E. (1999). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block α_1H . **Biophysical Journal** 77, 3034-3042.
- Myers, J. K., Pace, C. N., Scholtz, J. M. (1998). Trifluoroethanol effects on helix propensity and electrostatic interactions in the helical peptide from ribonuclease T1. **Protein Science** 7, 383-388.
- Opatowsky, Y., Chen, C.-C., Campbell, K. P., Hirsch, J. A. (2004). Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel β subunit functional core and its complex with the α_1 interaction domain. **Neuron** 42, 387-399.

- Pace, C. N., Scholtz, J. M., Myers, J. K. (1997). Helix propensities are identical in proteins and peptides. **Biochemistry** 36, 10923-10929.
- Pan, J. Q., Lipscombe, D. (2000). Alternative splicing in the cytoplasmic II-III loop of the N-type Ca channel alpha 1B subunit: functional differences are β subunit-specific. **Journal of Neuroscience** 20, 4769-4775.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., Lee, J.-H. (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. **Nature** 391, 896-900.
- Perez-Reyes, E., Schneider, T. (1994). Calcium channels: structure, function, and classification. **Drug Development Research** 33, 295-318.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., Campbell, K. P. (1994). Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit. **Nature** 368, 67-70.
- Restituito, S., Cens, T., Rousset, M., Charnet, P. (2001). Ca^{2+} channel inactivation heterogeneity reveals physiological unbinding of auxiliary β subunits. **Biophysical Journal** 81, 89-96.
- Rohl, C. A., Chakrabarty, A., Baldwin, R. L. (1996). Helix propagation and N-cap propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides in 40 volume percent trifluoroethanol. **Protein Science** 5, 2623-2637.
- Rohl, C. A., Scholtz, J. M., York, E. J., Stewart, J. M., Baldwin, R. L. (1992). Kinetics of amide proton exchange in helical peptides of varying chain lengths. Interpretation by the Lifson-Roig equation. **Biochemistry** 31, 1263-1269.
- Shi, C., Soldatov, N. M. (2002). Molecular determinants of voltage-dependent slow inactivation of the Ca^{2+} channel. **Journal of Biological Chemistry** 277, 6813-6821.
- Sompornpisut, P., Liu, Y.-S., Perozo, E. (2001). Calculation of rigid-body conformational changes using restraint-driven cartesian transformations. **Biophysical Journal** 81, 2530-2546.
- Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E., Birnbaumer, L. (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. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)** 94, 1703-1708.
- Van Petegam, F., Clark, K. A., Chatelain, F. C., Minor Jr., D. L. (2004). Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel β -subunit and an α -subunit domain. **Nature** 429, 671-675.
- Wakamori, M., Mikala, G., Mori, Y. (1999). Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type Ca^{2+} channel current in *Xenopus* oocytes. **Journal of Physiology (London)** 517, 659-672.

Yamaguchi, H., Hara, M., Strobeck, M., Fukasawa, K., Schwartz, A., Varadi, G. (1998). Multiple modulation pathways of calcium channel activity by a β subunit. Direct evidence of β subunit participation in membrane trafficking of the α_1C subunit. **Journal of Biological Chemistry** 273, 19348-19356.

Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. **Nature** 419, 35-42.

APÉNDICE

Transfer of β subunit regulation from high to low voltage-gated Ca^{2+} channels

Juan Manuel Arias^{a,1,2}, Janet Murbartían^{a,1}, Iuliia Vitko^a, Jung-Ha Lee^{a,b}, Edward Perez-Reyes^{a,*}

^a Department of Pharmacology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908, USA

^b Department of Life Science, Sogang University, Shinsu-dong, Seoul 121-742, Korea

Received 22 March 2005; revised 1 June 2005; accepted 8 June 2005

Available online 20 June 2005

Edited by Maurice Montal

Abstract High voltage-activated Ca^{2+} channel expression and gating is controlled by their β subunits. Although the sites of interaction are known at the atomic level, how β modulates gating remains to be determined. Using a chimeric approach, β subunit regulation was conferred to a low voltage-activated channel. Regulation was dependent on a rigid linker connecting the α_1 interaction domain to IS6. Chimeric channels also revealed a role for IS6 in channel gating. Taken together, these results support a direct coupling model where β subunits alter movements in IS6 that occur as the channel transits between closed, open, and inactivated states.

© 2005 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Keywords: Calcium channels; N-type; T-type; Ion channel gating; Structure–activity relationship

1. Introduction

Calcium influx via voltage-gated calcium channels acts as an intracellular messenger that controls a variety of processes ranging from how we think to how our muscles contract [1]. Therefore the activity of these channels is tightly regulated by auxiliary subunits, G proteins, protein kinases, and calmodulin [2]. High voltage-activated (HVA) Ca^{2+} channels are multi-subunit complexes containing the main pore-forming subunit α_1 , and the auxiliary subunits $\alpha_2\delta$ ($\text{Ca}_v\alpha_2\delta$), β ($\text{Ca}_v\beta$), and sometimes $\gamma 1$ ($\text{Ca}_v\gamma 1$). The β subunits control the voltage dependence of activation, inactivation, probability of opening, pharmacology, and expression at the cell surface [3–5]. These β subunits bind to a sequence motif, the α interaction domain (AID), located in the intracellular loop that connects Repeats I and II [6]. Mutations in the AID that destabilized β binding to $\alpha_1 2.1$ also reduced its ability to increase channel expression and regulate channel properties [6], leading to the hypothesis that binding to the AID mediates all forms of β -subunit regulation. Subsequent studies have been able to separate these two effects [7–11]. Using fusion proteins

containing the AID sequence, the affinity of this interaction was estimated at 6–10 nM by two independent methods [12,13]. The interaction is reversible, allowing a single β protein to chaperone many α_1 subunits to the plasma membrane [10,11]. Recently the structure of β subunits were solved in the presence of AID peptides [14–16]. Critical α_1 residues [12] were found to bind in a hydrophobic pocket within β . Notably, the AID peptides used in these studies did not include the linker separating the AID from IS6. Despite the detailed understanding of α_1 – β interactions, the mechanism by which β subunits alter channel gating is not known. To address this question, we exploited the fact that the α_1 subunits of low voltage-activated channels ($\alpha_1 3.1$) are not regulated by β subunits to make gain-of-function chimeras. Here we show that β subunits are directly coupled to the last transmembrane segment of repeat I (IS6). Since replacement of IS6 profoundly effects channel gating, we conclude that β subunits modulate HVA channels by altering the mobility of their IS6 segment.

2. Methods

2.1. Construction of chimeric calcium channels

Chimeras were engineered using the overlapping extension PCR method [17] using 0.5 U KOD1 DNA polymerase (Novagen, Madison, WI). Two step cycle conditions were applied according to the manufacturer's protocol. The final PCR product was cloned into the pCR4 vector using the Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Full length chimeric constructs were made by subcloning fragments from pCR4 into a rat brain $\alpha_1 3.1$ cDNA contained in pcDNA3 [18]. Poly-Ala (PA6) and poly-Gly (PG6) substitutions in the I II linker of the G12B chimera were introduced by the Quikchange[®] protocol (Stratagene, La Jolla, CA) employing 1 U of *Pfu* DNA polymerase. All chimeric clones were sequenced in the region that was used for the mutagenesis reactions.

2.2. Electrophysiological recordings and data analysis

Methods for recording and analyzing whole cell currents have been described previously [19]. Human embryonic kidney cells (293; American Type Culture Collection, Manassas, VA) were transiently transfected with either rat $\alpha_1 3.1$, rat brain $\alpha_1 2.2$, or chimeric cDNA, in the absence and presence of rat $\beta 1b$, $\beta 2a$, $\beta 3$, or $\beta 4$ [3] all cloned into pcDNA3 (Invitrogen). Positive cells were identified by co-transfection of a cDNA encoding the green fluorescent protein (pGreen Lantern, Invitrogen). The external solution contained (in mM): 5 CaCl_2 (or 10 BaCl_2 for $\alpha_1 2.2$), 166 tetraethyl ammonium (TEA) chloride, and 10 HEPES, pH adjusted to 7.4 with TEA-OH. Initial studies of the NI II chimera were performed using the oocyte expression system using 10 mM Ba^{2+} as charge carrier and methods described previously [20]. The internal pipette solution contained (in mM): 125 CsCl, 10 EGTA, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 4 Mg-ATP, 0.3 Na_2GTP , and 10 HEPES, pH

*Corresponding author. Fax: +1 434 982 4440.

E-mail address: eperez@virginia.edu (E. Perez-Reyes).

¹ Authors contributed equally to this work.

² Present address: Department of Physiology and Biophysics, Dalhousie University, Halifax, Canada NS B3H 1X5.

adjusted to 7.2 with CsOH. Access resistance in the whole cell configuration averaged 4.4 M Ω . Data from cells where the access resistance exceeded 7.5 M Ω were discarded. Series resistance was compensated between protocols to 70% (prediction and correction; lag, 10 μ s), resulting in maximal residual voltage error below 1.6 mV during measurement of the current-voltage relationship. The voltage-dependence of activation was calculated by fitting the $I-V$ data from each cell with the following equation: $I = G_{\max} * (V_m - V_{\text{rev}}) / (1 + \exp((V_{50} - V_m)/k))$, where I is the peak current at each test potential, G_{\max} is the maximal conductance, V_m is the test potential, V_{rev} is the apparent reversal potential, V_{50} is the mid-point of activation, and k is the slope factor. Conductance (G) was calculated using a modified form of Ohm's law ($G = I/(V_m - V_{\text{rev}})$). Current density was calculated using the peak current divided by the cell capacitance. Average cell capacitance was 11.6 pF.

Circular dichroism spectroscopy. Peptides corresponding to the first 19 amino acids from either α_1 2.2 I II (GEFAKERERVENR-RAFLKL), PA6 (GEFAKERERAAAAAFLKL) or PG6 (GEFAKERERGGGGGGFLKL) were synthesized at the University of Virginia Biomolecular Research Facility. The identity and purity of the peptides were confirmed by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Peptides were dissolved at 1 mg/ml in 88% methanol and 1.2 mM potassium phosphate buffer pH 6.9 [21]. CD data were also collected using peptides dissolved in either in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.9 alone, or in the additional presence of 15 mM 2,2,2-trifluoroethanol. CD spectra were obtained on an AVIV model 215 spectropolarimeter (Aviv Biomedical, Lakewood, NJ). Three scans were recorded at 25 $^{\circ}$ C and 1 nm resolution, then averaged. The CD signals (millidegrees; θ) were corrected by subtracting the blank signal of cuvette plus buffer. Mean residue ellipticity ($[\theta]$) and fractional helix content were calculated as described previously [22,23].

3. Results and discussion

3.1. β subunits do not modulate the biophysical properties of T-type channels

Calcium channel β subunits ($\text{Ca}_v\beta$) bind to an 18 amino acid domain on the α_1 subunit (AID) that is located on the intracellular loop connecting repeats I and II [6]. The AID sequence in α_1 -subunits is well conserved across both families of HVA Ca^{2+} channels (Ca_v1 and Ca_v2), but poorly conserved in LVA channels (Ca_v3). Notably missing from the α_1 subunits of Ca_v3 channels are 2 of the 5 key residues (Fig. 1A) that make contact with the β -subunit [14–16]. Evidence that native Ca_v3 channels are not regulated by β -subunits was provided by antisense knockdown experiments, which showed that depletion of β -subunits altered HVA currents with no effect on LVA currents [24]. To test whether recombinant α_1 3.1 channels could be regulated we coexpressed it with each of the four β -subunits. Expression of α_1 3.1 alone led to the induction of robust currents with all of the typical properties of low voltage-activated T-type currents [18]. Coexpression with any of the β subunits had no significant effect on α_1 3.1 channel expression, voltage dependence, or kinetics (only results with β_2 are shown in Fig. 1B and C). In contrast, β_2 subunits stimulated α_1 2.2 currents over 4-fold, shifted its voltage-dependence of activation, and slowed current inactivation (Fig. 1D and E). Similar effects of β on α_1 2.2 gating were reported previously in the oocyte expression system [5]. These results demonstrate the efficacy of 293 cells for expression and detection of β -subunit effects, and confirm that β -subunits do not affect the gating of α_1 3.1 channels [25]. Therefore we hypothesized that introducing the HVA AID sequence into an LVA channel might confer β -subunit regulation.

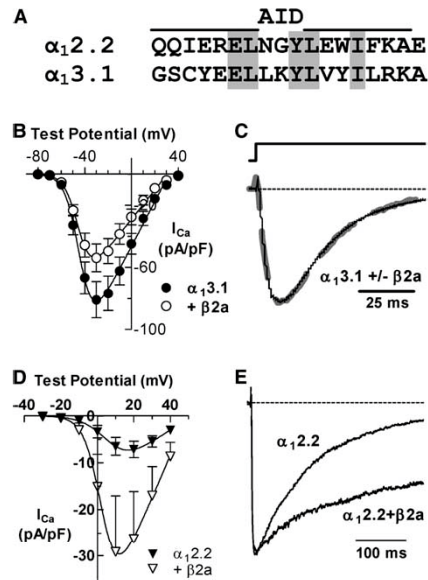


Fig. 1. β -Subunits only regulate HVA Ca^{2+} channels. (A) Alignment of the AID sequence from α_1 2.2 with the homologous region in α_1 3.1. Identical residues in both sequences are highlighted in grey. The central region contains residues that form important contacts with the β -subunit (L-GY WI). Although these residues are conserved in all HVA α_1 -subunits, they are not conserved in LVA subunits. (B,C) Coexpression of β_2 with α_1 3.1 had no significant effect on the density of currents or kinetics. (D,E) Coexpression of β_2 with α_1 2.2 increases current density and slows inactivation kinetics. Smooth curves represent fits to the average $I-V$ data using the equation given in Section 2. Data represent the mean \pm the standard error to the mean (S.E.M.), where the number of cells studied is given in Table 1. All figures use the same symbol scheme where α_1 alone is represented by solid symbols and $\alpha_1 + \beta_2$ by filled symbols. Representative current traces are shown in the absence and presence of β_2 (dotted grey line). The voltage protocol included a depolarizing step to either -40 (C) or $+20$ (E) from a holding potential of -100 mV. Data were scaled to the maximum.

3.2. Transfer of β regulation

The first chimera was produced (NI-II) using polymerase chain reaction to amplify α_1 2.2 DNA encoding the first 111 amino acids of the I-II loop, and subcloned into α_1 3.1 using *Hind*III and *Bsp*EI restriction enzyme sites (Fig. 2A). This resulted in a chimera that retained the first 32 and last 7 amino acids of the α_1 3.1 I-II loop (Fig. 2B). Neither the voltage dependence of activation nor the kinetics of the NI-II chimera were affected by β_2 (Table 1). This result indicates that simple addition of an AID containing loop does not necessarily confer β -subunit regulation to an LVA channel. The secondary structure predicted by the SOPMA algorithm [26] correctly identifies the AID as an α -helix [14,16], and also predicts an α -helix for most of the linker connecting the AID to IS6 (Fig. 2C). Notably, the amino acid sequence of this linker is more highly conserved across the three Ca_v2 α_1 -subunits in human, rat, and mouse, than is the AID sequence (only 1 substitution vs 4, respectively). In contrast, the extra linker sequence in α_1 3.1 that precedes the homologous AID sequence is predicted to also include two random coil segments, and this linker was retained in the NI-II chimera.

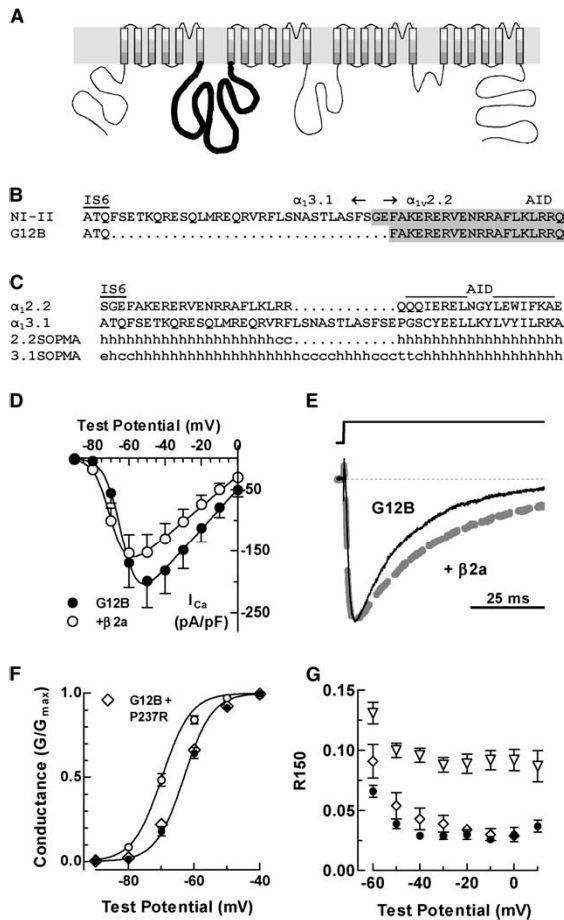


Fig. 2. Transfer of the I-II loop from an HVA channel confers β -subunit regulation onto an LVA channel. (A) Schematic diagram illustrating the four repeats of $\alpha_1.3.1$, and the cytoplasmic I-II loop transferred from $\alpha_1.2.2$ (thick line). (B) Amino acid sequence of the amino terminal side of the I-II loop, and the location of the $\alpha_1.3.1$ - $\alpha_1.2.2$ junctions in the chimeras NI-II and G12B. Periods represent a gap in the alignment. (C) The amino acid sequence of the same region of $\alpha_1.2.2$ and $\alpha_1.3.1$ α_1 -subunits. Predicted secondary structure is represented by h for α -helix; e for β sheet; c for random coil, and t for turn. (D) Current-voltage relationships for the G12B chimera recorded in the absence (●) or presence of β_2a (○). Data represent mean \pm S.E.M. from 12–13 cells. (E) Normalized current traces obtained during step depolarizations to -40 from a holding potential of -100 mV. (F) Plots of the normalized conductance, and (G) R_{150} also include data obtained from cells transfected with G12B+ the P237R mutant of β_2a (diamonds, $n = 5$). Similar β_2a regulation of G12B was observed using 10 mM Ba^{2+} as charge carrier and 5 mV steps between test potentials.

Might these coiled regions disrupted the ability of β -subunits to regulate channel activity? To address this question we created a chimera (G12B) where the I-II linker of $\alpha_1.2.2$ was directly fused to the IS6 segment of $\alpha_1.3.1$ (Fig. 2B). Counterintuitively, introduction of HVA sequences into an LVA channel created a channel that gated at even lower voltages; both the $I-V$ and h_{∞} curves were shifted -20 mV (Table 1). This shift in LVA gating suggests that the I-II loop plays a role in determining the voltage dependence of LVA

channels. A second unexpected result was that the currents from the chimera were greater than wild-type (G_{max} $\alpha_1.3.1$, 15 ± 2 , $n = 10$; G12B, 33 ± 6 , $n = 15$, $P < 0.05$). The I-II loop of HVA channels has been shown to contain ER retention signals [27], so the chimera might have had reduced expression. The finding of increased currents is more consistent with the hypothesis that other intracellular loops of the HVA channel participate in the formation of the ER retention signal [28]. The result is also consistent with the disruption of an ER retention signal in LVA channels. Coexpression of G12B with any of the β subunits had no significant effect on current density (e.g., G_{max} for G12B + β_2a , 24 ± 3 , $n = 21$, $P = 0.15$; Fig. 2D). This result is consistent with the hypothesis that β -subunits increase current density by masking an ER retention signal, and that such signals are not functioning in the chimera.

More important to the goals of the present study, the biophysical properties of the G12B chimera were regulated by β -subunits. Coexpression with β_2a shifted the voltage-dependence of activation of G12B by 7 mV in the hyperpolarizing direction, significantly slowed channel inactivation, and decreased the extent of inactivation as measured by the residual current (R_{150}) at the end of the pulse (Fig. 2D–G, Table 1). A similar shift in the voltage dependence of activation was observed with β_1b (V_{50} shifted -5 mV, Table 1). One property that was not transferred to the chimera was the ability of β -subunits to shift steady-state inactivation (Table 1). Of note, this is not a property shared by all the β subunits, as β_2a has little or no effect, while other β isoforms shift the h_{∞} curve of $\alpha_1.2.2$ to hyperpolarized potentials [29]. As a negative control, we coexpressed G12B with the β_2a mutant P237R, which has been shown to disrupt β_2a regulation [4,30]. Channel properties recorded in the presence of the P237R mutant were indistinguishable from that recorded from G12B alone (Fig. 2F and G).

Recent studies suggest that the I-II linker might act directly to plug the channel pore [31]. If so, β -subunits might regulate this interaction. To test whether the I-II linker that is distal to the AID was involved in β regulation, we constructed the chimera GAIDB. This chimera had the same $\alpha_1.3.1$ - $\alpha_1.2.2$ junction as G12B (Fig. 2B), but moved the $\alpha_1.2.2$ - $\alpha_1.3.1$ junction to just after the AID (ends at AATKK), thereby deleting most of the $\alpha_1.2.2$ linker, but retaining the rest of $\alpha_1.3.1$ linker (from RSGQE on). β_2a regulation of GAIDB was similar to that observed with the G12B chimera: β_2a shifted the voltage dependence of activation -6 mV and increased the residual current 1.8-fold (Table 1). Taken together, these results clearly demonstrate the transfer of β -subunit regulation to an LVA channel, indicate the importance of the linker connecting the AID to IS6, and suggest that the post-AID linker is not involved in β regulation.

3.3. Structure of the IS6-AID linker is essential for β -subunit regulation

The propensity of amino acids to contribute to secondary structures is well established: α -helices are stabilized by alanines, but disrupted by glycines. To test whether the linker joining IS6 to the AID was an α -helix, we replaced the central region of this linker in the G12B chimera with 6 consecutive glycines (G12B-PG6, Fig. 3A). As a control, these same 6 residues were also replaced with alanine (G12B-PA6). The central part of the helix was chosen so as not to disrupt either IS6 or

Table 1
Summary of biophysical properties of α_1 3.1 and chimeras and their regulation by β subunits

	Activation		Inactivation		R_{150} (%)
	V_{50} (mV)	k (mV)	V_{50} (mV)	k (mV)	
α_1 3.1	-42.9 ± 0.7	6.2 ± 0.2 (9)	-74.2 ± 0.8	-4.7 ± 0.1 (8)	2.2 ± 0.3 (9)
α_1 3.1 + β 2a	-44.1 ± 0.4	6.2 ± 0.1 (4)	-75.4 ± 0.3	-4.6 ± 0.2 (4)	2.4 ± 0.2 (4)
NI II	-51.4 ± 0.9	4.7 ± 0.1 (9)	-72.2 ± 0.9	-4.1 ± 0.2 (9)	1.1 ± 0.5 (9)
NI II + β 2a	-52.2 ± 0.5	4.6 ± 0.2 (9)	-72.7 ± 0.7	-4.1 ± 0.2 (9)	1.3 ± 0.6 (9)
G12B	-63.1 ± 0.7	4.3 ± 0.1 (12)	-93.1 ± 0.8	-4.0 ± 0.1 (11)	2.9 ± 0.2 (12)
G12B + β 2a	$-69.8 \pm 0.8^{**}$	4.4 ± 0.1 (13)	-94.4 ± 0.4	-3.9 ± 0.1 (8)	9.6 ± 0.6 (13)**
G12B + β 1b	$-67.8 \pm 0.9^*$	4.7 ± 0.2 (8)	-93.4 ± 1.2	-3.9 ± 0.1 (6)	8.0 ± 0.9 (8)**
GAIDB	-63.8 ± 0.6	4.8 ± 0.1 (12)	-96.4 ± 1.4	-3.8 ± 0.1 (5)	3.7 ± 0.5 (13)
GAIDB + β 2a	$-70.2 \pm 1.0^{**}$	4.9 ± 0.1 (16)	-96.4 ± 2.2	-3.5 ± 0.1 (4)	6.8 ± 0.8 (16)**
G12B-PG6	-62.3 ± 0.9	4.6 ± 0.2 (6)	-95.3 ± 2.4	-3.3 ± 0.3 (5)	0.8 ± 0.3 (6)
G12B-PG6 + β 2a	-63.8 ± 0.5	4.4 ± 0.1 (7)	-93.9 ± 0.4	-3.7 ± 0.1 (6)	1.2 ± 0.3 (7)
G12B-PA6	-64.2 ± 0.5	4.4 ± 0.2 (10)	-91.5 ± 0.7	-3.7 ± 0.1 (10)	1.6 ± 0.2 (10)
G12B-PA6 + β 2a	$-68.8 \pm 0.7^{**}$	4.7 ± 0.1 (9)	-92.6 ± 0.5	-3.6 ± 0.1 (9)	4.9 ± 0.7 (9)**

Data are expressed as mean values \pm S.E.M. Numbers of cells are shown in parentheses. Values of the normalized residual current (R_{150}) correspond to data recorded near the peak of the IV: -20 mV $\text{Ca}_v3.1$, and -40 mV for the chimeras. R_{150} was calculated by dividing the current measured after 150 ms of depolarization by the peak current observed during that pulse. Statistically significant changes ($P < 0.01$) induced by β 2a subunits are indicated with a double asterisk.

the AID, keeping at least 7 amino acid residues on either side. SOPMA analysis indicates that the α -helix would be disrupted in G12B-PG6 and maintained in G12B-PA6 (Fig. 3A). Both chimeras expressed robust currents (150–200 pA/pF). As predicted, the channel activity of the PG6 chimera was not regulated by β -subunits; they had no significant effect on either the activation curve or on inactivation kinetics or R_{150} (Fig. 3B and C). In contrast, β -subunits modulated these properties in the PA6 chimera (Fig. 3D and E). The ability of β 2a to shift the IV and increase R_{150} of all wild-type and chimeric channels are illustrated in Fig. 3F and G (data in Table 1).

3.4. Circular dichroism studies

As a further test, we used circular dichroism (CD) spectroscopy to show that the IS6-AID linker can form an α -helix. The CD spectra of proteins containing helices show negative peaks in the 210–230 nm region, and the fractional helix content of a peptide, F_{helix} , can be calculated from the CD signal at 222 nm [23]. CD studies of synthetic peptides corresponding to the N-terminal helix of ribonuclease A have demonstrated that proper folding depended on many factors including the presence of organic solvents such as methanol or trifluoroethanol [32]. We observed a similar effect of solvent on the structure of a 19 amino acid long peptide corresponding to the linker between IS6 and the AID: values of F_{helix} followed the rank order of methanol > trifluoroethanol > buffer alone with values of 42%, 19%, and 7%, respectively. In all three conditions, peptide corresponding to the poly-glycine substitution disrupted helix formation, displaying F_{helix} values of 8.5%, 3.4%, and 1%, respectively. Peptide corresponding to the poly-alanine substitution displayed similar properties as the wild-type (comparison of the 3 peptides in methanol is shown in Fig. 3H and I). Although the helical content of the wild-type peptide was less than 100%, the results are similar to those obtained with peptides based on the α -helix of ribonuclease T₁ [33], and is likely due to fraying of the helix at the ends of the peptide [34]. We conclude that the IS6-AID linker is capable of forming an α -helix, and that the poly-glycine and poly-alanine substitutions modified this structure as predicted.

3.5. Evidence that IS6 is involved in channel gating

A common gating mechanism of ion channels involves opening of the channel walls near the cytoplasm [35,36], which in voltage-gated channels represents movements of their S6 segments. Studies on the regulation of K^+ channels by G protein $\beta\gamma$ -subunits revealed the importance of a glycine hinge in the middle of the analogous pore-lining segment [37]. All voltage-gated Ca^{2+} channel α_1 -subunits contain a glycine in the analogous position (first G in Fig. 4A), while all HVA channels contain two additional glycine residues that are not conserved in LVA channels. To test the importance of these non-conserved glycine residues to β -subunit regulation we created chimeras similar to G12B but that included greater contributions from the α_1 2.2 IS6 sequence (Fig. 4A). Shifting the junction two residues into the cytoplasmic end of IS6 (VG) had little effect on channel activity when compared to G12B, although both chimeras inactivated slower than α_1 3.1 (Fig. 4B and C). Quite dramatic effects on channel activity were observed when the junction was moved further so that IS6 now included six α_1 2.2 residues (GG), while shifting the junction further had little additional effect (HIS6). In comparison to α_1 3.1, these chimeras showed the following changes in activity: slower rate of inactivation; less complete inactivation (i.e., greater persistent current); slower activation kinetics during test pulses close to the threshold for channel opening; and steeper voltage dependence of activation. These results demonstrate an important role of IS6 in mediating transitions between closed, open, and inactivated channels. The sharp transition between the last 2–6 residues in IS6 indicates that this region is particularly important for channel gating, and as suggested for α_1 1.2 channels [38], may form an inner gating ring as found in K^+ channels [36]. Contrary to expectations, inclusion of these glycine residues did not increase the extent of β -subunit regulation; β 2a shifted activation of VG by -5 mV and of GG by 7 mV, and increased R_{150} of VG by 3.3-fold and of GG by 1.4-fold ($P < 0.01$ for all). These results suggest that the lower half of IS6 below the conserved GS motif moves as a rigid body for both LVA and HVA channels as observed previously in K^+ channels [35,37,39].

3.6. Summary

We have shown that transfer of part of an HVA channel I–II linker (from end of IS6 to just after the AID motif) is sufficient to confer aspects of β -subunit regulation onto an LVA channel. The lack of regulation in a chimera that retained a piece of the LVA I–II loop was informative, leading us to explore the nature of the linker separating IS6 from the β -binding site. Substitution of six consecutive glycines abolished β -subunit regulation. This effect was not due to loss of specific sequences as substitution with six alanines that would maintain an α -helix also maintained β -subunit regulation. Studies on the role of IS6 demonstrated that this transmembrane segment plays a

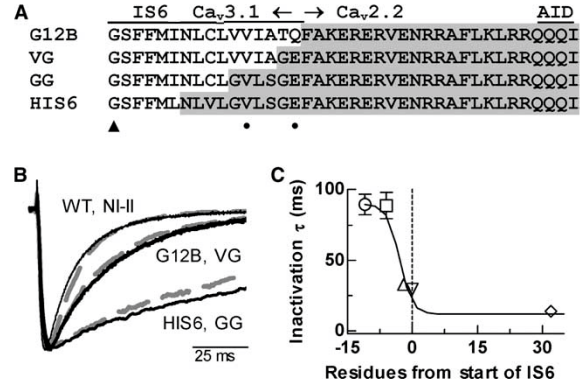
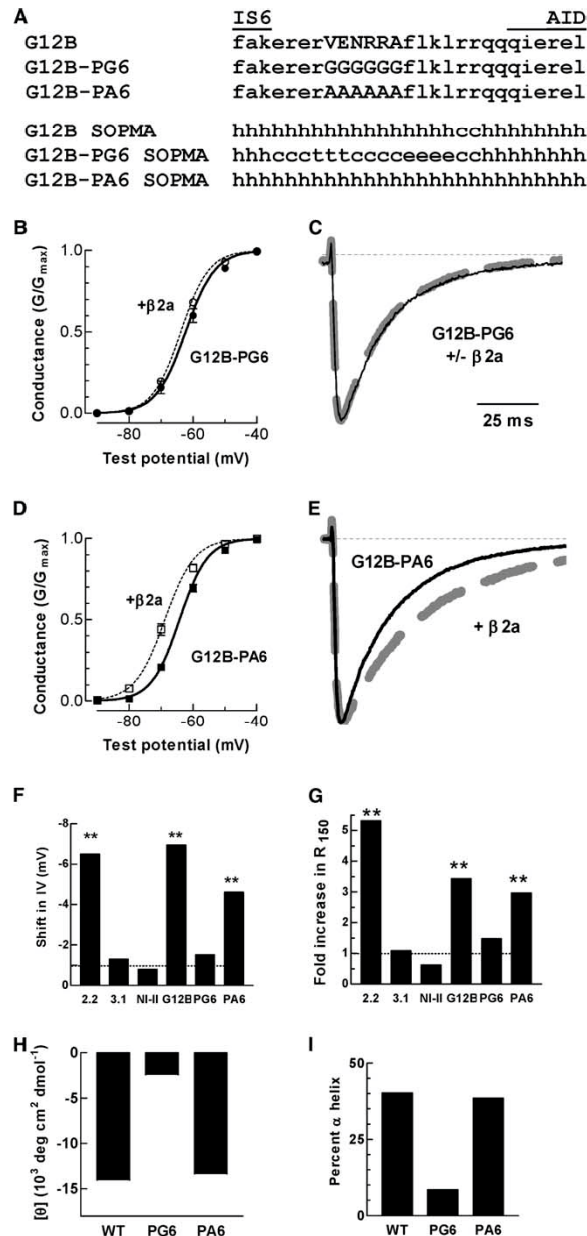


Fig. 4. The role of IS6 in channel gating. (A) Amino acid sequence of the IS6 chimeras where the region corresponding to $\alpha_1.2.2$ is shaded. The glycine residue that occurs in the middle of the IS6 segment is marked with a triangle, while the replaced glycine residues are marked with asterisks. The other end of the chimeric region remained constant, and was the same as for G12B (see Section 2). (B) Representative traces recorded during steps to -20 mV for $\alpha_1.3.1$ (solid line), NI II (dashed line overlapping $\alpha_1.3.1$), VG (solid line), G12B (dashed line overlapping VG), GG (solid line), and HIS6 (dashed line overlapping GG). (C) Average inactivation kinetics for the IS6 chimeras plotted against the relative position of the junction. For example, the G12B chimera is plotted as being 0 residues away since the junction occurs at the end of IS6 (inverted triangles). Results from the NI II chimera are shown in diamonds; VG in triangles; GG in squares; and HIS6 in circles. All data were obtained in the absence of β -subunits.

major role in the transitions between channel states. We conclude that one of the mechanisms by which β -subunits regulate HVA channel activation and kinetics is by altering the mobility of IS6, and that this effect is mediated by a direct coupling of IS6 to the AID by a rigid linker [40]. The ability of β -subunits to enhance inactivation was not transferred in these LVA–HVA chimeras, indicating that there are additional mechanisms of regulation.

Fig. 3. Disruption of the structure of the linker separating IS6 and the AID. (A) Amino acid sequence of the amino terminal portion of the I–II loop for G12B and the poly-glycine (G12B-PG6) and poly-alanine (G12B-PA6) chimeras. Secondary structure prediction (SOPMA algorithm) is shown using the same code as in Fig. 2 legend. Coexpression with the β_2a -subunit had no effect on the voltage dependence of activation (B) or current kinetics (C) of PG6 channels ($n = 6–7$). In contrast, β_2a shifted the activation curve (D) and increased persistent currents (E) of PA6 channels ($n = 9–10$). Data obtained are shown in the absence (filled symbols) or presence of β_2a (open symbols). Bar graphs summarize the ability of β_2a -subunits to shift the voltage-dependence of activation (F) and to increase persistent currents (G). Persistent currents of $\alpha_1.3.1$ and chimeras were measured after 150 ms of depolarization to the peak of the $I-V$ ($\alpha_1.3.1$, -20 mV, chimeras -40 mV), while $\alpha_1.2.2$ were measured after 350 ms of depolarization to $+20$ mV. Scale bar applies for both panels C and E. Statistically significant effects are marked with asterisks ($P < 0.01$). (H) Mean residue ellipticity at 222 nm was determined from circular dichroism spectra of peptides corresponding to the wild-type (WT), G12B-PG6 (PG6), and G12B-PA6 (PA6). Data were obtained at 25 °C in the presence of 88% methanol. (I) Percent α -helix calculated from the mean residue ellipticity at 222 nm for the three peptides.

Acknowledgments: We thank D. Bayliss for comments on the manuscript; E. Perozo for helpful discussions; D. Lipscombe for providing the rat brain $\alpha_2.2$ cDNA; and Marlene Hosey for the P237R β_{2a} mutant. This work was supported by National Institutes of Health Grant NS38691.

References

- [1] Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Lipp, P. (1998) Calcium – a life and death signal. *Nature* 395, 645–648.
- [2] Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555.
- [3] Perez-Reyes, E. and Schneider, T. (1994) Calcium channels: structure, function, and classification. *Drug Devel. Res.* 33, 295–318.
- [4] Chien, A.J., Gao, T., Perez-Reyes, E. and Hosey, M.M. (1998) Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the β_{2a} subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 23590–23597.
- [5] Wakamori, M., Mikala, G. and Mori, Y. (1999) Auxiliary subunits operate as a molecular switch in determining gating behaviour of the unitary N-type Ca^{2+} channel current in *Xenopus oocytes*. *J. Physiol. (Lond.)* 517, 659–672.
- [6] Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P. and Campbell, K.P. (1994) Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I–II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit. *Nature* 368, 67–70.
- [7] Gerster, U., Neuhuber, B., Groschner, K., Striessnig, J. and Flucher, B.E. (1999) Current modulation and membrane targeting of the calcium channel $\alpha_1\text{C}$ subunit are independent functions of the β subunit. *J. Physiol. (Lond.)* 517, 353–368.
- [8] Yamaguchi, H., Hara, M., Strobeck, M., Fukasawa, K., Schwartz, A. and Varadi, G. (1998) Multiple modulation pathways of calcium channel activity by a β subunit. Direct evidence of β subunit participation in membrane trafficking of the $\alpha_1\text{C}$ subunit. *J. Biol. Chem.* 273, 19348–19356.
- [9] Canti, C., Davies, A., Berrow, N.S., Butcher, A.J., Page, K.M. and Dolphin, A.C. (2001) Evidence for two concentration-dependent processes for β -subunit effects on $\alpha_1\text{B}$ calcium channels. *Biophys. J.* 81, 1439–1451.
- [10] Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E. and Birnbaumer, L. (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.
- [11] Restituito, S., Cens, T., Rousset, M. and Charnet, P. (2001) Ca^{2+} channel inactivation heterogeneity reveals physiological unbinding of auxiliary β subunits. *Biophys. J.* 81, 89–96.
- [12] De Waard, M., Scott, V.E.S., Pragnell, M. and Campbell, K.P. (1996) Identification of critical amino acids involved in $\alpha_1\beta$ interaction in voltage-dependent Ca^{2+} channels. *FEBS Lett.* 380, 272–276.
- [13] Geib, S. et al. (2002) Use of a purified and functional recombinant calcium-channel β_{2a} subunit in surface-plasmon resonance studies. *Biochem. J.* 364, 285–292.
- [14] Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C. and Minor Jr., D.L. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel β -subunit and an α -subunit domain. *Nature* 429, 671–675.
- [15] Opatowsky, Y., Chen, C.C., Campbell, K.P. and Hirsch, J.A. (2004) Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel β subunit functional core and its complex with the α_1 interaction domain. *Neuron* 42, 387–399.
- [16] Chen, Y.-H. et al. (2004) Structural basis of the $\alpha_1\beta$ subunit interaction of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Nature* 429, 675–680.
- [17] Horton, R.M., Ho, S.N., Pullen, J.K., Hunt, H.D., Cai, Z. and Pease, L.R. (1993) Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol.* 217, 270–279.
- [18] Perez-Reyes, E. et al. (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391, 896–900.
- [19] Gomora, J.C., Murbartian, J., Arias, J.M., Lee, J.-H. and Perez-Reyes, E. (2002) Cloning and expression of the human T-type channel $\text{Ca}_v3.3$: insights into prepulse facilitation. *Biophys. J.* 83, 229–241.
- [20] Lee, J.H., Gomora, J.C., Cribbs, L.L. and Perez-Reyes, E. (1999) Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block $\alpha_1\text{H}$. *Biophys. J.* 77, 3034–3042.
- [21] Krittanaei, C. and Johnson Jr., W.C. (2000) The relative order of helical propensity of amino acids changes with solvent environment. *Proteins* 39, 132–141.
- [22] Myers, J.K., Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (1997) Helix propensities are identical in proteins and peptides. *Biochemistry* 36, 10923–10929.
- [23] Rohl, C.A., Chakrabarty, A. and Baldwin, R.L. (1996) Helix propagation and N-cap propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides in 40 volume percent trifluoroethanol. *Protein Sci.* 5, 2623–2637.
- [24] Lambert, R.C., Maulet, Y., Mouton, J., Beattie, R., Volsen, S., De Waard, M. and Feltz, A. (1997) T-type Ca^{2+} current properties are not modified by Ca^{2+} channel β subunit depletion in nodulus ganglion neurons. *J. Neurosci.* 17, 6621–6628.
- [25] Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E. and Nargeot, J. (2004) Plasma membrane expression of T-type calcium channel α_1 subunits is modulated by HVA auxiliary subunits. *J. Biol. Chem.* 279, 29263–29269.
- [26] Geourjon, C. and Deleage, G. (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* 11, 681–684.
- [27] Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. and De Waard, M. (2000) The I–II loop of the Ca^{2+} channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the β subunit. *Neuron* 25, 177–190.
- [28] Cornet, V. et al. (2002) Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Neurosci.* 16, 883–895.
- [29] Pan, J.Q. and Lipscombe, D. (2000) Alternative splicing in the cytoplasmic II–III loop of the N-type Ca channel $\alpha_1\text{B}$ subunit: functional differences are β subunit-specific. *J. Neurosci.* 20, 4769–4775.
- [30] De Waard, M., Pragnell, M. and Campbell, K.P. (1994) Ca^{2+} channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* 13, 495–503.
- [31] Kim, J., Ghosh, S., Nunziato, D.A. and Pitt, G.S. (2004) Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Neuron* 41, 745–754.
- [32] Brown, J.E. and Klee, W.A. (1971) Helix-coil transition of the isolated amino terminus of ribonuclease. *Biochemistry* 10, 470–476.
- [33] Myers, J.K., Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (1998) Trifluoroethanol effects on helix propensity and electrostatic interactions in the helical peptide from ribonuclease T1. *Protein Sci.* 7, 383–388.
- [34] Rohl, C.A., Scholtz, J.M., York, E.J., Stewart, J.M. and Baldwin, R.L. (1992) Kinetics of amide proton exchange in helical peptides of varying chain lengths. Interpretation by the Lifson–Roig equation. *Biochemistry* 31, 1263–1269.
- [35] Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (2002) The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417, 523–526.
- [36] Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419, 35–42.
- [37] Jin, T., Peng, L., Mirshahi, T., Rohacs, T., Chan, K.W., Sanchez, R. and Logothetis, D.E. (2002) The $\beta\gamma$ subunits of G proteins gate a K^+ channel by pivoted bending of a transmembrane segment. *Mol. Cell* 10, 469–481.
- [38] Shi, C. and Soldatov, N.M. (2002) Molecular determinants of voltage-dependent slow inactivation of the Ca^{2+} channel. *J. Biol. Chem.* 277, 6813–6821.
- [39] Sompornpisut, P., Liu, Y.S. and Perozo, E. (2001) Calculation of rigid-body conformational changes using restraint-driven Cartesian transformations. *Biophys. J.* 81, 2530–2546.
- [40] Hering, S. (2002) β -subunits: fine tuning of Ca^{2+} channel block. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 509–513.