



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DE LAS GLICINAS "BISAGRA" DE LOS
SEGMENTOS S6 EN EL MECANISMO DE
ACTIVACIÓN DE LOS CANALES $Ca_v3.3$

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RICARDO KIYOSHI SEPÚLVEDA HIROSE

T U T O R :

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno

Sepúlveda
Hirose
Ricardo Kiyoshi
55 32 68 35
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301559744

2. Datos del tutor

Dr.
Juan Carlos
Gómora
Martínez

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Juan Manuel
Arias
Montaño

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Gertrudis Hortensia
González
Gómez

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Enrique
Moreno
Sáenz

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Clara
Esquivel
Huesca

7. Datos del trabajo escrito

Papel de las glicinas “bisagra” de los segmentos S6 en el mecanismo de activación de los canales Cav3.3
69 p.
2012

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto J50250Q), así como con una beca del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN206008).

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, enorme y única, por ser una piedra angular en mi vida. Cuna de la formación de mis padres, de mi hermano, y de mí mismo. Con el deseo de que siempre crezca y nunca desaparezca.

Al Dr. Juan Carlos Gómora, por su apoyo y asesoría invaluable para sacar adelante este trabajo, y sobre todo por mostrar su confianza y tolerancia en mi desempeño en el laboratorio.

A mis sinodales, el Maestro Moreno Sáenz y la Dra. Clara Esquivel, por brindarme su tiempo en la revisión del escrito y la discusión del mismo. A la Dra. Hortensia González, por sus consejos y comentarios, y particularmente por su amable asistencia.

A mi familia, a mi papá, a mi mamá y a mi hermano, por brindarme todo lo que siempre necesité y mucho más, por ser personas excelentes, y en muchos sentidos un ejemplo para mí. Los admiro y quiero mucho.

A Lau y a Clara Díaz (Clarita pa' los cuates), por su enorme e incondicional apoyo, mucho más allá del simple deber. Pero sobre cualquier otra cosa, por ser personas con hermosos sentimientos. Vecino y vecina, Batman y Robin.

A Ever, Roger, Osbaldo, Sarahí, Erika, Manolo, Zazil y Daniel, por ser parte de la familia del laboratorio y compartir buenos ratos y consejos de vida.

A mis amigos de la Fac, el Pop, mi hermana Reme, Luis, Tiago, la Wera, Lucy, Chío, Marta, Darío y Luque, que me apoyaron en las clases y en las no-clases, en las buenas y las perdidas, y con quienes pasé buenos ratos y reflexiones profundas. Buenas épocas, aquéllas.

A Karliux, el Púas, Chicky, Beto, Abe y Jules, y a todos mis amigos de antes y después, a los que abandono frecuentemente pero nunca me dan la espalda. Gracias por comprenderme y tolerarme.

Al Pancho y a Ito, amigos de toda la vida. He aprendido muchas cosas de ustedes, hemos crecido juntos, y ha sido una gran experiencia. Les deseo lo mejor siempre, y que nunca dejemos de crecer.

A Lore, por ser una persona excepcional y hermosa, y por dejarme formar parte también de tu familia. Mao. Gracias por tu sonrisa.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
<hr/>	
II. INTRODUCCIÓN	3
<hr/>	
2.1. CANALES IÓNICOS	3
2.1.1. CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE	5
2.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE	7
2.1.3. PROPIEDADES MOLECULARES DE LOS CANALES CA_v	9
2.1.4. CAMBIOS CONFORMACIONALES DE LOS CANALES CA_v3	12
2.2. ANTECEDENTES ESTRUCTURALES EN CANALES DE POTASIO: KCSA Y MthK	13
2.3. ANTECEDENTES DE ESTUDIOS ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN CANALES DE SODIO Y DE CALCIO	14
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
<hr/>	
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
<hr/>	
4.1. HIPÓTESIS	20
4.2. OBJETIVO GENERAL	20
4.3. OBJETIVOS PARTICULARES	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	21
<hr/>	
5.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS CANALES $CA_v3.3$ MUTANTES	21
5.1.1. GENERACIÓN DE LOS FRAGMENTOS MUTANTES	21
5.1.2. AMPLIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	24
5.2. CULTIVO CELULAR: CÉLULAS HEK-293	25
5.3. TRANSFECCIÓN DE CANALES $CA_v3.3$	26
5.4. ELECTROFISIOLOGÍA	27
5.4.1. EXPERIMENTOS DE FIJACIÓN DE VOLTAJE CON LA TÉCNICA DE PATCH CLAMP	27
5.4.2. SOLUCIONES Y PIPETAS DE REGISTRO	29
5.4.3. PROTOCOLOS DE VOLTAJE	30
5.4.3.1. sp-30500	30
5.4.3.2. I-V500	30
5.4.3.3. Hinf15-100i	31
5.4.3.4. iiv10ms60-2ch	31
5.4.3.5. recover-100i	31
5.4.4. ANÁLISIS DE DATOS ELECTROFISIOLÓGICOS	31
5.5. MICROSCOPIA CONFOCAL	33
VI. RESULTADOS	34
<hr/>	
6.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS MUTANTES DEL CANAL $CA_v3.3$	34
6.1.1. SUBCLONACIÓN DE FRAGMENTOS DEL CANAL $CA_v3.3$	34
6.1.2. GENERACIÓN DE LAS MUTANTES DEL DOMINIO I	34
6.1.3. GENERACIÓN DE LAS MUTANTES DEL DOMINIO II	35
6.1.4. GENERACIÓN DE LAS MUTANTES DEL DOMINIO III	38

6.2. CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LOS CANALES MUTANTES DE CA_v3.3	38
6.2.1. EFECTOS EN LA RELACIÓN CORRIENTE-VOLTAJE	40
6.2.2. INACTIVACIÓN EN EL ESTADO ESTACIONARIO	45
6.2.3. RECUPERACIÓN DE LA INACTIVACIÓN	47
6.2.4. CINÉTICA DE LAS CORRIENTES GENERADAS POR LOS CANALES CA _v 3.3	50
6.2.4.1. Cinética de activación e inactivación	50
6.2.4.2. Cinética de desactivación de los canales CA _v 3.3	52
6.3. LOCALIZACIÓN DE SUBUNIDADES $\alpha 1$ DE LOS CANALES CA_v3.3 EN LA MEMBRANA CELULAR	55
VII. DISCUSIÓN	57
7.1. LAS MUTACIONES PUNTUALES EN LOS SEGMENTOS S6 DEL CANAL CA_v3.3 DISMINUYEN SIGNIFICATIVAMENTE LA AMPLITUD DE LAS CORRIENTES MACROSCÓPICAS	57
7.2 LOS RESIDUOS BISAGRA GLY385 Y GLY814, ASÍ COMO LA VAL1383 SON IMPORTANTES PARA EL CIERRE DEL CANAL CA_v3.3	58
7.3. LA INTRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS CON BAJA PREFERENCIA POR LAS α-HÉLICES ALTERA LA DEPENDENCIA AL VOLTAJE Y CINÉTICA DE LA INACTIVACIÓN DE LOS CANALES CA_v3.3	61
7.4. EL CANAL CA_v3.3 POSEE UN MECANISMO DE APERTURA DIFERENTE AL DE LAS GLICINAS BISAGRA	63
VIII. CONCLUSIONES	64
IX. REFERENCIAS	65

ABREVIATURAS

ADC: Convertidor analógico-digital de la interfase

AID: Dominio de interacción de la subunidad principal $\alpha 1$

BID: Dominio de interacción de la subunidad β

CCAV: Canal de calcio activado por voltaje

cDNA: DNA complementario

C_m : Capacitancia membranal

DAC: Convertidor digital-analógico de la interfase

DMEM: Medio de Eagle Modificado de Dulbecco

dNTPs: Desoxinucleósidos trifosfatados

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético

ESM: Error estándar de la media

GFP: Proteína verde fluorescente

HEK-293: Línea celular inmortalizada a partir de células embrionarias de riñón humano

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico

HP: Potencial de mantenimiento

HVA: Canales de calcio de alto umbral de activación

I_{Ca} : Corriente de calcio

I_{max} : Corriente máxima

$I-V$: Relación corriente-voltaje

kb: Miles de pares de bases

LVA: Canales de calcio de bajo umbral de activación

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

R_s : Resistencia en serie

τ_{act} : Constante de tiempo de activación

τ_{desac} : Constante de tiempo de desactivación

τ_{inac} : Constante de tiempo de inactivación

τ_h : Constante de tiempo de recuperación de la inactivación

τ_{HP} : Constante de tiempo de fijación de voltaje

TBE: Solución amortiguadora de pH que contiene Tris base, ácido bórico y EDTA

TEA: Tetraetilamonio

$V_{1/2}$: Potencial al cual se activa o inactiva el 50% de la población de canales

V_c : Pulsos comando

V_{inv} : Potencial de inversión de la corriente

V_m : Potencial de membrana

I. RESUMEN

Los canales de calcio activados por voltaje (Ca_v) son proteínas transmembranales que actúan como conducto para que iones Ca^{2+} puedan atravesar el ambiente hidrofóbico de la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Dentro de esta familia de proteínas se encuentra una subfamilia de tres miembros con particularidades biofísicas notables, conocidos como canales tipo T, LVA o Ca_v3 , los cuales participan en procesos tan diversos como la secreción hormonal, la fertilización y la nocicepción, siendo además los responsables de la generación de espigas de bajo umbral y disparo en ráfagas en neuronas del hipocampo y el tálamo. La investigación de estos canales iónicos ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, siendo ahora evidente el predominante papel que juegan en la biología y fisiología celular, resultando su disfunción en múltiples enfermedades humanas. Con el objetivo de dilucidar cómo una alteración en el funcionamiento normal de un canal puede derivar en una patología, es necesario comprender su estructura molecular y sus propiedades biofísicas. Uno de los aspectos más importantes y al mismo tiempo una de las mayores interrogantes es el funcionamiento de la compuerta de activación del canal, cuya apertura permite el libre tránsito de los iones. Con la publicación de la primera estructura cristalizada en alta resolución de un canal de potasio en su conformación abierta, en la cual los elementos estructurales que conforman la compuerta mostraron una torsión a partir de residuos de glicina, así como la subsiguiente aparición de estudios estructurales y funcionales que ratificaban la presencia e importancia de estos residuos en canales homotetraméricos, se planteó un modelo de apertura en el cual las glicinas presentes en los segmentos que delimitan el poro del mismo sirven como bisagras a partir de las cuales pueden rotar los elementos estructurales que conforman la compuerta. La amplia conservación de estos aminoácidos en estructuras análogas de numerosos canales de calcio, sodio y potasio activados por voltaje, lo plantean como un mecanismo plausible para la activación del $\text{Ca}_v3.3$, que cuenta con la presencia de residuos de Gly con esa potencial función, si bien no tiene una configuración homotetramérica.

Por lo anterior, en el presente trabajo se exploraron las propiedades biofísicas del canal $\text{Ca}_v3.3$ mediante técnicas de biología molecular y electrofisiología, realizando mutaciones puntuales sobre residuos que podrían estar funcionando como bisagras para la compuerta de activación del canal, y que por lo tanto tendrían un papel determinante en el mecanismo de apertura y cierre del mismo. Los resultados obtenidos indican que la contribución que tiene

cada uno de los residuos explorados en el proceso de activación y desactivación del $Ca_v3.3$ difiere considerablemente, volviendo poco probable una participación de los mismos bajo un modelo de glicinas bisagras estricto. No obstante, se encontraron consistencias con trabajos similares realizados en canales de calcio de alto umbral de activación (HVA), así como información relevante sobre otro proceso fundamental de un canal iónico, la inactivación, y que soporta teorías previamente publicadas. En conclusión, los resultados de este trabajo apuntan a que el fenómeno mecánico que subyace la apertura de los canales $Ca_v3.3$ es diferente al mecanismo de apertura mediado por la acción de glicinas bisagra en canales homotetraméricos.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Canales iónicos

La generación y propagación de señales eléctricas en las células excitables involucra el tránsito de iones a través de la membrana plasmática, del espacio extracelular al intracelular y viceversa. Las membranas celulares están constituidas por dos capas de moléculas lipídicas relativamente impermeables al paso de iones inorgánicos. Consecuentemente, para que se lleve a cabo el flujo de estas moléculas a través de la bicapa es necesaria la presencia de proteínas especializadas en la misma. Estas proteínas, entre las que se encuentran los transportadores y los canales iónicos, pueden clasificarse de acuerdo al fenómeno mecanístico para que se produzca dicho movimiento. En el caso de los primeros, el paso de los iones se realiza de manera activa en contra de su gradiente de concentración, lo que demanda un gasto energético, como es el caso de la bomba de Ca^{2+} y la bomba Na^+/K^+ . Los canales iónicos, por otra parte, son proteínas integrales de membrana (Figura 1) que permiten el movimiento de iones al interior y exterior de la célula de manera pasiva, es decir, sin gasto energético de por medio (Hille, 2001; Alberts *et al.*, 2008).

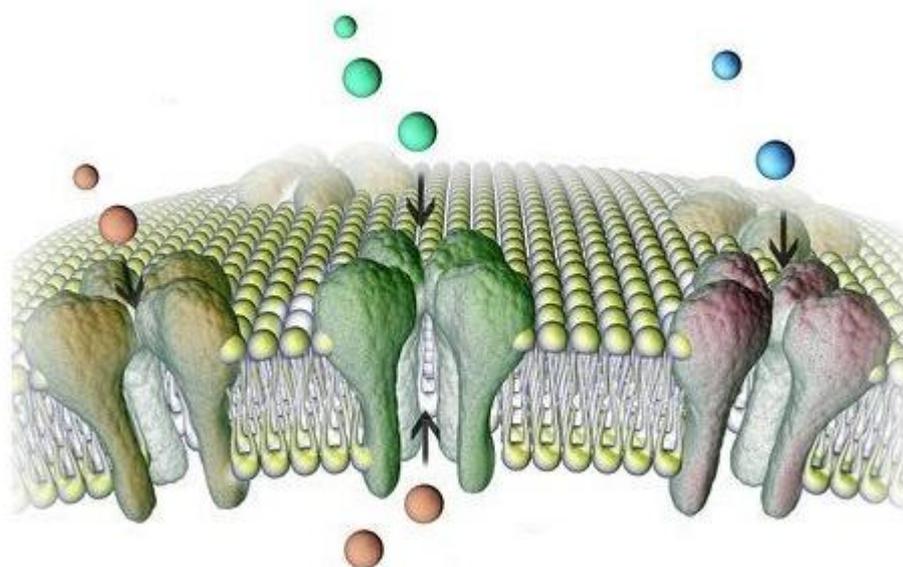


Figura 1. Representación de la conducción de iones inorgánicos a través de canales iónicos embebidos en una membrana. Modificado de <http://www.sciencephoto.com/media/145923>

La naturaleza molecular y la fisiología de los canales iónicos es un campo de constantes y apasionantes descubrimientos y teorías, partiendo de la serie de trabajos clásicos de Alan Lloyd Hodgkin y Andrew Huxley que datan del año 1952, donde explicaron los mecanismos iónicos que subyacen la iniciación y la propagación de la actividad eléctrica en el axón gigante de calamar (Hodgkin *et al.*, 1952; Hodgkin & Huxley, 1952a; Hodgkin & Huxley, 1952b; Hodgkin & Huxley, 1952c), mismos que les valieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1963. Sin embargo, fue hasta finales de la década de los 70s e inicio de los 80s que se comenzó a dilucidar la naturaleza proteica de los canales iónicos, empezando por el receptor a acetilcolina, el primero en ser purificado y secuenciado en su totalidad, así como el primero para el cual se registró la señal eléctrica de un canal aislado (Neher & Sakmann, 1976; Raftery *et al.*, 1980; Noda *et al.*, 1982; Noda *et al.*, 1983), para posteriormente darse el paulatino descubrimiento de canales de sodio, potasio y calcio activados por voltaje (Noda *et al.*, 1984; Papazian *et al.*, 1987; Tanabe *et al.*, 1987), hasta el parteaguas que significó el descubrimiento de la estructura atómica mediante cristalografía de rayos X de un canal de potasio hacía finales del siglo pasado (Doyle *et al.*, 1998).

Entre las características fundamentales que presenta un canal iónico destacan varios aspectos. En primer lugar, la selectividad iónica (cuya máxima expresión se presenta en los canales activados por voltaje), que consiste en la afinidad que tiene un canal por una especie iónica en particular, y que resulta en que, por ejemplo, un canal de calcio sea 1,000 veces más permeable al ion Ca^{2+} que al ion Na^{+} (Sather & McCleskey, 2003), y un canal de potasio 10,000 veces más permeable al K^{+} que al Na^{+} (Doyle *et al.*, 1998; Nimigean & Allen, 2011). De igual manera, la velocidad a la cual permiten el flujo iónico es superior al de cualquier transportador, alcanzando tasas de 10^8 iones por segundo, mucho mayor a los 10^3 iones por segundo que transporta una bomba iónica (Morais-Cabral *et al.*, 2001). Por otro lado, y no menos fascinante, los componentes estructurales del canal tienen la capacidad de adoptar diferentes estados conformacionales en respuesta a diferentes estímulos, de tal manera que presentan un estado conductor o abierto, un estado cerrado o de reposo, y un estado inactivado, que tampoco permite la conducción de los iones (Hille, 2001; Sands *et al.*, 2005).

Con base en el tipo de estímulo necesario para que produzcan una respuesta, los canales iónicos se agrupan en diferentes clases, aquellos que responden a un estímulo mecánico (que involucra la deformación de la membrana celular), químico (debido a la unión de hormonas o neurotransmisores) o eléctrico (cambio en el potencial de membrana).

Precisamente, los canales pertenecientes a esta última clase constituyen la superfamilia de canales iónicos activados por voltaje, dentro de la cual se ubican aquellos que transportan selectivamente iones Ca^{2+} , denominados apropiadamente canales de calcio activados por voltaje (CCAV o canales Ca_V) (Catterall, 2000; Ertel *et al.*, 2000). Estos complejos multiproteicos pueden estar conformados estructuralmente como hexámeros, pentámeros o tetrameros. En particular, los canales de potasio activados por voltaje (K_V) y los canales TRP (*Transient Receptor Potential*) están constituidos como tetrameros (Figura 2), mientras que la subunidad principal de los canales activados por voltaje selectivos a calcio (Ca_V) y sodio (Na_V) presentan un arreglo tetramérico. Por otra parte, los canales activados por ligando como el receptor de acetilcolina tipo nicotínico (nAChR), el receptor a GABA_A o el receptor de glicina (GlyR) se componen de cinco subunidades (Colquhoun & Sivilotti, 2004; Unwin, 2005).

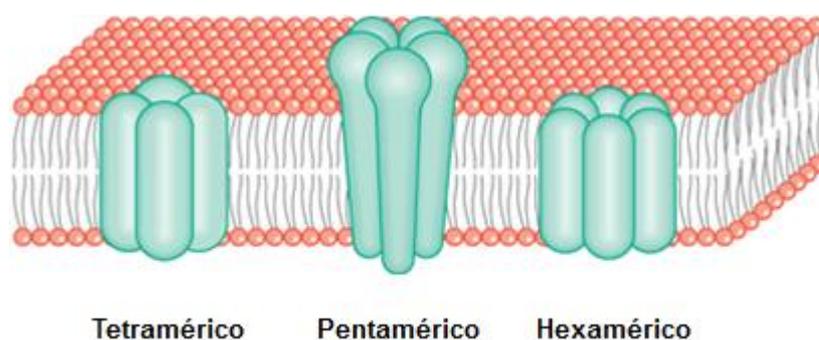


Figura 2. Organización de los canales iónicos como complejos multiprotéicos en la membrana. Representación esquemática de las tres principales organizaciones que adoptan los canales iónicos: tetramérica, pentamérica y hexamérica. En cada caso, sólo se esquematiza la subunidad principal que da lugar a la formación del poro del canal, mismo que se encuentra en el centro del complejo proteico. Este último puede incluir subunidades adicionales o accesorias que regulan la actividad de la subunidad principal, como es el caso de los canales activados por voltaje (incluidos dentro de los que forman tetrameros). Cada subunidad cruza la membrana de 2 a 6 veces, formando regiones transmembranales de la proteína (Modificado de Lipscombe, 2001).

2.1.1. Canales de calcio activados por voltaje

Las células excitables, como las neuronas y los miocitos cardíacos, traducen su electricidad en acción mediante flujos de Ca^{2+} modulados por canales permeables al Ca^{2+} sensibles al voltaje. En una célula en reposo, los niveles de calcio libre en el citoplasma se mantienen extremadamente bajos, en el rango de 30 a 200 nM (Hille, 2001; Sands *et al.*, 2005). Dado que la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular se encuentra en el rango milimolar,

mientras que la $[Ca^{2+}]_i$ se encuentra en nanomolar, existe un fuerte gradiente de concentración del Ca^{2+} a través de la membrana celular (Miller, 1987; Bootman & Berridge, 1995). La actividad de los canales de calcio activados por voltaje permite el influjo de Ca^{2+} a la célula en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática, acoplado así las señales eléctricas en la superficie membranal con cascadas de señalización intracelular, que se activan en respuesta al aumento en la concentración citosólica del ion Ca^{2+} . El calcio que entra a la célula a través de los canales Cav juega un papel clave como un segundo mensajero intracelular, activando y regulando procesos celulares tales como la contracción muscular, secreción de hormonas y neurotransmisores y expresión génica (Berridge, 1997; Catterall, 2000; Ertel *et al.*, 2000; Perez-Reyes, 2003). Estos canales son de vital importancia en tipos celulares caracterizados por generar y responder ante estímulos eléctricos, denominados excitables, como las neuronas, las células musculares esqueléticas y los cardiomiocitos. No obstante, no sólo las células consideradas eléctricamente excitables expresan canales Cav . Algunos estudios han demostrado su importancia en células no excitables, como los espermatozoides (Darszon *et al.*, 2006; Chakrabarti & Chakrabarti, 2006).

La importancia fisiológica del flujo transmembranal de Ca^{2+} se reconoció desde principios de los años 50s del siglo pasado, cuando Paul Fatt y Bernard Katz (Fatt & Katz, 1953) descubrieron que las fibras musculares de cangrejo podían generar potenciales de acción aún en ausencia de sodio extracelular, es decir, una excepción de la teoría del sodio para la generación de los potenciales de acción propuesta por Hodgkin y Huxley en 1952. Estudios posteriores mostraron que los canales de calcio son los responsables de generar potenciales de acción regenerativos en las fibras musculares de artrópodos, moluscos, nematodos y en músculo liso de vertebrados. Coexisten además con canales de sodio, contribuyendo parcialmente a la actividad eléctrica en músculo cardiaco de vertebrados y en los somas de neuronas de moluscos, anélidos, artrópodos y vertebrados (Fatt & Ginsborg, 1958; Hagiwara & Byerly, 1981; Tsien *et al.*, 1987; Bean, 1989). Fue hasta el año de 1970 que las primeras corrientes de calcio en neuronas se registraron directamente bajo condiciones de fijación de voltaje (Geduldig & Gruener, 1970; Krishtal & Magura, 1970). Históricamente ha resultado difícil estudiar las propiedades biofísicas de los CCAV ya que no se encuentran en alta densidad, y muchos de ellos se expresan en membranas que son difíciles de explorar, tales como dendritas y terminales nerviosas, además de que las pequeñas corrientes de Ca^{2+} tienden a ser enmascaradas por otras corrientes, especialmente de K^+ (Hille, 2001; Sands *et al.*, 2005). A pesar de ello, los canales de calcio tienen una enorme relevancia clínica dado

que son el blanco de numerosos fármacos empleados para el tratamiento de la hipertensión, angina de pecho y epilepsia, así como la percepción del dolor (Ertel *et al.*, 1997; Mitterdorfer *et al.*, 1998; Benardeau *et al.*, 2000; Gomora *et al.*, 2001; Todorovic & Jevtovic-Todorovic, 2011). Algunos de estos padecimientos, en particular la epilepsia de tipo ausencia, cuyo origen se asocia a una disfunción en el accionar normal de los canales (ocasionado por mutaciones en el gen correspondiente), han sido denominados con el nombre de canalopatías (Flink & Atchison, 2003; Nelson *et al.*, 2006; Catterall *et al.*, 2008).

2.1.2. Clasificación de los canales de calcio activados por voltaje

Los primeros indicios de la heterogeneidad de las poblaciones de canales de calcio fueron obtenidos en huevos de estrella de mar por Hagiwara *et al.* (1975). En condiciones experimentales donde el Ca^{2+} era el único acarreador de carga, encontraron que las relaciones corriente-voltaje de Ca^{2+} demostraban dos picos de corriente claramente distinguibles, uno alrededor de -30 mV y otro a +20 mV. Este parámetro se convirtió en un sello clásico para estos dos tipos de corrientes de Ca^{2+} , las cuales fueron eventualmente clasificadas como corrientes de calcio de bajo umbral de activación (LVA) y de alto umbral de activación (HVA) (Armstrong & Matteson, 1985; Bean, 1985). Los primeros también son denominados canales de calcio tipo T por la naturaleza transitoria de sus corrientes (Carbone & Lux, 1984; Nowycky *et al.*, 1985; Perez-Reyes, 1999).

La primera clasificación de los Ca_v , no obstante, obedeció a criterios farmacológicos y fisiológicos básicos: corrientes de Ca^{2+} de larga duración identificadas en músculo cardiaco, esquelético y liso y células endócrinas que eran inhibidas específicamente por dihidropiridinas fueron designadas como tipo L (Nowycky *et al.*, 1985); corrientes registradas en ganglios espinales con una inactivación más rápida, insensibilidad a las dihidropiridinas pero bloqueadas por conotoxinas revelaron las corrientes tipo N (McCleskey *et al.*, 1987; Tsien *et al.*, 1988); corrientes tipo P, registradas en neuronas de Purkinje y altamente sensibles a ω -agatoxina IVA (Mintz *et al.*, 1992; Llinas *et al.*, 1992); corrientes bloqueadas por la misma toxina de araña pero con menor afinidad, y registradas en neuronas granulares cerebelares, las corrientes tipo Q (Randall & Tsien, 1995); y finalmente, las corrientes tipo R identificadas también en neuronas granulares cerebelares, pero resistentes a los mismos bloqueadores (Randall & Tsien, 1995; Doering & Zamponi, 2003). Todas estas corrientes se caracterizan en conjunto por una lenta inactivación, muy rápida desactivación, conductancia

unitaria de alrededor de 24 pS, además de activarse a voltajes de entre -30 y -20 mV, por lo que todas pertenecen a la familia de canales HVA.

Los canales LVA, por su parte, se caracterizan por un umbral de activación macroscópica de alrededor de -60 mV, el cual es más negativo que el umbral de activación de un potencial de acción, y aún más que el correspondiente a los canales HVA. La activación e inactivación de los canales LVA es muy rápida, no así su desactivación, la cual es más lenta que la de los HVA. Se destacan asimismo por una pequeña conductancia unitaria (6-8 pS con 110 mM Ca^{2+}), siendo esta otra razón por la cual se denominan tipo T (*tiny*) (Nilius *et al.*, 1985). Esta familia de canales ha sido identificada en diversos tejidos, entre los que se encuentran cerebro, corazón, riñón, músculo liso, glándulas adrenales y ganglios de las raíces dorsales, participando en la generación de espigas de bajo umbral y disparo en ráfagas en neuronas del hipocampo, tálamo y neocórtex (Vassort & Alvarez, 1994; Huguenard, 1996).

Al día de hoy se ha logrado la identificación de diez genes codificantes para subunidades $\alpha 1$ de canales de calcio activados por voltaje, a partir de estudios de clonación y expresión de canales recombinantes. Siete de estos genes codifican para subunidades $\alpha 1$ que generan corrientes tipo HVA, mientras los tres restantes para subunidades con corrientes LVA (Ertel *et al.*, 2000; Catterall *et al.*, 2003; Perez-Reyes, 2003). La nomenclatura actual de los canales Ca_v está en concordancia con la del resto de los canales activados por voltaje (Chandy & Gutman, 1993; Goldin *et al.*, 2000). Bajo esta nomenclatura el primer término hace referencia al ión permeante (Ca, por ejemplo), seguido del estímulo necesario para la activación del canal indicado como subíndice (v , en este caso), y por último dos números separados por un punto, en alusión a la familia de proteínas y al miembro de la misma respectivamente (Ertel *et al.*, 2000). De esta manera, el canal $\text{Ca}_v3.3$ identifica al miembro 3 de la familia 3, canal de calcio activado por voltaje tipo T, codificado por la subunidad $\alpha 1\text{I}$ (Figura 3). A pesar de su importancia, la mayor parte de los estudios hasta la fecha han sido enfocados a los canales de calcio de alto umbral de activación o HVA, por lo que existen importantes carencias concernientes a distintas áreas del conocimiento de los LVA, como la regulación a la que son sujetos, su relevancia en procesos patofisiológicos, y la relación existente entre su estructura y su función.

2.1.3. Propiedades moleculares de los canales Ca_v

Los canales de calcio de alto umbral de activación (Ca_v1 y Ca_v2) son proteínas oligoméricas, constituidas por cuatro subunidades proteicas (para una revisión véase (Arikkath & Campbell, 2003): una subunidad principal denominada $\alpha1$, que forma el poro de conducción iónica y contiene además la estructura necesaria para la detección de cambios en el potencial transmembranal; una subunidad intracelular β que regula tanto propiedades biofísicas como el tráfico hacia la membrana plasmática de la $\alpha1$, y de la cual han sido identificadas hasta ahora cuatro isoformas (β_1 , β_2 , β_3 y β_4); una subunidad accesoria $\alpha2\delta$ que está constituida por una región extracelular $\alpha2$ unida por un enlace disulfuro a la región transmembranal δ , cuya aparente función es facilitar el anclaje del canal a la membrana y actuar como receptor de señales extracelulares; y una subunidad γ conformada por cuatro segmentos transmembranales, que regulan la cinética y la amplitud de la corriente, con ocho isoformas ($\gamma_1 - \gamma_8$). La organización básica de un canal HVA se muestra en la Figura 4.

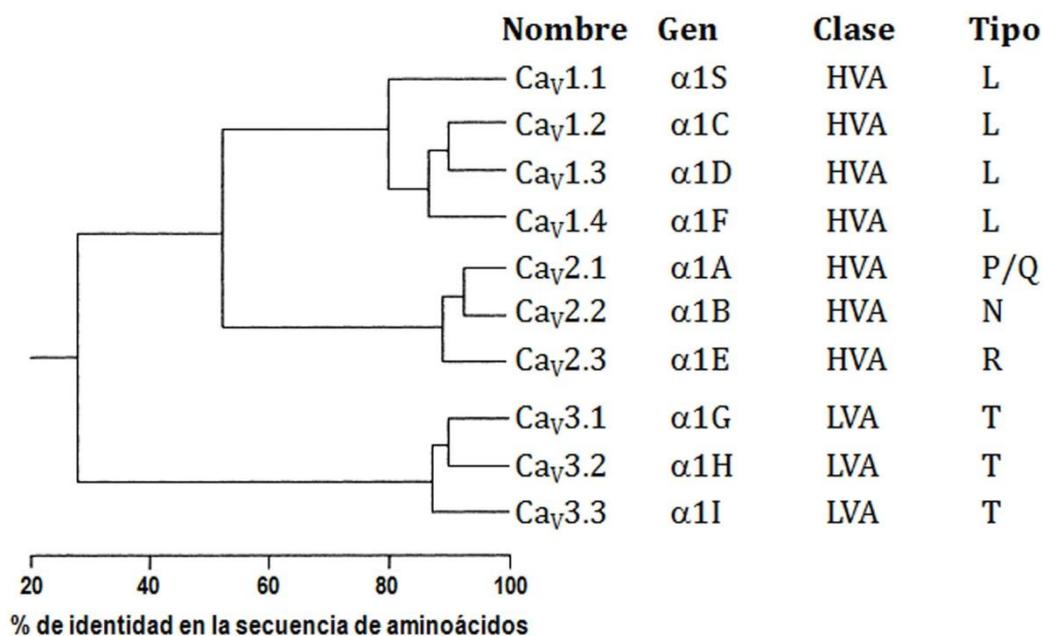


Figura 3. Filogenia de las subunidades $\alpha1$ de los canales Ca_v . Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de la subunidad $\alpha1$ de los canales de calcio activados por voltaje HVA y LVA. La comparación de las secuencias se basó exclusivamente en las regiones transmembranales y del poro (alrededor de 350 aminoácidos), arrojando como resultado tres subfamilias, Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 . El porcentaje de identidad entre los miembros de cada subfamilia es mayor al 80% (Modificada de Ertel *et al.*, 2000).

Los canales Ca_v3 , por su parte, parecen estar formados únicamente por la subunidad principal $\alpha1$, ya que ésta puede por sí sola generar corrientes con propiedades similares a las observadas en preparaciones nativas. Es preciso remarcar el hecho de que las subunidades $\alpha1$ de los canales LVA fueron clonadas *in silico* por homología con las unidades $\alpha1$ de los

canales HVA, y no por métodos clásicos como purificación o PCR (Perez-Reyes, 2003). Consecuentemente, no existe evidencia alguna de la existencia de subunidades accesorias propias de los canales LVA, a diferencia de aquellas identificadas para los HVA (β , $\alpha 2\delta$, γ). La posible modulación de los Ca_v3 por las subunidades accesorias de los canales HVA es, no obstante, aún motivo de debate, si bien estudios encaminados a dilucidar dicha interacción han mostrado que existe cierta regulación de las subunidades β y $\alpha 2\delta$ sobre los Ca_v3 clonados en sistemas heterólogos (Dolphin *et al.*, 1999; Dubel *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005), incluyendo trabajos realizados en nuestro propio laboratorio (Arteaga, 2007; Higueldo García, 2007). Asimismo, recientemente se demostró en osteocitos que la subunidad $\alpha 2\delta 1$ aumenta la expresión del canal tipo T $Ca_v3.2$ en la membrana plasmática y regula la liberación de ATP inducida mecánicamente en dichas células de hueso (Thompson *et al.*, 2011).

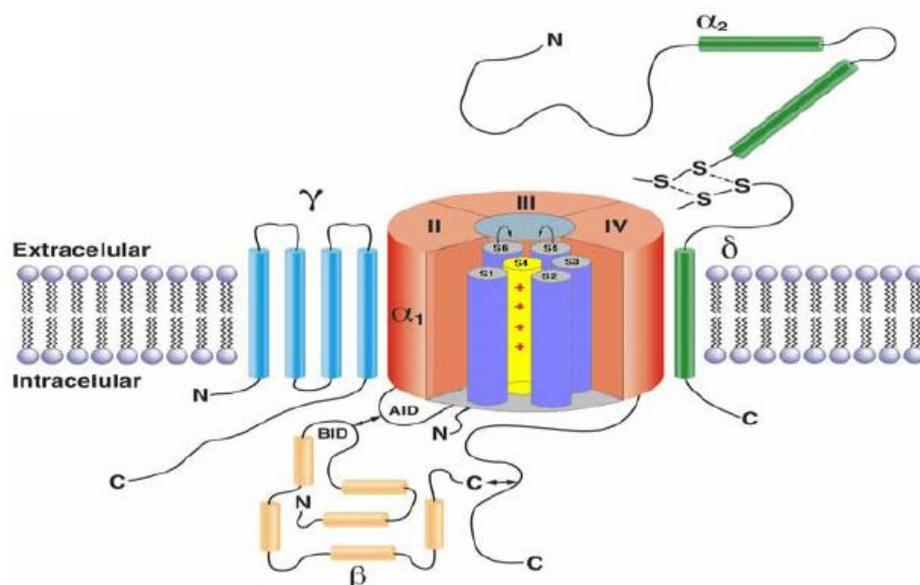


Figura 4. Representación esquemática de las subunidades que constituyen un canal Ca_v . Arreglo propuesto para las diferentes subunidades accesorias (β , $\alpha 2\delta$, y γ) en torno a la subunidad principal $\alpha 1$. El plegamiento de los cuatro dominios (I-IV) de la subunidad $\alpha 1$ forma el poro central de conducción iónica. La subunidad β es intracelular e interactúa a través de su sitio BID (*Beta Interaction Domain*) con el sitio AID (*Alpha Interaction Domain*) de la subunidad $\alpha 1$. La subunidad γ es transmembranal, mientras que $\alpha 2\delta$ tiene una región extracelular y una transmembranal (Modificada de Randall & Benham, 1999).

Como puede observarse en la Figura 4, el poro hidrofílico de conducción de los iones está formado por la subunidad $\alpha 1$, la cual contiene además regiones especializadas que le confieren la capacidad de detectar cambios en el voltaje (segmento S4 o sensor de voltaje, marcado con cargas positivas) y determinan su selectividad iónica (estructura conocida como filtro de selectividad). De acuerdo con modelos predictivos de la estructura secundaria y terciaria de esta proteína realizados a partir de perfiles de hidrofobicidad, la cadena de

aminoácidos de la subunidad $\alpha 1$ forma cuatro dominios similares (numerados del I al IV partiendo del amino terminal) unidos entre sí por asas intracelulares (Figura 5). Cada uno de los dominios está formado a su vez por seis segmentos transmembranales (denominados S1 a S6 en el mismo sentido de la cadena) interconectados por asas intra y extracelulares. El cuarto de estos segmentos, el S4, es un elemento molecular distintivo de los canales activados por voltaje que se caracteriza por presentar residuos con carga neta positiva (argininas y lisinas) que se repiten cada 3 residuos. En respuesta a un cambio en el potencial de membrana (V_m), el S4 se desplaza físicamente dentro de la membrana, acoplado de tal manera el cambio en el voltaje transmembranal con cambios conformacionales asociados al *gating* del canal (Sands *et al.*, 2005; Tombola *et al.*, 2006). Los segmentos S5 y S6 se encuentran unidos por un asa que se invagina parcialmente en la membrana, conocida como asa del poro (P). Con base en estudios de cristalografía de canales de K^+ y de canales Na_v (Jiang *et al.*, 2002b; Jiang *et al.*, 2003a; Jiang *et al.*, 2003b; Long *et al.*, 2005; Payandeh *et al.*, 2011) y la similitud en la secuencia de aminoácidos que comparten éstos con los Ca_v , se ha propuesto una disposición del canal en la cual el extremo extracelular del poro está revestido por las asas del poro de cada dominio, como puede apreciarse en el esquema topológico de la Figura 5, quedando el extremo intracelular del poro delineado por los segmentos S5 y S6. De acuerdo con este planteamiento, cambios conformacionales en los S6 (destacados en rojo en esta figura) repercutirían directamente en la apertura y al cierre del canal, razón por la cual se centró en ellos el presente trabajo de tesis. Por su parte, las cuatro asas del poro forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad, por lo que su secuencia de aminoácidos es un factor determinante para la conductancia, selectividad y afinidad del canal (Catterall, 2000).

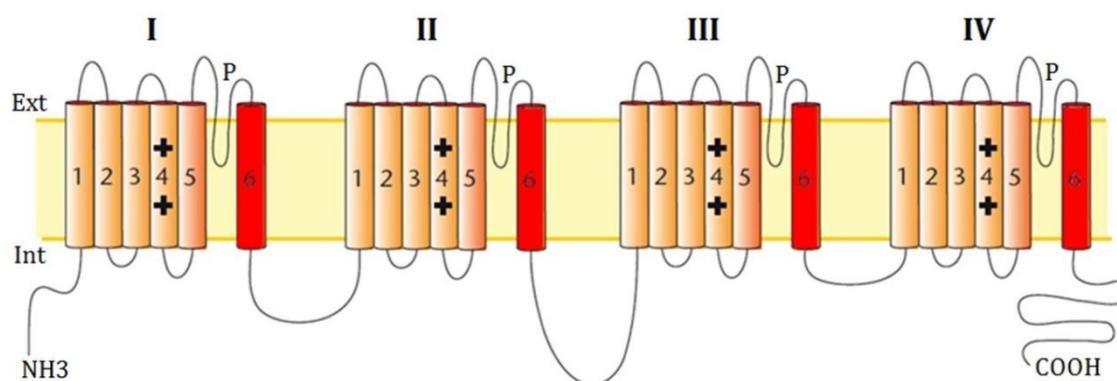


Figura 5. Esquema topológico de la subunidad $\alpha 1$ de los canales Ca_v . La subunidad principal $\alpha 1$ está constituida por cuatro repetidos (dominios I-IV), cada uno con seis segmentos transmembranales (S1-S6). El cuarto de estos segmentos presenta residuos de arginina o lisina (que presentan carga neta positiva) cada 3 posiciones, lo cual le confiere la capacidad de detectar cambios en el V_m , por lo cual se le conoce como sensor de voltaje (S4). Los segmentos S5 y S6 (estos últimos en rojo) de cada dominio delinean el extremo intracelular del poro, mientras las asas que los unen conforman el filtro de selectividad (Modificado de Raja-Rayan & Hanna, 2010).

2.1.4. Cambios conformacionales de los canales Ca_v3

Los canales iónicos son proteínas membranales que tienen la capacidad de cambiar de una conformación cerrada a una abierta en respuesta a un estímulo. Este proceso se denomina *gating*. Como se mencionó en el apartado anterior, la mitad extracelular del poro (donde se encuentra el filtro) se encarga de la selectividad iónica, mientras que la porción intracelular regula el *gating* del canal. Los canales Ca_v transitan entre tres estados conformacionales, dependiendo del potencial de membrana. A potenciales muy negativos, los canales se encuentran en estado de reposo o cerrado. Conforme el V_m adquiere un valor más positivo, esto es, mientras más se despolariza la membrana, los canales transitan a un proceso conocido como activación, resultado del desplazamiento de los sensores de voltaje y el subsecuente movimiento de los segmentos que constituyen la compuerta de activación. De esta forma el canal puede abrirse, permitiendo el paso de los iones a través del poro (Figura 6).

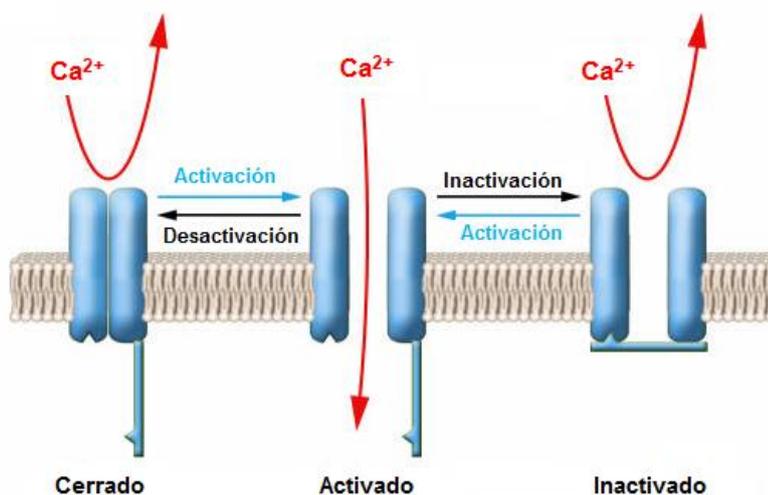


Figura 6. Diagrama simplificado de los cambios conformacionales que sufre un canal Ca_v . La transición del estado cerrado o en reposo al estado abierto conductor de iones se denomina Activación. La transición del estado abierto a uno no conductor de iones, aún cuando la compuerta está abierta (es decir, cuando todavía se encuentra presente el voltaje que lo activo), se denomina Inactivación. Finalmente, la transición del estado abierto al cerrado es conocida como Desactivación (Modificado de George, 2005).

La actividad de los canales de calcio tipo T durante un pulso despolarizante es transitoria debido a la inactivación, otro proceso del *gating* mediado por estructuras diferentes a la compuerta de activación. El elemento o partícula inactivante varía dependiendo del tipo de canal, siendo aún motivo de estudio y debate en los canales Ca_v3 (Marksteiner *et al.*, 2001; Staes *et al.*, 2001). El canal no puede reabrirse hasta que la membrana sea repolarizada y

experimente un proceso conocido como recuperación de la inactivación. Durante la repolarización de la membrana al valor de V_m inicial, los canales que no se inactivaron durante el pulso, se desactivan, esto es, transitan del estado abierto al cerrado.

2.2. Antecedentes estructurales en canales de potasio: KcsA y MthK

La apertura y cierre del poro de un canal iónico en respuesta a un estímulo es un proceso de extrema importancia fisiológica. Para que el poro pueda abrirse, deben ocurrir cambios conformacionales dentro de la vía de conducción iónica transmembranal de la proteína. Debido a que no existe evidencia directa de la estructura de los Ca_v , gran parte del entendimiento de cómo podrían abrirse estos canales proviene de extrapolaciones de estudios de cristalografía y difracción de rayos X realizados en canales de K^+ y de Na^+ activados por voltaje y por ligando (Jiang *et al.*, 2002b; Jiang *et al.*, 2003a; Jiang *et al.*, 2003b; Long *et al.*, 2005; Payandeh *et al.*, 2011).

Estudios electrofisiológicos, bioquímicos y de mutagénesis realizados en canales iónicos por décadas fueron ofreciendo poco a poco un panorama más amplio del funcionamiento de estas fascinantes proteínas, al mismo tiempo que revelaban los múltiples roles fisiológicos de estas proteínas. El aspecto estructural de los canales, no obstante, seguía siendo una incógnita, infiriéndose a partir de información farmacológica y de biología molecular. Fue hasta 1998 cuando el grupo de investigación de Roderick MacKinnon publicó un trabajo que se convertiría en un antecedente estructural de enorme importancia. Este trabajo mostró la estructura cristalizada del canal de potasio KcsA del procarionte *Streptomyces lividans* (activado por pH) en su conformación cerrada, donde las α -hélices internas (M2, segmento análogo del S6 en un Ca_v) de este canal homotetramérico delinean la porción intracelular del poro, formando un haz cerca de la apertura intracelular (Figura 7, izquierda), ocluyendo por lo tanto el poro e impidiendo la conducción iónica (Doyle *et al.*, 1998). Cuatro años más tarde, el mismo laboratorio publicó la cristalización de otra proteína bacteriana: el canal de potasio activado por calcio intracelular MthK (de *Methanobacterium thermoautotrophicum*), que al igual que el KcsA consta de cuatro subunidades con dos segmentos transmembranales cada una, pero que a diferencia de este último mostraba sus segmentos M2 rotados en un ángulo de alrededor de 30° a partir de un residuo localizado río abajo del filtro de selectividad. Tal posición corresponde a una glicina, el aminoácido más pequeño de todos, entre cuyas características se encuentran la capacidad de conferir flexibilidad a una estructura secundaria como una α -hélice, tales como los segmentos M2 de

un canal de potasio. Esta estructura se consideró el arquetipo de un canal de potasio en su conformación abierta (Figura 7, derecha), donde el residuo Gly83 funge como una bisagra a partir de la cual se produce el plegamiento de las hélices que delinear el poro, es decir, la apertura de la compuerta de activación (Jiang *et al.*, 2002a; Jiang *et al.*, 2002b).

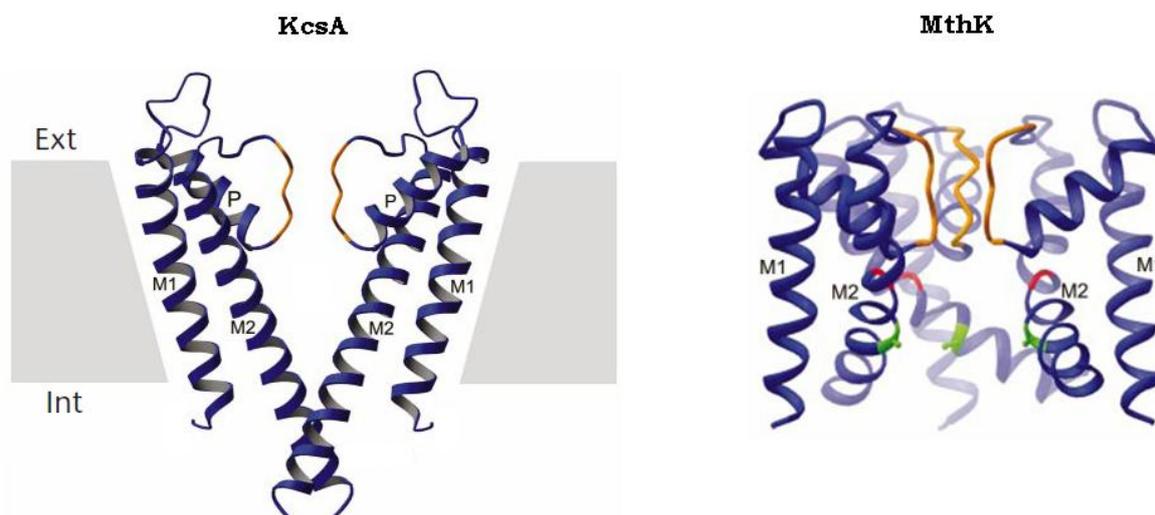


Figura 7. Arquitectura estructural de un canal de potasio en sus estados cerrado y abierto. Representaciones cristalográficas de los canales de potasio KcsA (izquierda) y MthK (derecha). Se muestran dos subunidades para KcsA y tres para MthK. Los segmentos M2 son los análogos de los S6 en canales Ca_v , mientras los M1 lo son de los S5. En KcsA las hélices se entrelazan hacia la apertura intracelular, estando consecuentemente cerrado el canal. El canal MthK, por el contrario, se cristalizó en condiciones de alto Ca^{2+} intracelular, por lo que se presume se encuentra en el estado abierto. Las hélices M2 de este canal están giradas cerca de 30° a partir de una glicina (en rojo). Un alineamiento de canales K^+ arrojó como resultado una conservación muy alta de la glicina bisagra y una alanina/glicina a 5 residuos de distancia (verde) que apunta su cadena lateral hacia el centro del poro, destacando la importancia de que en esa posición se presente un aminoácido con una cadena lateral pequeña para no ocluir el poro e interferir con la conducción iónica. Un residuo en esa posición de tales características no se encuentra en los canales Ca_v3 (Modificado de Jiang *et al.*, 2002b).

2.3. Antecedentes de estudios estructura-función en canales de sodio y de calcio

Un estudio de estructura-función que reforzó la teoría de la existencia de un residuo bisagra en estos canales se llevó a cabo en el canal bacteriano de sodio homotetramérico de seis segmentos transmembranales NaChBac (de *Bacillus halodurans*), en el cual se identificó la glicina equivalente a la presentada por KcsA (Gly99) y MthK (Gly83) en la posición 219 (Zhao *et al.*, 2004). Los experimentos mostrados en este trabajo proporcionaron evidencia funcional para la extrapolación al NaChBac del modelo de *gating* planteado por MacKinnon y colaboradores para canales de potasio. Para ello, se realizó una mutación de la Gly219 por prolina (Pro), con la finalidad de generar una torsión de 21 a 26° en las hélices internas (S6) y

mimetizar la probable conformación abierta del canal. Sus resultados demostraron satisfactoriamente una estabilización del estado abierto del canal, además de favorecer el proceso de activación. Esta conclusión se basó en tres observaciones fundamentales: a) la curva de activación se desplazó notablemente (~ 50 mV) hacia voltajes más hiperpolarizados; b) el decaimiento o inactivación de la corriente durante pulsos despolarizantes trascurrió a una velocidad 1200 veces más lenta; y c) la cinética de desactivación se enlenteció más de 2000 veces (Figura 8). No obstante, estudios similares para determinar la participación de las glicinas bisagra en canales de sodio de mamíferos no se han realizado a la fecha.

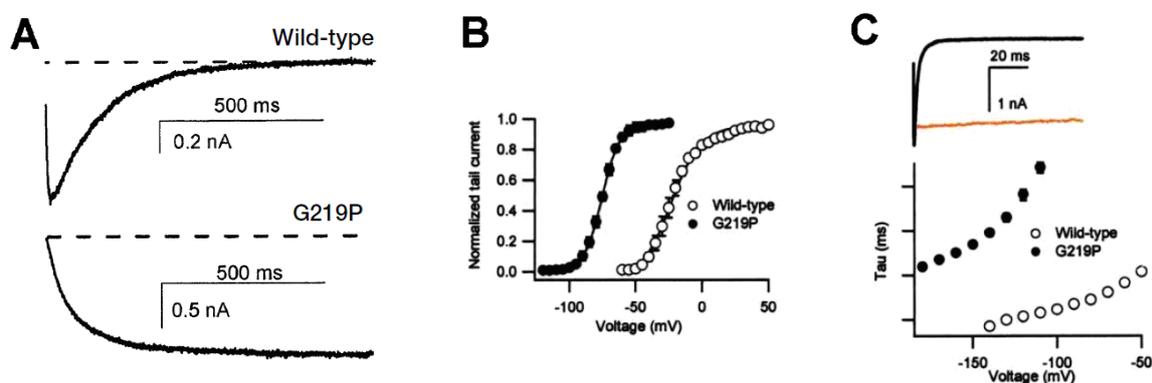


Figura 8. La apertura del canal de sodio NaChBac también es promovida por una glicina bisagra. **A)** Trazos de corriente representativos para el canal NaChBac silvestre (Wild-type) y la construcción mutante G219P. La inactivación se enlenteció 1200 veces durante pulsos despolarizantes de 10 minutos de duración. **B)** La curva de activación se desplazó 51 mV hacia voltajes más hiperpolarizados. La curva se construyó a partir de mediciones de colas de corriente, normalizadas con respecto al valor máximo (*normalized tail currents*), las cuales se grafican contra el voltaje respectivo (*voltage*, en mV). **C)** Cola de corriente representativa describiendo el curso temporal de cierre del canal silvestre (en negro) y la mutante (naranja). En la parte inferior se grafican las constantes de tiempo de desactivación (*tau*) de estos canales en función del voltaje (Modificado de Zhao *et al.*, 2004).

En la última década se ha explorado la posibilidad de que los canales Ca_V presenten un mecanismo de apertura y cierre similar al planteado para canales de sodio y potasio, concebido a partir de las evidencias estructurales y funcionales mencionadas en los párrafos previos. El grupo del Dr. Hering (Hohaus *et al.*, 2005) realizó un escaneo en el segmento IIS6 del canal $Ca_V1.2$, identificando un potencial residuo bisagra (Gly770). No obstante, los cambios más bien discretos que obtuvieron al mutar este sitio por una Pro sugirieron que la existencia de una bisagra en esa posición era poco probable, destacando en cambio la importancia de un motivo de cuatro aminoácidos (Leu-Ala-Ile-Ala, LAIA), donde mutaciones

puntuales por Pro o Thr estabilizaron la conformación abierta del canal al resultar en un cierre más lento (Figura 9A). El mismo grupo de investigación extendió sus observaciones con un estudio posterior, esta vez realizado tanto en el IS6 como en el IIS6 del mismo canal. La introducción de Pro en varios de los aminoácidos que conforman el IS6 (422-424 y 428-439) resultó en su mayoría en la generación de canales no funcionales, incluyendo las potenciales bisagras Gly422, Gly432 y Gly436. Por el contrario, la introducción de Thr en esas mismas posiciones generó canales funcionales pero con un desplazamiento de la curva de activación hacia voltajes más hiperpolarizados, presentándose incluso un desplazamiento aditivo para mutantes dobles (Figura 9, panel B) (Kudrnac *et al.*, 2009).

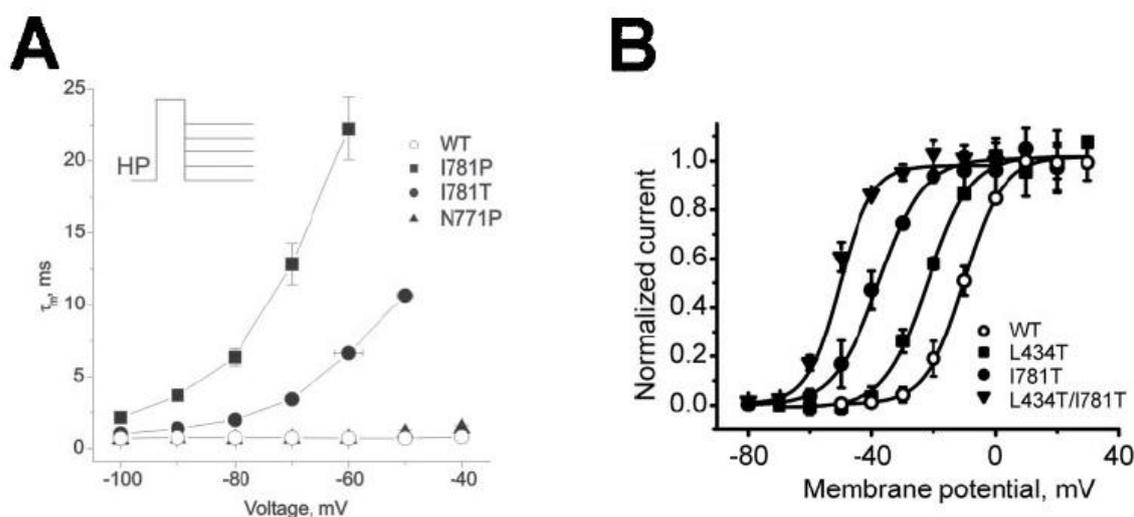


Figura 9. Mutaciones puntuales por Pro y Thr en el IS6 y IIS6 del canal $Ca_v1.2$. **A)** Las constantes de tiempo de desactivación del canal $Ca_v1.2$ silvestre y sus mutantes I781P, I781T y N771P se grafican contra el potencial del pulso de prueba (*Voltage*, en mV). El protocolo utilizado se grafica en la esquina superior izquierda de la figura (Modificado de Hohaus *et al.*, 2005). **B)** Desplazamiento de la curva de activación como resultado de la introducción de Thr en las posiciones Leu434 y/o Ile781. Las curvas se construyeron al graficar la corriente normalizada (*Normalized current*) contra el V_m respectivo (*Membrane potential*). Nótese la naturaleza aditiva del desplazamiento (Modificado de Kudrnac *et al.*, 2009).

En los últimos años se ha publicado un número creciente de estructuras de canales iónicos, tratándose en su mayoría de canales de potasio y algunos catiónicos no selectivos como el NaK, que también presenta un punto bisagra Gly87 (Alam & Jiang, 2009), así como el canal de sodio activado por voltaje de una arqueobacteria (Payandeh *et al.*, 2011). Paralelamente, también han sido publicados varios estudios de estructura-función explorando la potencialidad de glicinas como residuos bisagra (Ding *et al.*, 2005; Hardman *et al.*, 2005; Hardman *et al.*, 2007), demostrando uno de ellos resultados similares al trabajo de Zhao *et al.*

(2004), pero en el residuo Gly466 de *Shaker* (Ding *et al.*, 2005). Empero, a la fecha no existen trabajos encaminados a estudiar el funcionamiento de la compuerta de activación en los canales de calcio tipo T, ni a la injerencia que pudiesen tener residuos de glicina en los segmentos S6 de estos canales. En este tenor, con base en las secuencias de los canales Ca_v3 de humano con los que se cuentan en nuestro laboratorio, se realizaron alineamientos de las secuencia de proteínas y se identificaron los residuos en los segmentos S6 que pudiesen tener la función de actuar como bisagras bajo el modelo de *gating* propuesto en este apartado. De tal manera, se determinó la presencia de glicinas en los dominios I y II (Gly385 y Gly814), que se ubican en la posición equivalente de las glicinas bisagra en los canales de potasio y de sodio. Sin embargo, en los dominios III y IV se presenta una valina (Val1383) y una glutamina (Gln), respectivamente (Figura 10). Resulta interesante que a diferencia de los canales de sodio de vertebrados que sí presentan una glicina en el dominio III, los canales Ca_v3 presenten una valina, por ello este residuo también se consideró como un posible aminoácido bisagra de los canales Ca_v3.3.

MthK	GDYSPSTPLG MYFTVTLIVL	GIGTF(A)VAVE	RLEFLINRE	
KcsA	GDLYPVTLWG RLVAVVMVA	GITSFGLVTA	ALATW(F)VGRE	
NaChBac	RPIFAEVWWS WIYFVIFILV	GTFIV(F)NLFI	GVIVN(N)VEKA	
Na _v 1.1 IS6	LTLRAAGKTY MIFFLVIFL	GSFY(L)INLIL	AVVAMAYEEQ	
Na _v 1.1 IIS6	CMEVAGQAMC LTVFMMVMI	G(N)LVVLN(L)FL	ALLSS(F)SAD	
Na _v 1.1 IIIS6	ELQPKYEESL YLYFVIFIF	GSFF(T)LN(L)FI	GVIID(N)FNQQ	
Na _v 1.1 IVS6	GDCGNPSVGI FFFVSYIIIS	FLVV(V)NMYIA	VILEN(F)SVAT	
Ca _v 3.3 IS6	YVMDAHSFYN FIYFILLIIV	GSFF(M)INLCL	VVIAT(Q)FSET	Gly385
Ca _v 3.3 IIS6	NGMASTSPWA SLYFVALMTF	GNYV(L)FNLLV	AILVEG(F)QAE	Gly814
Ca _v 3.3 IIIS6	QPVTNHNPMW LLYFISFLLI	VSFF(V)LNMFV	G(V)VVEN(F)HKC	Val1383
Ca _v 3.3 IVS6	CLSSLQFVSP LYFVSFVLTA	QFVLIN(V)VA	VLMKHL(D)DSN	

Figura 10. Conservación de residuos de Gly en los segmentos que delinear el interior del poro de los canales iónicos. Alineamiento de las secuencias de los cuatro segmentos S6 de los canales Ca_v3.3 (AAM67414) con el canal de sodio Na_v1.1 (P35498), que presenta residuos de Gly en tres de cuatro segmentos S6, y con los canales MthK (O27564), KcsA (P0A334) y NaChBac (AY376071). Remarcadas en amarillo están las glicinas bisagra propuestas para los canales bacterianos, así como los potenciales residuos bisagra en los canales activados por voltaje Na_v1.1 y Ca_v3.3.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que los canales Ca_v intervienen en numerosos e importantes procesos celulares tanto en organismos eucariotas como procariotas, se desconocen a la fecha aspectos fundamentales de su estructura y su función, y de la relación existente entre ambas. En los últimos 14 años, el aumento en la disponibilidad de estructuras cristalizadas de alta resolución de canales iónicos (Doyle *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2002b; Jiang *et al.*, 2003a; Jiang *et al.*, 2003b; Long *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2010; Payandeh *et al.*, 2011), aunado a estudios funcionales y simulaciones computacionales (Bezanilla, 2008; Stary *et al.*, 2008; Tikhonov & Zhorov, 2011), ha permitido comprender con mayor detalle cómo factores físicos tales como la estructura de la vía de conducción iónica y la interacción de los iones dentro del poro afectan el proceso de permeación. El funcionamiento de la compuerta de activación, elemento esencial en la vía de permeación, ha sido en particular una incógnita que ha sido abordada con técnicas farmacológicas y de mutagénesis. Previamente se han publicado trabajos encaminados a resolver esta interrogante, planteándose múltiples hipótesis sobre el fenómeno mecanístico necesario para que se produzca la apertura del canal. Entre las propuestas más relevantes acerca del accionar de la compuerta de activación, se halla una que plantea la presencia de glicinas (aminoácidos que por su movilidad confieren características tipo bisagra a las proteínas) en los segmentos que delinean la cara interna del poro (Jiang *et al.*, 2002b; Zhao *et al.*, 2004; Magidovich & Yifrach, 2004; Ding *et al.*, 2005), a partir de los cuales se produce el plegamiento de las hélices que conforman estos segmentos, conduciendo a la apertura del canal.

Por otro lado, la clonación de los genes que codifican para los canales de calcio Ca_v3 o tipo T (Cribbs *et al.*, 1998; Perez-Reyes *et al.*, 1998; Gomora *et al.*, 2002) significó un avance sustancial en el área del conocimiento pertinente a estos canales, particularmente en aspectos farmacológicos y de estructura-función. No obstante, un evento tan fundamental como la apertura y cierre de la compuerta de activación no es aún completamente entendido en los canales Ca_v y menos aún en los Ca_v3 . El análisis de las secuencias de las subunidades $\alpha 1$ de los miembros de esta familia revela la presencia de residuos de glicina en dos de sus dominios, lo que permite suponer una posible función de bisagra de estos residuos para la apertura del canal, tal como se ha planteado para los canales de sodio y de potasio activados por voltaje.

Por lo anterior, con el propósito de obtener información original acerca de la relación entre la estructura y la función de estos canales de calcio, concretamente la del canal $Ca_v3.3$, cuya probable participación en procesos fisiopatológicos sería de notable importancia clínica, el presente trabajo de tesis se enfocó en investigar el papel de los potenciales aminoácidos bisagra presentes en los segmentos S6 de los dominios I, II y III.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

Con base en las similitudes entre las secuencias de aminoácidos de los canales de sodio, de potasio y del $Ca_v3.3$, concretamente en la presencia de glicinas en los segmentos transmembranales que forman el poro, entonces los aminoácidos Gly385, Gly814 y Val1383 podrían participar en el mecanismo de apertura del canal $Ca_v3.3$ funcionando como bisagras para la apertura y cierre de la compuerta de activación.

4.2. Objetivo General

Contribuir al entendimiento de la relación existente entre la estructura y la función del canal $Ca_v3.3$, a través del estudio del papel que desempeñan los aminoácidos tipo “bisagra” en los segmentos S6 de los dominios I, II y III del canal $Ca_v3.3$ en el mecanismo de apertura del mismo.

4.3. Objetivos Particulares

1. Construir mutantes del canal $Ca_v3.3$ en las que se sustituyan potenciales residuos bisagra por prolina, alanina, treonina, serina o glicina.
2. Caracterizar las propiedades biofísicas de las corrientes generadas por las construcciones mutantes, y compararlas con las del canal Ca_v3 silvestre para determinar el papel de las mutaciones en el mecanismo de apertura del canal.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Construcción de los canales Ca_v3.3 mutantes

La primera etapa experimental del presente trabajo consistió en la utilización de técnicas de biología molecular para llevar a cabo mutaciones en posiciones específicas de la secuencia de aminoácidos del canal recombinante Ca_v3.3 (Número de acceso en GenBank: AF393329; Gomora *et al.*, 2002). El DNA complementario (cDNA) que codifica para esta subunidad se encuentra subclonado en el vector pcDNA3. En adelante este plásmido será denominado alfa1I (Figura 12A). Tomando en cuenta las ventajas que ofrece el trabajar con porciones reducidas del cDNA codificante completo (menor probabilidad de mutaciones no deseadas y mayor eficiencia de la estrategia de QuikChange), se utilizaron fragmentos del cDNA de Ca_v3.3 subclonados en dos vectores diferentes. En el primero se clonó el fragmento de 2784 pares de bases (pb) que se genera al digerir el plásmido alfa1I con las enzimas ClaI y AvrII. El plásmido alfa1I contiene únicamente un sitio de reconocimiento para ambas enzimas, es decir, ClaI corta el cDNA en el nucleótido de la posición -119 (con respecto al triplete de nucleótidos que codifica para el inicio de la traducción de la proteína del canal), mientras que la enzima AvrII lo hace en la posición 2665. De esta manera el fragmento resultante de 2784 pb fue subclonado en los sitios ClaI y AvrII de la región de clonación múltiple o *polylinker* del vector pBluescript II KS (-), en el cual se generó un sitio AvrII previamente. A esta construcción se le adjudicó el nombre de pBS2KS+a1I(ClaI-AvrII) (Figura 12B). El segundo vector utilizado para subclonar fragmentos de DNA del canal Ca_v3.3 fue pUC19. El fragmento para realizar las mutaciones del dominio II se obtuvo por la digestión del plásmido a1I con la enzima AfeI, para la cual existen dos sitios de corte en dicha construcción (en los nucleótidos 1253 y 2789). El fragmento de 1536 pb así obtenido se subclonó en el vector pUC19 previamente modificado para incluir el sitio para la enzima AfeI en el *polylinker*; esta construcción se denominó pUC19+a1I(AfeI) (Figura 12C). Por último, las mutantes del dominio III del canal Ca_v3.3 se realizaron en el fragmento SacI (2813)-HindIII (4737). Dicho fragmento de 1924 pb se subclonó en el vector pUC19 silvestre y la construcción resultante fue denominada pUC19+a1I(SacI-HindIII) (Figura 12D).

5.1.1. Generación de los fragmentos mutantes

La estrategia original consistió en mutar las Gly “bisagra” de los segmentos I y II del Ca_v3.3 por Ala y Pro. Con base en las propiedades químicas de estos aminoácidos, las sustituciones por Ala se realizan para preservar la estructura de α -hélice de las proteínas, aunque sin las

propiedades de giro proporcionadas por la Gly. Por su parte, la Pro, un aminoácido de conformación excepcionalmente rígida, se caracteriza por interrumpir la estructura de α -hélice, es decir, disminuye la flexibilidad de la cadena peptídica introduciendo un doblez permanente en la hélice (Petsko & Ringe, 2004). Así, con estos aminoácidos se exploran dos conformaciones opuestas de la estructura de α -hélice del segmento S6 y su posible efecto en el mecanismo de activación de los canales $Ca_v3.3$. No obstante, en algunos casos el efecto de la Pro puede ser fatal para el funcionamiento del canal, de tal suerte que la mutación por dicho aminoácido genera canales no funcionales, es decir, no se detectan corrientes iónicas, imposibilitando así el estudio de la mutación sobre el mecanismo de activación. Por tal razón, se procedió a realizar mutaciones adicionales con aminoácidos menos hidrofóbicos y que también son poco frecuentes en la estructura α -hélice de las proteínas, como la treonina (Thr o T) y la serina (Ser o S) (Petsko & Ringe, 2004). En algunos casos en los que la Pro no generó canales funcionales, las mutaciones por estos residuos sí los produjeron, concretamente en las mutantes del dominio III (véase más adelante Figura 16).

La generación de los fragmentos mutantes se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida con la técnica de PCR (siglas en inglés de Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando la estrategia de QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Para llevar a cabo mutaciones puntuales en las posiciones Gly385, Gly814 y Val1383 del canal $Ca_v3.3$, se diseñaron oligonucleótidos específicos que sirvieron como cebadores (*primers*) para las reacciones de PCR (Tabla 1). La longitud de cada par de *primers* varió entre 29 y 36 nucleótidos, siendo las secuencias de los *primers* sentido (F) complementarias con la de los antisentido (R), y ubicándose generalmente la base que se pretende sustituir (mutar) a la mitad de la secuencia. En algunos casos, concretamente para introducir las mutaciones de Ser y Thr los *primers* utilizados fueron parcialmente degenerados. Lo anterior permitió obtener las mutantes de Ser y Thr a partir del mismo par de oligonucleótidos (por ejemplo $Ca_v3.3$ -G814T&S-F, Tabla 1).

Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR simultáneas para cada construcción, estableciendo como variante la cantidad de *primer* adicionado a la reacción (150 ó 250 ng), mientras que la cantidad del DNA molde en ambos casos se mantuvo en 80 ng. Para todas las reacciones se emplearon 2.5 U de la enzima DNA polimerasa *Pfu Ultra* (Stratagene), 5 μ l de Buffer 10X, 1 μ l de dNTPs (100 mM) y se adicionó H_2O hasta alcanzar un volumen de

reacción final de 50 μ l en tubos Eppendorf para PCR. Las reacciones de PCR se realizaron en tres etapas utilizando un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). El programa de termociclado utilizado para cada mutante inició con un ciclo de desnaturalización a 95°C por un minuto, seguido de 18 ciclos consecutivos que incluyeron los siguientes pasos: desnaturalización (40 s a 95°C), hibridación (60 s a 55°C) y extensión (2 min por kb (miles de bases) del DNA molde a 68°C). Por último, una etapa de extensión final de 5 min a 68°C.

Los productos de PCR fueron digeridos con 20 U de la enzima *DpnI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) durante 60 min a 37° C, y nuevamente con 10 U de la misma enzima durante 30 minutos adicionales bajo las mismas condiciones. Este tratamiento permitió eliminar el DNA molde (silvestre), ya que el DNA nuevo (el que contiene la mutación deseada) no es afectado por la actividad de la *DpnI* al no estar metilado.

Tabla 1. Nombre, secuencia y ubicación de los pares de primers utilizados en las reacciones de PCR.

Nombre	Secuencia de par de oligonucleótidos (5' – 3')	Dominio y ubicación en $Ca_v3.3$ (nt)
$Ca_v3.3$ -G385A	F: CCTGCTTATCATAGTG GCC TCCTTCTTCATGATCA R: TGATCATGAAGAAGGA GGC CACTATGATAAGCAGG	I (1137-1171)
$Ca_v3.3$ -G385P	F: TCCTGCTTATCATAGTG CCC TCCTTCTTCATGATC R: GATCATGAAGAAGGA GGG CACTATGATAAGCAGGA	I (1136-1170)
$Ca_v3.3$ -G385T $Ca_v3.3$ -G385S	F: CCTGCTTATCATAGTG WCC TCCTTCTTCATGATCA R: TGATCATGAAGAAGGA GGW CACTATGATAAGCAGG	I (1137-1171)
$Ca_v3.3$ -G814A	F: CCCTCATGACCTTC GCC AACTATGTGCTC R: GAGCACATAGTT GGC CAAGGTCATGAGGG	II (2426-2454)
$Ca_v3.3$ -G814P	F: GTCGCCCTCATGACCTTC CCC AACTATGTGCTCTTC R: GAAGAGCACATAGTT GGG GAAGGTCATGAGGGCGAC	II (2422-2457)
$Ca_v3.3$ -G814T $Ca_v3.3$ -G814S	F: GTCGCCCTCATGACCTTC WCC AACTATGTGCTCTTC R: GAAGAGCACATAGTT GGW GAAGGTCATGAGGGCGAC	II (2422-2457)
$Ca_v3.3$ -V1383G	F: CCTTCCTGCTCATC GGC AGCTTCTTTGTGC R: GCACAAAGAAGCT GCC GATGAGCAGGAAGG	III (4134-4163)
$Ca_v3.3$ -V1383P	F: CCTTCCTGCTCATC CCC AGCTTCTTTGTGC R: GCACAAAGAAGCT GGG GATGAGCAGGAAGG	III (4134-4163)
$Ca_v3.3$ -V1383T $Ca_v3.3$ -V1383S	F: TCCTTCTGCTCATC WCC AGCTTCTTTGTGC R: GCACAAAGAAGCT GGW GATGAGCAGGAAGGA	III (4133-4163)

F, primer sentido; R, primer antisentido. Las bases remarcadas en azul indican el codón que introduce la mutación deseada en la secuencia. W, base degenerada implicando que 50% de los primers contienen una A y 50% una T en esa posición. En la columna de la derecha los números romanos indican el dominio del canal $Ca_v3.3$ donde se ubica la mutación y los números entre paréntesis indican el sitio de hibridación (nucleótidos, nt) de los primers en la secuencia completa del canal $Ca_v3.3$.

5.1.2. Amplificación de los productos de PCR

Los productos de PCR generados en las construcciones de la Figura 12 fueron utilizados para transformar bacterias competentes One Shot TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). El plásmido en cuestión se introdujo a las células bacterianas mediante choque térmico por 75 segundos a 42 °C, tras el cual las bacterias se incubaron inmediatamente en medio SOC (2% Triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa) a 37° C y 225 rpm por un periodo de 60 minutos. Posteriormente, el cultivo en su totalidad se sembró en cajas de Petri con agar solidificado (suplementado con 100 µg/ml de ampicilina), mismas que se incubaron 16-18 h a 37°C. Del total de colonias que crecieron en las cajas de Petri, un número determinado de ellas se seleccionó para su expansión en medio LB (*Lysogeny Broth*) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, con agitación constante (250 rpm) e incubación a 37°C por un periodo máximo de 16 horas. Al cabo de este tiempo, la extracción del DNA plasmídico del cultivo bacteriano se llevó a cabo mediante lisis alcalina y precipitación de DNA.

El DNA amplificado se digirió con enzimas de restricción y se separó mediante electroforesis en geles de agarosa preparados al 1% en buffer TBE con 50 ng/ml de bromuro de etidio y sometidos a una diferencia de potencial de 10 V/cm. Para estimar el tamaño molecular de los productos separados, se corrieron en el mismo gel marcadores de peso molecular de 1 kb y de 100 pb (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Las bandas de DNA se visualizaron por exposición a luz ultravioleta en un transiluminador (UVP Inc., Upland, CA, EUA), se documentaron (fotografiaron) digitalmente y se almacenaron en una computadora utilizando el sistema de captura y análisis de imágenes DigiDoc-It (UVP Inc.). La presencia de la mutación deseada, así como la ausencia de mutaciones no deseadas, se confirmó mediante secuenciación automatizada del DNA en cuestión. Esto se realizó con el apoyo técnico de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular y de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, ambos de la UNAM. Una vez confirmada la presencia de la mutación en la secuencia del fragmento, se procedió a reincorporarlo al plásmido alfaII mediante digestión enzimática y ligación. Para fines prácticos este procedimiento experimental se describirá con detalle en el apartado 6.1 de Resultados.

Finalmente el DNA de cada una de las mutantes del canal Ca_v3.3 se amplificó mediante transformación de bacterias One Shot TOP10, como se describió previamente. En

este caso, con el propósito de obtener un DNA de alta calidad para utilizarse en la transfección de células HEK-293 (véase más adelante), la purificación del DNA amplificado se realizó con el kit QIAprep Miniprep o QIAfilter Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El DNA purificado fue verificado mediante secuenciación automatizada nuevamente, antes de utilizarse en las transfecciones. El análisis bioinformático de las secuencias de los DNA estudiados en esta disertación se llevó a cabo con el software DNASIS MAX (MiraiBio Group, San Francisco, CA, EUA). El algoritmo de elección para efectuar el alineamiento automático fue ClustalW. Los nombres de las construcciones mutantes sencillas obtenidas se presentan en la Tabla 1. Adicionalmente se construyeron mutantes dobles a partir de las mutantes sencillas de los dominios I y II, las cuales se denominaron Ca_v3.3-G385A/G814A y Ca_v3.3-G385P/G814P, en las cuales se sustituyeron ambas glicinas por alaninas y prolinas respectivamente.

5.2. Cultivo celular: células HEK-293

La línea celular HEK-293 (ATCC, Manassas, VA, EUA) fue utilizada en el presente trabajo como sistema de expresión heterólogo para los canales Ca_v3.3. Establecida a partir de un tumor renal de embrión humano, las células HEK-293 no expresan corrientes de calcio endógenas, por lo que constituye un excelente modelo para el estudio de canales Ca_v3 clonados de humano. El cultivo celular de HEK-293 fue crecido en monocapas en cajas Petri de plástico de 100 mm de diámetro en una atmósfera saturada de agua a 37°C y con una composición de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Las células se mantuvieron con medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. El cultivo fue regenerado cuando la confluencia de la monocapa se encontraba alrededor del 90 a 95%, lo cual ocurrió cada 3-4 días. Para ello, el medio de cultivo fue retirado por aspiración con una pipeta Pasteur y las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS; en mM: 154 NaCl, 3 Na₂HPO₄ y 1.06 KH₂PO₄, pH 7.2), para ser despegadas a continuación con una solución que contiene 0.05% de tripsina y 0.53 mM EDTA en una solución balanceada de Hanks libre de calcio. Posteriormente, las células se disociaron mecánicamente utilizando pipetas serológicas y 10 ml de DMEM completo. Las células se sembraron a una densidad 10 veces menor en una caja Petri nueva. A partir de esta misma suspensión celular se sembraron células en cajas Petri de 35 mm a una densidad de 4.0 - 6.0 x 10⁵ células en un volumen final de 2 ml de DMEM completo, las cuales se utilizaron para las transfecciones.

5.3. Transfección de canales $Ca_v3.3$

Los experimentos de transfección se realizaron cuando la monocapa de células se encontraba alrededor del 60-75% de confluencia. El medio de cultivo se recambió 45 min antes de iniciar la transfección, sustituyéndolo por 1 ml de DMEM completo fresco. Para cada ensayo se prepararon dos soluciones: la primera compuesta por 2.5 a 3 μg de DNA del canal a expresar (véase más adelante) diluidos en un volumen final de 100 μl con 150 mM NaCl; y la segunda conteniendo 5 μl del agente transfectante JetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia) y 95 μl de 150 mM NaCl. Ambas soluciones se mezclaron (complejo de transfección) y se incubaron a temperatura ambiente por un lapso de 30 min, tras el cual se adicionaron los 200 μl del complejo a las células cultivadas en la caja Petri de 35 mm, la que denominaremos caja de transfección a partir de ahora. Las células se incubaron en estas condiciones por un lapso de 3 a 3.5 h, al término del cual se retiró el medio de transfección y se sustituyó por 2 ml de DMEM completo fresco. Finalmente, las cajas de transfección fueron incubadas durante 20 horas adicionales. Después de transcurrir 24 horas de iniciada la transfección, la monocapa de células se despegó empleando el mismo procedimiento explicado en el apartado anterior y una alícuota de la suspensión celular se sembró en cajas Petri de 35 mm conteniendo pedazos de cubreobjetos de vidrio de 5 x 5 mm y 2 ml de DMEM completo. Las células contenidas en estas cajas se incubaron durante un mínimo de 2 h y un máximo de 14 h antes de ser utilizadas para registro electrofisiológico. La caja de transfección, con el resto de las células transfectadas, se mantuvo en incubación también (con 2 ml de DMEM completo) hasta el día siguiente, cuando se repitió una vez más el procedimiento. Las células transfectadas transitoriamente se utilizaron para registro electrofisiológico por un máximo de 3 días posteriores a la transfección.

Dos ensayos diferentes de transfección se llevaron a cabo: en el primer caso, una cotransfección de 2.5-3 μg del plásmido pcDNA3 donde se insertó el DNA del canal a explorar y 0.15 μg del plásmido que contiene el DNA de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés); en el segundo caso, 2.5-3 μg del plásmido pAC-LT9 que contiene el DNA del canal a explorar, así como el DNA que codifica para la GFP, de tal suerte que la expresión de esta información es un canal que contiene a la proteína GFP fusionada en su amino terminal. Este último tipo de transfecciones se emplearon también para ensayos de localización, como se explica más adelante en el apartado 5.5.

5.4. Electrofisiología

5.4.1. Experimentos de fijación de voltaje con la técnica de patch clamp

En el presente trabajo se utilizó la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*) en la configuración de célula completa (*whole-cell*) (Hamill *et al.*, 1981; Marty & Neher, 1995), para el registro electrofisiológico de las corrientes macroscópicas transportadas por los canales $Ca_v3.3$. El sistema de registro consistió en un amplificador de *patch clamp* Axopatch 200B, conectado directamente a una interfase Digidata 1322 A/D. Esta última convierte las señales analógicas provenientes de la célula en señales digitales para su ulterior almacenamiento en el disco duro de una computadora, empleando para ello el paquete de software pClamp 9.02. Con este software se diseñaron y aplicaron los protocolos de voltaje utilizados para el registro electrofisiológico. Todos los componentes anteriores se obtuvieron de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EUA), y se dispusieron como se esquematiza en la Figura 11.

La condición fundamental de esta técnica consiste en la obtención de un sello de muy alta resistencia (en el orden de los giga ohmios, $1 \times 10^9 \Omega$) entre la punta de la pipeta de registro y la membrana plasmática de la célula, lo cual se logra posicionando la punta de la pipeta sobre la membrana y aplicando presión negativa hasta la consecución de un sello de tal magnitud. Una vez cumplida esta condición, se aplica un valor de voltaje estacionario desde el electrodo de plata contenido en el interior de la pipeta al que se denomina potencial de mantenimiento (HP, por sus siglas en inglés). En los experimentos realizados en este trabajo dicho valor fue invariablemente de -100 mV. Acto seguido se rompe el parche de membrana bajo la punta de la pipeta, permitiendo un continuo entre la solución interna de la pipeta y el citoplasma de la célula y estableciéndose entonces la configuración de célula completa. Como consecuencia de la adición del valor de la capacitancia membranal de la célula bajo estudio, se ven incrementados los transitorios capacitivos asociados a la instalación y terminación de pulsos breves de voltaje de +5 mV, los cuales son cancelados de manera analógica desde el amplificador de *patch clamp*. Cumplidas estas condiciones, se procedió al registro de corrientes de Ca^{2+} mediante la aplicación de protocolos de voltaje (ver sección 5.4.3).

Para llevar a cabo el registro electrofisiológico de la actividad macroscópica de los canales $Ca_v3.3$, primeramente fue transportado un cubreobjetos con células transfectadas desde la incubadora hasta una cámara de registro montada sobre la platina de un microscopio óptico invertido (modelos Eclipse TE300 o Eclipse TE200-U, Nikon, Japón). La solución

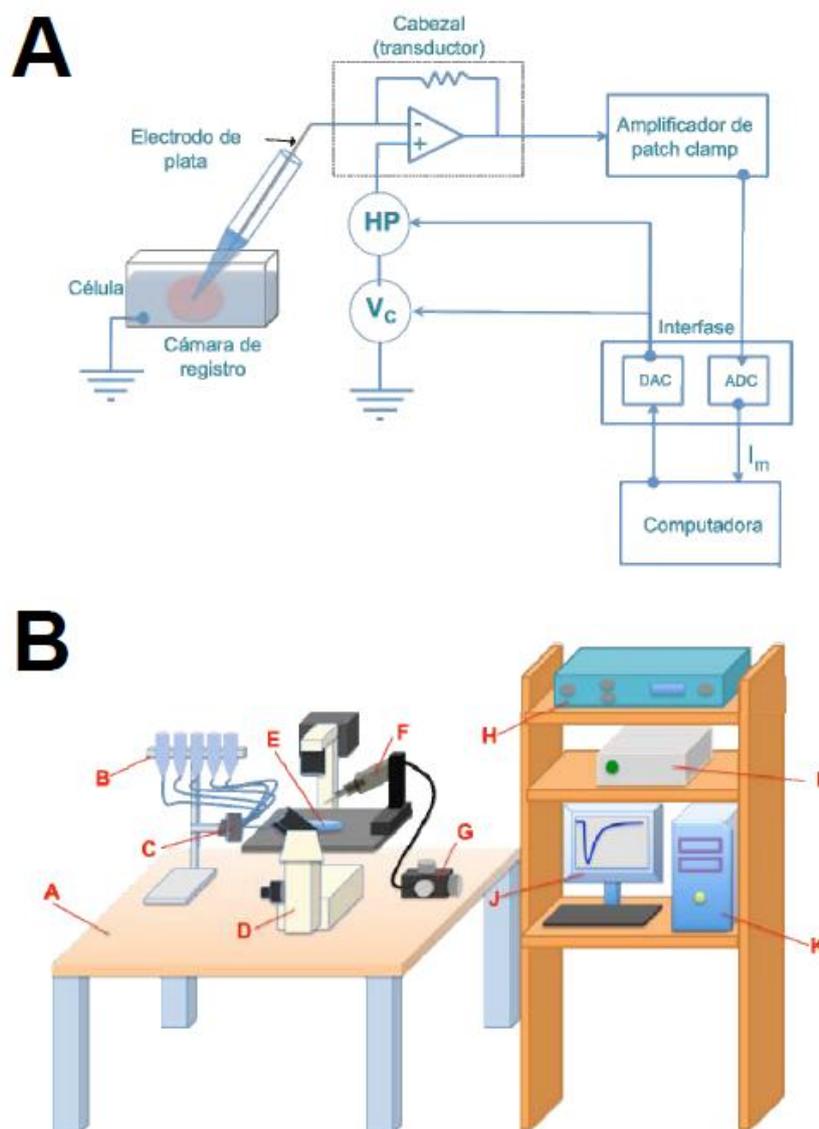


Figura 11. Representación esquemática del sistema de registro electrofisiológico. A) El amplificador operacional situado en el cabezal (*headstage*) controla el valor de voltaje del electrodo de plata, cuantificando simultáneamente la corriente iónica que fluye a través de la membrana plasmática de la célula bajo estudio (I_m). Dicha información es enviada al amplificador de *patch clamp*, el cual permite a su vez cancelar manualmente las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y terminación de pulsos despolarizantes. La señal de la corriente es transferida entonces al convertidor analógico-digital (ADC) de la interfase, la cual digitaliza las señales analógicas para su almacenamiento en el disco duro de la computadora. El potencial de mantenimiento (HP) y los pulsos comando (V_C) se establecen desde la computadora y son transformados en el convertidor digital-analógico (DAC) de la interfase. La formación del sello, la compensación de las espigas capacitivas y las corrientes iónicas son visualizadas en el monitor de la computadora. B) *Setup* de registro electrofisiológico utilizado para los experimentos, el cual está conformado por los siguientes elementos: mesa antivibratoria (A); sistema de perfusión (B); válvula de seis vías de entrada y una salida común (C); microscopio óptico invertido (D); cámara de registro (E); cabezal o *headstage* (F); micromanipulador (G); amplificador de *patch clamp* (H); interfase (I); monitor (J); computadora (K). (Modificado de Lopez-Charcas, 2011).

contenida en la cámara, denominada solución externa de registro (para su composición, refiérase a Soluciones de Registro más adelante), fue recambiada mediante un sistema de perfusión constante impulsado por gravedad (~ 1 ml/min) y controlado por una válvula de seis vías. Las células fueron visualizadas en un aumento de 200X, y la selección de células a registrar obedeció a la detección de la emisión de fluorescencia verde de algunas de ellas a longitudes de onda de entre 510 y 560 nm. Las células se comenzaron a investigar alrededor de 5 min después de haber sido colocadas en la cámara de registro, reemplazándose el cubreobjetos por uno nuevo aproximadamente cada hora.

Durante la adquisición de los datos electrofisiológicos se cumplieron varias condiciones. La velocidad con la que el sistema de *patch clamp* es capaz de fijar el voltaje en la membrana plasmática está determinada por dos factores principalmente: la capacitancia membranal (C_m) de la célula registrada (en pico Faradios, pF); y la resistencia en serie (R_s , en mega ohmios, $M\Omega$), definida como la adición de la resistencia de acceso de la membrana celular y la resistencia de la pipeta de registro ($R_{acceso} + R_{pipeta}$). El producto de C_m por R_s determina la constante de tiempo (τ , en μs) con la que el amplificador es capaz de instalar un cambio en el V_m como resultado de la aplicación de un pulso. Con la finalidad de asegurar una resolución temporal adecuada para el registro de las corrientes iónicas, y consecuentemente contar con registros electrofisiológicos de calidad, en los experimentos presentados en este trabajo se procuró que tal producto no excediera los 60 μs . Ambos parámetros (C_m y R_s) se cancelaron analógicamente con el amplificador previo a la aplicación de pulsos comando para el registro, reajustándose a lo largo del experimento según fuese necesario. Las señales de corriente registradas fueron filtradas a 5 kHz, con excepción del registro de colas de corriente, en cuyo caso se filtraron a 10 kHz. Lo anterior se estableció con la finalidad de obtener una mejor resolución de la corriente y evitar la pérdida de información en la señal adquirida, debido a la alta velocidad con la que se lleva a cabo el cierre del canal $Ca_v3.3$. Las señales fueron digitalizadas a diferentes intervalos de tiempo dependiendo del protocolo de voltaje aplicado y almacenadas en el disco duro de la computadora para su posterior análisis.

5.4.2. Soluciones y pipetas de registro

Los registros se obtuvieron a una temperatura de entre 20 y 23°C, utilizando dos soluciones: una solución externa, compuesta de (en mM) 160 cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl), 5 $CaCl_2$ y 10 HEPES, con pH 7.4 ajustado con hidróxido de tetraetilamonio (TEA-OH) y una osmolaridad de 300-310 mOsm; y una solución interna o de pipeta de registro, compuesta de

(en mM) 130 CsCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 4 MgATP, 0.3 TrisGTP y 10 HEPES, con pH 7.3 ajustado con hidróxido de cesio (CsOH) y una osmolaridad de 290 mOsm. Se adicionó ATP y GTP a la solución interna con la intención de evitar el fenómeno de decaimiento (*rundown*) observado en algunos canales de calcio, que consiste en la disminución de la amplitud de la corriente iónica en función del tiempo en la configuración de célula completa.

Las pipetas de registro utilizadas para los experimentos electrofisiológicos se construyeron a partir de capilares de borosilicato (TW150-3, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA), los cuales fueron cortados con un estirador horizontal (modelo P-97, Sutter Instrument Company, Novato, CA, EUA). Las puntas de las pipetas así generadas fueron pulidas al calor utilizando una microforja (modelo MF-830, Narishigue Co., Tokio, Japón). Para los registros electrofisiológicos se usaron sólo aquellas pipetas cuya resistencia oscilara entre los 2 y 3 MΩ después de haber sido llenadas con la solución interna de registro.

5.4.3. Protocolos de voltaje

Las corrientes registradas en los canales Ca_v3.3 fueron inducidas mediante protocolos de voltaje. Éstos consistieron en pulsos comando de voltaje de amplitud y duración variable, cuyas características se enumeran a continuación. En todos los casos el HP fue de -100 mV.

5.4.3.1. *sp-30500*

Consistió en la aplicación repetida de un pulso único a -30 mV de 500 ms de duración, aplicado con una frecuencia de 0.1 Hz (cada 10 s). Bajo las condiciones de registro enumeradas en el apartado 5.4.2, se ha observado en nuestro laboratorio que la corriente de calcio (I_{Ca}) que entra a la célula a través del canal Ca_v3.3 alcanza su valor máximo alrededor de los -30 mV. Por consiguiente, la aplicación de este protocolo nos permitió obtener una aproximación de la amplitud máxima de la corriente, así como la estabilidad de la célula bajo estudio.

5.4.3.2. *I-V500*

Consistió en la aplicación de una serie de pulsos despolarizantes de 500 ms en incrementos de 10 mV, desde -80 hasta +80 mV, aplicados con una frecuencia de 0.1 Hz. Los trazos de corriente resultantes se utilizaron para construir las curvas corriente-voltaje ($I-V$) y para el análisis de la cinética de activación e inactivación de la I_{Ca} .

5.4.3.3. *Hinf15-100i*

Protocolo diseñado para determinar la inactivación en el estado estacionario de los $Ca_v3.3$, consistió en la aplicación de dos pulsos de voltaje consecutivos: el primero, un prepulso de 15 s de duración que llevó el potencial de membrana a diferentes valores, desde -110 hasta -45 mV; el segundo, un pulso de prueba de 500 ms de duración a -30 mV.

5.4.3.4. *iiv10ms60-2ch*

Protocolo de colas de corriente empleado para obtener información pertinente sobre el proceso de desactivación de los canales $Ca_v3.3$. Consistió en dos pulsos de voltaje consecutivos: el primero, una breve (2 ms) pero fuerte despolarización a +60 mV con el objetivo de activar prácticamente a todos los canales presentes en la membrana plasmática, sin dar oportunidad a que ocurra la transición de los mismos hacia el estado inactivado; el segundo, un pulso de 40 ms de duración en incrementos de 10 mV, desde -120 hasta +80 mV, con la finalidad de repolarizar la membrana y generar colas de corriente que reflejan el curso temporal con el que se cierran los canales que fueron abiertos por el pulso a +60 mV.

5.4.3.5. *recover-100i*

Consistió en la aplicación de dos pulsos de voltaje a -30 mV, el primero de 500 ms de duración y el segundo de 60 ms. El intervalo de tiempo transcurrido entre la aplicación del primero y segundo pulso varió entre 1 y 2000 ms, manteniéndose el HP a -100 mV entre pulsos. La utilidad de este protocolo radica en que puede utilizarse para estimar el tiempo que requieren los canales para abandonar el estado inactivado y estar disponibles nuevamente para su activación.

5.4.4. Análisis de datos electrofisiológicos

El análisis de los registros electrofisiológicos se llevó a cabo con los programas Clampfit 9.02 (Molecular Devices), Prism 5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) y Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). Para analizar la dependencia al voltaje de la activación de la corriente de Ca^{2+} generada por los canales, los datos de las curvas $I-V$ fueron ajustados con una ecuación de Boltzmann modificada:

$$I = \frac{I_{\max} (V_m - V_{inv})}{1 + \exp\left(\frac{V_{1/2} - V_m}{k}\right)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde I_{\max} es la corriente máxima observada, V_m el potencial de membrana respectivo, V_{inv} el potencial de inversión de la corriente, $V_{1/2}$ el voltaje al cual se alcanza el 50% de la I_{\max} , y k la pendiente de la relación de I - V .

Los datos de inactivación en el estado estacionario se ajustaron con una función de Boltzmann como se muestra a continuación:

$$I_{Ca} = \frac{I_{\max}}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{1/2}}{k}\right)} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde I_{Ca} es la fracción de la corriente inactivada a un voltaje dado, I_{\max} la corriente máxima, $V_{1/2}$ el voltaje al cual se inactiva la mitad de los canales disponibles, V_m el potencial de membrana, y k la pendiente de la relación, es decir, una medida de la tasa de cambio con la que los canales se inactivan en función del voltaje.

La cinética de activación e inactivación de los trazos de corriente fue analizada mediante su ajuste con una función biexponencial, a partir de las cuales se obtuvieron constantes de tiempo (τ o τ) de activación e inactivación respectivamente. La cinética de desactivación o cierre del canal (τ_{desac}), por su parte, fue analizada mediante el ajuste de las colas de corriente con dos funciones exponenciales. A partir de los valores de amplitud y constante de tiempo obtenidos con cada uno de los ajustes, pudo calcularse una constante de tiempo ponderada (Frazier *et al.*, 2001; Gomora *et al.*, 2002) de la siguiente forma:

$$\tau_{\text{ponderada}} = A_1\tau_1 + A_2\tau_2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde A_1 y A_2 son la amplitud normalizada de los componentes rápido y lento, y τ_1 y τ_2 son las constantes de tiempo respectivas. La τ ponderada calculada de esta forma refleja adecuadamente la dependencia al voltaje de ambos componentes; los valores así obtenidos se compararon entre las diferentes condiciones experimentales. Por otra parte, los datos obtenidos con el protocolo de recuperación de la inactivación se ajustaron con una función exponencial, a partir de la cual se obtuvo una constante de tiempo (τ_h) que describe el curso temporal con el que los canales abandonan el estado inactivado, quedando disponibles nuevamente para su activación.

Todos los resultados en este trabajo de tesis se expresan como la media \pm el error estándar de la media (ESM) de los valores obtenidos en diferentes células. Con la finalidad de determinar la significancia estadística, se optó por la comparación entre medias con la *t* de Student para muestras no pareadas y el Análisis de Varianza (ANOVA) para comparar más de dos medias. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de P fue inferior a 0.05.

5.5. Microscopía confocal

Paralelamente al registro de las propiedades biofísicas de los canales, se llevaron a cabo experimentos de microscopía confocal para investigar la localización membranal de los canales Cav3.3 fusionados a la GFP. Los ensayos de transfección se llevaron a cabo como se indica al final del apartado 5.3, con la salvedad de que para los ensayos de microscopía confocal se sembraron paralelamente alícuotas de células transfectadas a una densidad del 30 al 40% en placas FluoroDish (FD35PDL-100, World Precision Instruments) y se incubaron en condiciones estándar durante 8 horas. Previo a la observación en el microscopio, se retiraron los 2 ml de medio de la placa FluoroDish con la finalidad de retirar las células no adheridas que pudiesen interferir con la adquisición de las imágenes, adicionándose acto seguido 500 μ l de medio DMEM fresco. La membrana celular se tiñó agregando 10 μ l (de un stock 1.64 μ M) del marcador FM4-64 (Invitrogen) directamente sobre la muestra. La observación y la adquisición de imágenes se realizaron empleando un microscopio confocal FluoView FV1000 (Shinjuku, Tokio, Japón) y los siguientes parámetros:

- a) Objetivo: UPLSAPO 60X
- b) Apertura numérica del objetivo: 1.45
- c) Apertura del confocal (C.A.): 285 μ m
- d) Velocidad de muestreo: 20 μ s/píxel
- e) Fluoróforos utilizados: EGFP (señal verde); Rhodamine Red-X (señal roja)
- f) Longitudes de onda de la señal verde: 488 nm (excitación); 510 nm (emisión)
- g) Longitudes de onda de la señal roja: 543 nm (excitación); 591 nm (emisión)
- h) Intensidad del láser: 1% a 488 nm; 3% a 543 nm
- i) Umbral de detección del fotomultiplicador: 700 V (señal verde); 610 V (señal roja)

VI. RESULTADOS

6.1. Construcción de las mutantes del canal $Ca_v3.3$

6.1.1. Subclonación de fragmentos del canal $Ca_v3.3$

La construcción de las diferentes mutantes del $Ca_v3.3$ se llevó a cabo mediante la aplicación de técnicas de biología molecular. Las construcciones utilizadas para generar los fragmentos mutantes del canal $Ca_v3.3$ se esquematizan en la Figura 12.

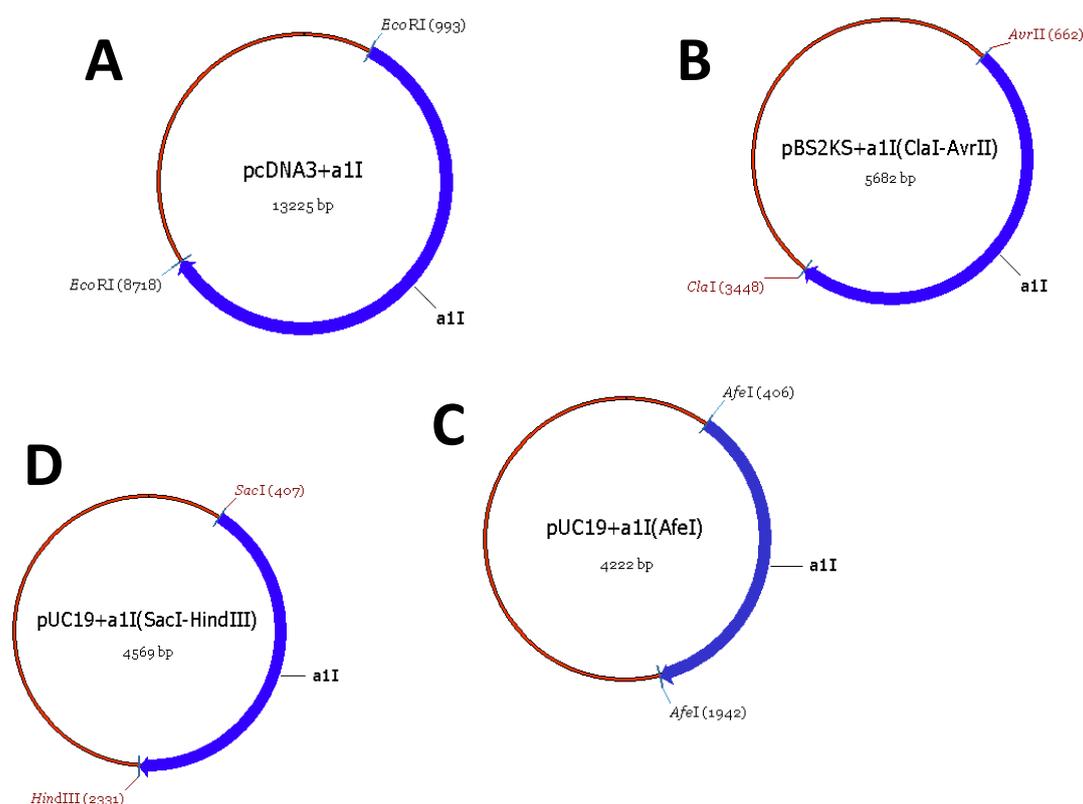


Figura 12. Construcciones utilizadas en la generación de los fragmentos mutantes del canal $Ca_v3.3$. A) El cDNA completo del canal $Ca_v3.3$ se encuentra clonado en el sitio *EcoRI* del vector de expresión pcDNA3. B) Un fragmento de dicho canal correspondiente al dominio I se subclonó en los sitios *ClaI-AvrII* del vector pBluescript II KS (-). C) Otro fragmento correspondiente al dominio II en el sitio *AfeI* del vector pUC19 modificado. D) Un tercer fragmento que incluye el dominio III en los sitios *SacI-HindIII* de pUC19 silvestre. Los números entre paréntesis se refieren a la posición del nucleótido (base) donde corta la enzima el plásmido correspondiente. La secuencia completa del cDNA de $Ca_v3.3$ es de 7725 pb, con un marco de lectura que genera una proteína de 2188 aminoácidos.

6.1.2. Generación de las mutantes del dominio I

Para la generación de las mutantes $Ca_v3.3$ -G385A, $Ca_v3.3$ -G385P, $Ca_v3.3$ -G385S y $Ca_v3.3$ -G385T se utilizó la construcción pBS2KS+a1I(ClaI-AvrII) como molde en las reacciones de

PCR tal como se describe en la sección 5.1 de Métodos. En el caso de la construcción G385A, se realizó una sustitución única de la base purínica guanina 1154 por una pirimidínica citosina, obteniendo como resultado el codón mutante GCC (Ala) en lugar del silvestre GGC (Gly), mientras que para poder generar la mutante G385P fue necesario sustituir dos guaninas por dos citosinas (bases 1153 y 1154), obteniendo el codón CCC codificante para Pro. Una vez obtenida y confirmada la mutante G385A, se utilizó como molde para la generación de G385S y G385T, llevándose a cabo una sustitución de una sola base (guanina 1153) en cada caso, cambiando el codón codificante para Ala por un codón TCC (Ser) o ACC (Thr). Todas las construcciones parciales contenidas en el vector pBS2KS+ α 1I(ClaI-AvrII) se reintegraron a la construcción completa del canal Ca_v3.3 utilizando la estrategia mostrada en el panel A de la Figura 13. Se utilizaron las enzimas *ClaI* y *BsrGI* para digerir el plásmido α 1I, lo cual generó un fragmento de 9053 pb (fragmento IA) y otro de 4172 pb; paralelamente, otra alícuota de la misma construcción se digirió con *AvrII* y *BsrGI*, a partir de lo cual se obtuvieron fragmentos de 7056, 4781 y 1388 (fragmento IB) pb. Por su parte, la mutante G385A contenida en el vector pBS2KS+ α 1I(ClaI-AvrII) se sometió a una triple digestión enzimática con *ClaI*, *AvrII* y *ApaLI*, lo que generó fragmentos de 2786 (fragmento IC), 1246, 909 y 741 pb. Los productos de las digestiones enzimáticas se separaron en geles de agarosa, de donde se recuperaron los fragmentos de DNA de 9053, 1388 y 2786 pb, respectivamente (Figura 13B). Los tres fragmentos se ligaron con 1 μ l (20 U) de ligasa (*T4 DNA Ligase*, New England Biolabs), en reacciones de ligación de 20 μ l de volumen final.

6.1.3. Generación de las mutantes del dominio II

La generación de la mutante G814A se logró al introducir una citosina en lugar de la guanina 2441 de la secuencia genética (codón GCC, Ala), realizando una sustitución doble en las bases 2440 y 2441 (GG por CC) para poder obtener la mutante G814P, procedimiento similar al empleado para obtener las mutantes del dominio I. La mutante G814P se utilizó como molde para construir las variantes G814S y G814T, para lo cual se mutó la base 2440 por una T o una A, resultando en el codón TCC o ACC (codificantes para Ser y Thr respectivamente). Las mutantes contenidas en pUC19+ α 1I(AfeI) se digirieron con la enzima *AfeI*, generando fragmentos de 2686 y 1536 pb, reintegrándose este último a la secuencia completa al ligarlo con el fragmento de 11689 pb obtenido de digerir a la construcción pcDNA3+ α 1I con la misma enzima (Figura 14A). Se purificaron y ligaron los fragmentos con el procedimiento previamente descrito (Figura 14B).

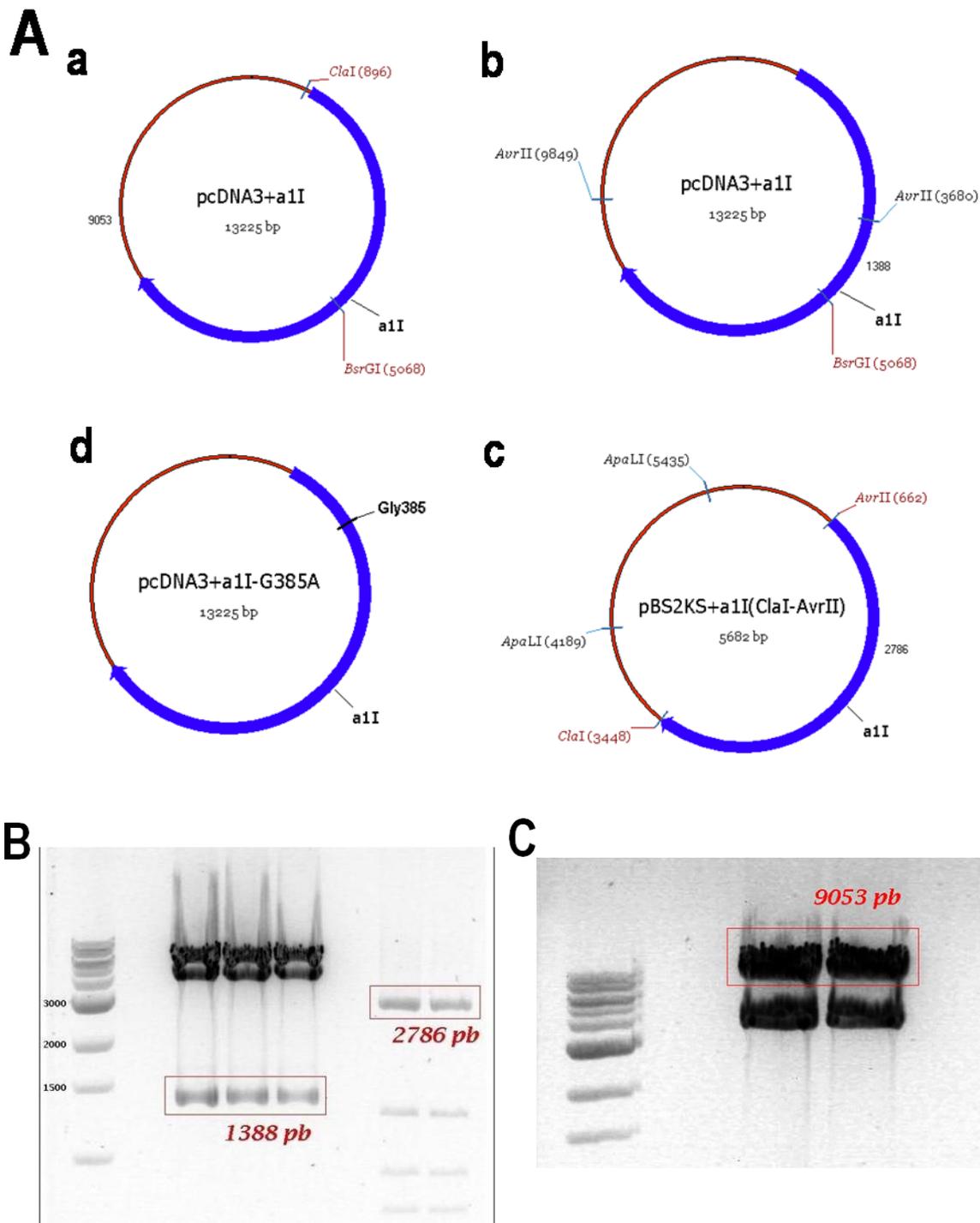


Figura 13. Esquema de la estrategia para la reincorporación de los fragmentos mutantes de $Ca_v3.3$ correspondientes al dominio I. **A)** El vector pcDNA3 con el canal completo se cortó en dos reacciones independientes, una con *ClaI* y *BsrGI* (**a**), y otra con *AvrII* y *BsrGI* (**b**) generando fragmentos de 9053 (FA) y de 1388 (FB) pb respectivamente. La construcción pBS2KS+a1I(ClaI-AvrII), a la cual se le introdujo la mutación G385A por PCR, fue digerida con las enzimas *ApaLI*, *AvrII* y *ClaI* (**c**) para aislar el fragmento mutante de 2786 pb (FC). Estos tres fragmentos se purificaron y ligaron para generar el canal mutante (**d**). **B)** Identificación y separación de las bandas de 2786 pb (fragmento mutante) y de 1388 pb mediante electroforesis en gel de agarosa. **C)** Identificación y separación de la banda de 9053 pb.

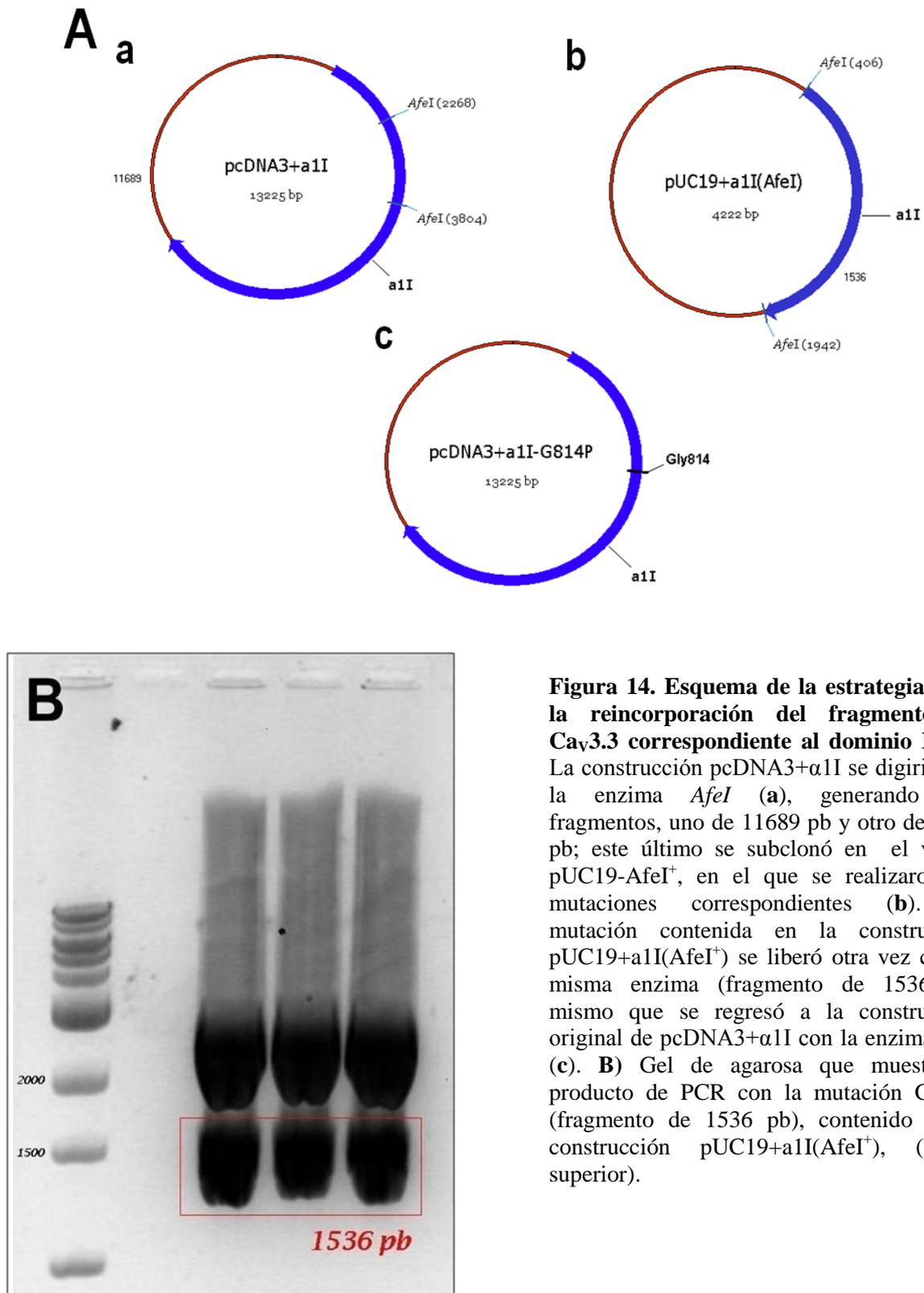


Figura 14. Esquema de la estrategia para la reincorporación del fragmento de Cav3.3 correspondiente al dominio II. A) La construcción pcDNA3+a1I se digirió con la enzima *AfeI* (a), generando dos fragmentos, uno de 11689 pb y otro de 1536 pb; este último se subclonó en el vector pUC19-AfeI⁺, en el que se realizaron las mutaciones correspondientes (b). La mutación contenida en la construcción pUC19+a1I(AfeI⁺) se liberó otra vez con la misma enzima (fragmento de 1536 pb) mismo que se regresó a la construcción original de pcDNA3+a1I con la enzima *AfeI* (c). **B)** Gel de agarosa que muestra el producto de PCR con la mutación G814S (fragmento de 1536 pb), contenido en la construcción pUC19+a1I(AfeI⁺), (banda superior).

6.1.4. Generación de las mutantes del dominio III

Contrario a los dominios I y II, el dominio III no contiene una Gly en el sitio de interés, encontrándose en su lugar una Val (Figura 10), por lo que se decidió introducir una Gly en lugar de la Val presente para estudiar el papel de ésta en el mecanismo de *gating* del canal $Ca_v3.3$. Lo anterior se logró introduciendo una guanina en lugar de la timina silvestre 4148 para obtener una secuencia con el codón mutante GGC (Gly) en lugar de TGC (Val). De manera similar a las otras mutantes de Pro, una sustitución doble fue necesaria para generar la mutante V1383P, cambiando el codón GTC por CCC (mutación de dos bases, 4147 y 4148), utilizando esta variante confirmada para obtener V1383S y V1383T: mutando la citosina 4147 por una timina (codón TCC, Ser) o por una adenina (codón ACC, Thr). Para integrar las secuencias mutantes contenidas en la construcción pUC19+a1I(SacI-HindIII) a la secuencia completa del plásmido α 1I, éste se digirió en dos reacciones diferentes: una con *AgeI* y *BsrGI*, de la que se obtuvieron fragmentos de 10025 (fragmento IIIA) y 3200 pb; y otra con *AgeI* y *ApaLI*, para obtener fragmentos de 5265, 3461, 2908 (fragmento IIIA), 1243 y 288 pb (Figura 15A). Por otro lado, la construcción pUC19+a1I(SacI-HindIII) se digirió con *ApaLI* y *BsrGI*, purificando la banda más pequeña resultante de la reacción (292 pb; fragmento IIIC; Figura 15B). Los fragmentos IIIA, IIIB y IIIC se unieron mediante reacciones de ligación para generar las mutantes del dominio III (V1383G, V1383P, V1383T, V1383S).

6.2. Caracterización electrofisiológica de los canales mutantes de $Ca_v3.3$

Posterior al diseño y construcción de las mutantes del canal recombinante $Ca_v3.3$, se procedió a estudiar las propiedades biofísicas de estos canales. Para ello se transfectaron de manera transitoria células HEK-293 con la subunidad silvestre o las mutantes y se obtuvieron registros electrofisiológicos mediante la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa. Los canales $Ca_v3.3$ se cotransfectaron con un plásmido que codifica para la GFP (véase Métodos), y las células transfectadas se identificaron por la emisión de fluorescencia verde a longitudes de onda de entre 510 y 560 nm. La cantidad de células con fluorescencia evidenció un comportamiento gaussiano a lo largo de los primeros tres días posteriores a la transfección, alcanzando el pico máximo de expresión a las 48 horas de haberse realizado. Como referencia de eficiencia de la transfección, prácticamente el 100% de las células fluorescentes presentaron actividad del canal $Ca_v3.3$ silvestre.

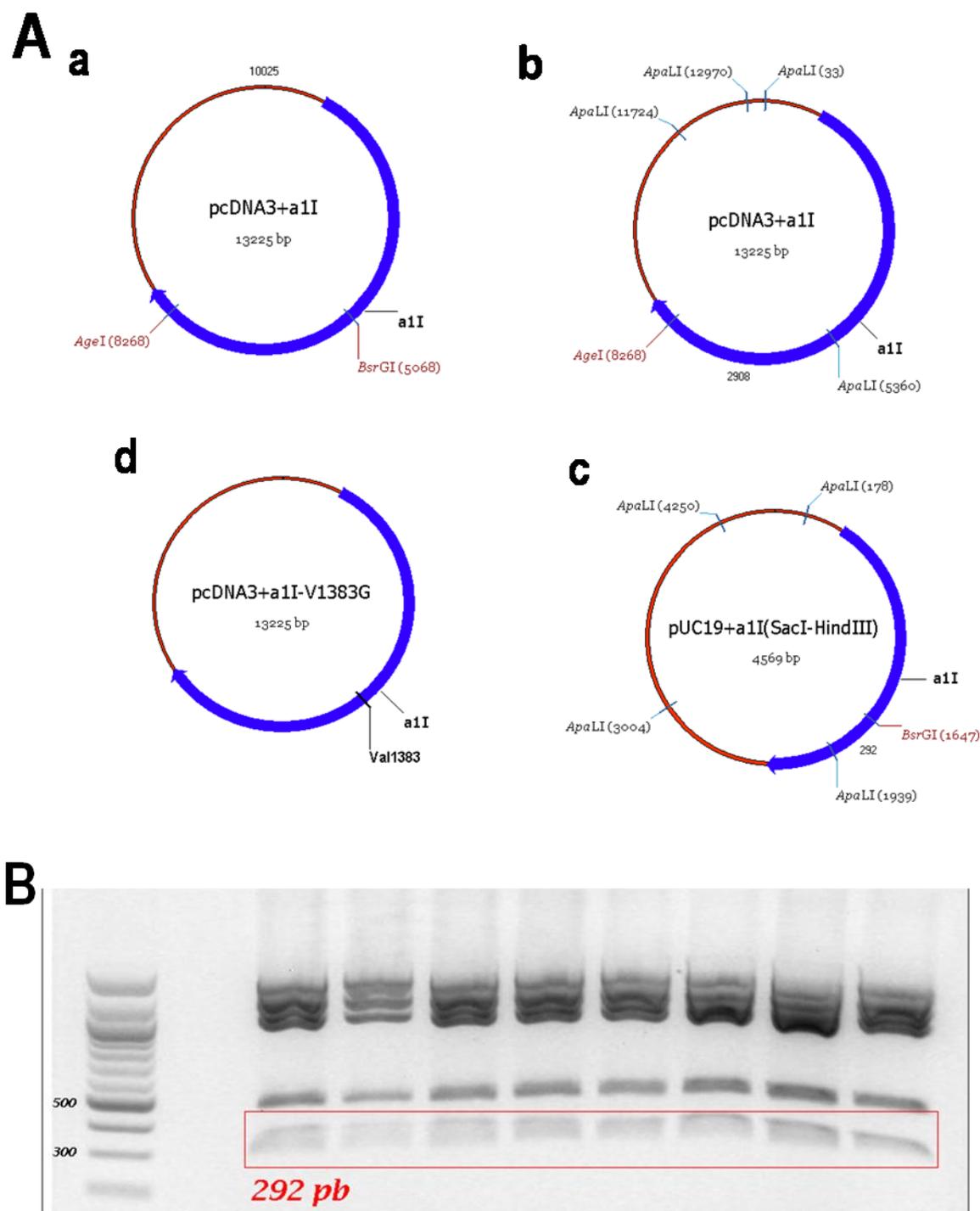


Figura 15. Esquema de la estrategia para la construcción de las mutantes de $Ca_v3.3$ correspondientes al dominio III. A) El plásmido pcDNA3+a1I se sometió a dos reacciones de digestión: una con las enzimas *AgeI* y *BsrGI* (a) y otra con *ApaLI* y *AgeI* (b) con lo que se obtuvieron y aislaron los fragmentos IIIA de 10025 pb y IIIB de 2908 pb. Por su parte, pUC19+a1I(SacI-HindIII) se digirió con las enzimas *ApaLI* y *BsrGI* (c) para generar el fragmento de 292 pb (IIIC) que contiene la mutación. La ligación de los fragmentos IIIA, IIB y IIIC generó las mutantes del dominio III (d). **B** El gel de agarosa a partir del cual se purificó el fragmento mutante de 292 pb. Los cuatro primeros carriles de DNA digerido corresponden a la mutante V1383T, y las cuatro últimas a V1383S.

6.2.1. Efectos en la relación corriente-voltaje

La relación que existe entre un potencial de membrana (V_m) determinado y la amplitud de la corriente activada a dicho potencial se denomina relación corriente voltaje ($I-V$). A partir de esta relación se obtienen parámetros relevantes para la caracterización de la corriente iónica, incluyendo el potencial al cual se empieza a activar la corriente macroscópica, el potencial al cual se alcanza la amplitud máxima de la corriente entrante, y el potencial al cual se invierte el sentido de la corriente (V_{inv}). Con la finalidad de obtener dicha información para cada canal $Ca_v3.3$ estudiado en la presente tesis, se utilizaron protocolos de voltaje denominados $I-V500$ (véase Métodos), el cual consiste en una serie de pulsos despolarizantes de 500 ms de duración que fijan el valor de V_m entre -80 y +80 mV en incrementos de 10 mV, aplicados a partir de un HP de -100 mV y con una frecuencia de 0.1 Hz, es decir, cada 10 segundos. Familias de corrientes de calcio representativas evocadas por este tipo de protocolo de voltaje se ilustran en la Figura 16. Se presentan las corrientes registradas en respuesta a los pulsos despolarizantes de -60 a -20 mV. Como se mencionó previamente, la corriente de Ca^{2+} generada por los canales LVA o Ca_v3 se caracteriza por una activación relativamente rápida que alcanza un punto máximo (pico de la corriente), posterior al cual decae progresivamente la amplitud de la misma conforme ocurre la transición de los canales al estado inactivado. La cinética de la corriente se acelera conforme se hace más positivo el pulso despolarizante, generándose en consecuencia un patrón de entrecruzamiento (*criss-crossing*) de los registros de corriente característico de los canales Ca_v3 . A pesar de algunas diferencias, dicho patrón se manifestó en todas las construcciones funcionales.

Uno de los efectos más evidentes inducidos por todas las mutaciones fue una disminución considerable en la amplitud de las corrientes entrantes, inclusive no expresando algunas de ellas corriente alguna (p. ej., V1383P). Con el objetivo de obtener un valor cuantitativo de los niveles de las corrientes de calcio evocadas a cada uno de los potenciales explorados, se midió la amplitud de la corriente al pico (es decir, al valor máximo a cada valor de V_m). Debido a la variabilidad intrínseca del tamaño de las células estudiadas, y con la intención de evitar que este parámetro fuera una variable adicional, se calculó la densidad de corriente correspondiente. Esto se consiguió al dividir la amplitud de la corriente al pico para cada valor de V_m entre el valor de capacitancia membranal (C_m) de la célula registrada, siendo este último un parámetro indirecto del tamaño celular. Debido a que la capacitancia específica de una membrana biológica es de $1.0 \mu F/cm^2$ (Hille, 2001; Sands *et al.*, 2005), el cociente de

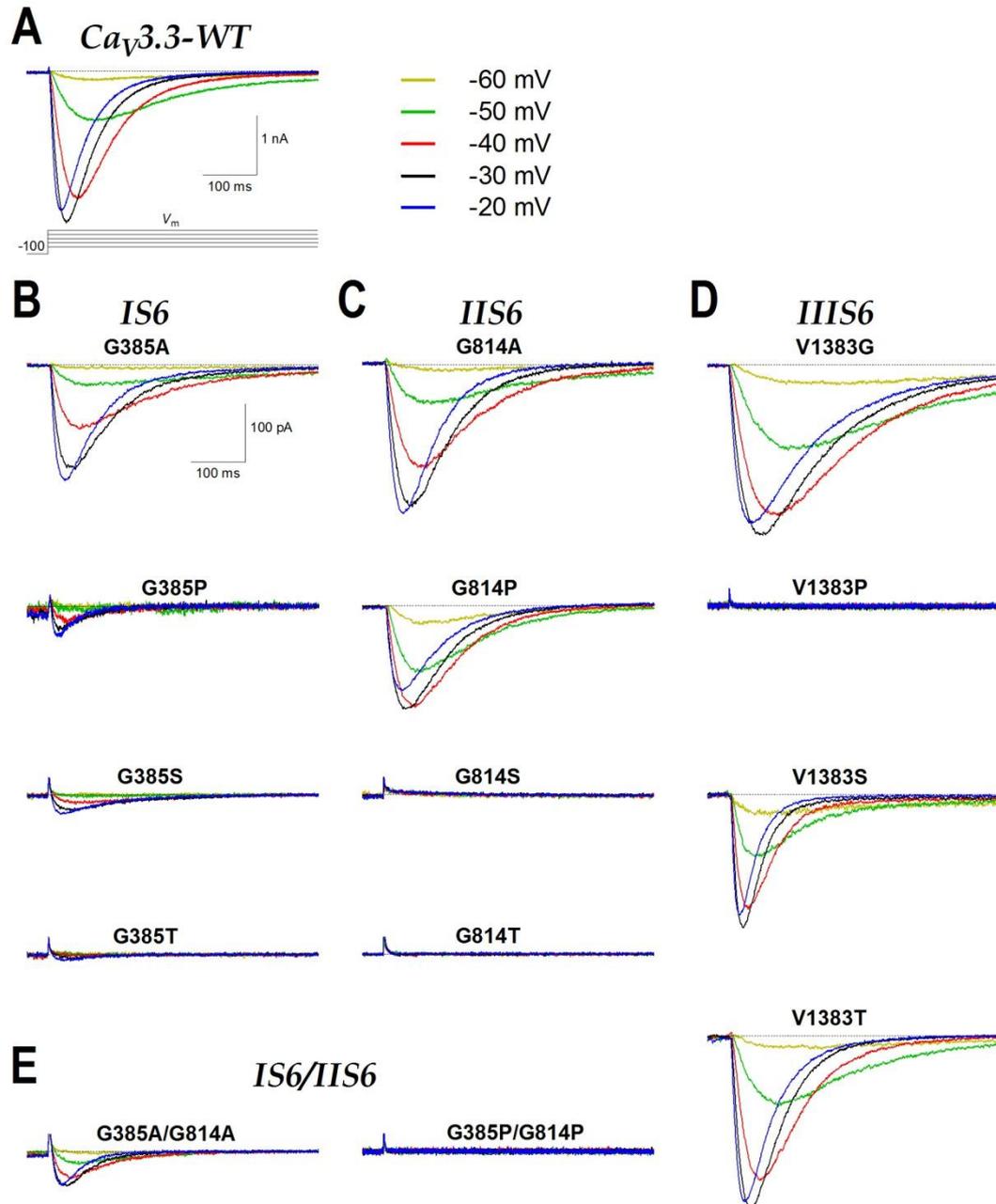


Figura 16. Ejemplos de corrientes de calcio generadas por el canal $Ca_v3.3$ silvestre y mutantes. Registros de corriente obtenidos en respuesta al protocolo indicado en la parte superior izquierda en células HEK-293 transfectadas con los canales indicados en cada caso. Para fines de claridad sólo se presentan los trazos correspondientes a los voltajes indicados en colores en la parte superior. En todos los casos el HP fue de -100 mV. Nótese que todas las corrientes se muestran bajo la misma escala de amplitud, exceptuando la del canal $Ca_v3.3$ silvestre. Las mutantes G814S, G814T, G385P/G814P y V1383P produjeron canales no funcionales (es decir, no se detectaron corrientes de calcio), mientras que el canal mutante G385T generó corrientes tan minúsculas que no se pudo realizar el análisis biofísico de las mismas.

esta división estima entonces la cantidad de corriente que fluye por unidad de área de membrana (pA/pF). Los valores de densidad de corriente así obtenidos en cada célula fueron promediados para cada condición experimental, graficándose en función de cada voltaje explorado. La densidad de corriente generada en las células transfectadas con cada uno de los canales mutantes fue significativamente menor a la registrada en aquellas transfectadas con el canal Cav3.3 silvestre (Figura 17). El porcentaje de disminución fluctuó entre 55% y 100% con respecto al valor del silvestre (Tabla 2). Las mutantes G385P/G814P, G814S, G814T y V1383P no expresaron corrientes ($n = 5, 5, 5$ y 18 , respectivamente), mientras que G385S y G385T ($n = 5$ y 6) presentaron corrientes sumamente pequeñas, por lo que no fueron sujetas del análisis biofísico correspondiente. Las tres construcciones funcionales del dominio III exhibieron las corrientes más robustas en comparación con las registradas para el resto de las mutantes, resultado particularmente interesante considerando que la mutación por Ser o Thr en los dominios I y II resultaron en corrientes ínfimas, en el caso del primero, o inclusive en ausencia de corriente, en el caso del segundo (Figura 16). Igualmente interesante fue el resultado de realizar mutaciones dobles, ya que ambas resultaron en una densidad de corriente menor a cualquiera de sus mutaciones simples respectivas: la mutante doble de Ala disminuyendo considerablemente la densidad, si bien manteniendo la misma relación $I-V$ que G814A (Figura 17, *IIS6*); y la mutante doble de Pro eliminando la funcionalidad observada en G385P y G814P (Figura 16E).

Con la finalidad de comparar cuantitativamente la dependencia al voltaje de la activación de la corriente de cada uno de los canales Cav3.3 estudiados, se construyeron curvas $I-V$ normalizadas como las que se muestran en la Figura 17B. Los datos de densidad de corriente obtenidos para cada voltaje explorado fueron normalizados respecto a la densidad de corriente entrante máxima para cada canal. Los datos así obtenidos se ajustaron con una función de Boltzmann modificada (líneas continuas, Figura 17B). A partir de este ajuste se obtienen los parámetros de $V_{1/2}$, k y V_{inv} , mismos que se muestran en la Tabla 2. El parámetro $V_{1/2}$ indica el valor de V_m al cual se alcanza la activación del 50% de la corriente máxima, mientras k denota la pendiente de la relación existente entre voltaje y corriente. Los cambios más notables en relación con estos parámetros fueron las mutantes del dominio I, particularmente G385P, quien presentó un valor de $V_{1/2}$ de 15 mV más positivo que el del canal silvestre y cuya dependencia al voltaje de la activación requirió de 2.8 mV más (k) para activar la misma cantidad de corriente que este último (Tabla 2). La densidad de corriente no fue un factor para los cambios en los parámetros de la dependencia al voltaje de la corriente

de la mutante G385P, ya que las mutantes G385A y V1383T que generaron corrientes más robustas también presentaron cambios importantes en los valores de $V_{1/2}$ y k (Tabla 2). En general, los efectos significativos sobre el $V_{1/2}$ indican que las mutaciones propiciaron que los canales se activaran a voltajes más despolarizados que el canal $Ca_v3.3$ silvestre, siendo el caso extremo la mutante G385P.

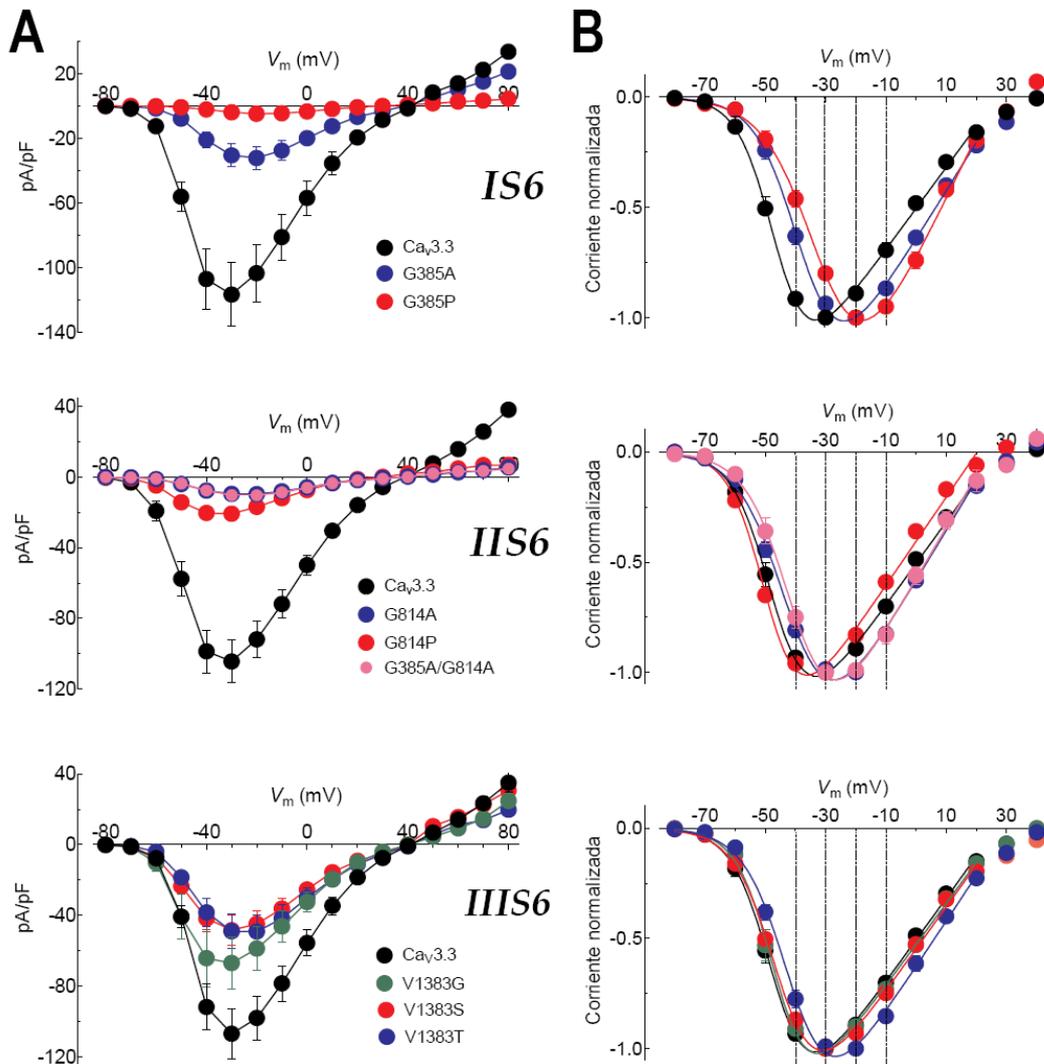


Figura 17. Relación I - V de los canales $Ca_v3.3$. A) Densidad de corriente en función del voltaje para los canales $Ca_v3.3$ silvestre y mutantes de los dominios indicados. La amplitud de la corriente al pico registrada en cada uno de los valores de V_m explorados se dividió entre el valor de capacitancia membranar (C_m) de la célula bajo estudio, se obtuvieron los promedios entre grupos y se graficaron en función del voltaje. La comparación de la densidad de corriente máxima para cada construcción se presenta en la Tabla 2. B) Relaciones I - V normalizadas con respecto al valor máximo de corriente entrante para los canales $Ca_v3.3$ indicados. Las líneas continuas que unen los puntos representan el ajuste de los datos experimentales con la ecuación de Boltzmann modificada (Ecuación 1 de Métodos). Las líneas punteadas verticales permiten observar los desplazamientos en voltaje del pico de la relación I - V de cada mutante respecto al canal $Ca_v3.3$ silvestre. Los parámetros ajustados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de las propiedades biofísicas de los canales Ca_v3.3 silvestre y mutantes.

	WT	G385A	G385P	G385A/G814A	G814A	G814P	V1383G	V1383S	V1383T
pA/pF	108 ± 8	32 ± 7	5 ± 1	10 ± 3	10 ± 3	21 ± 4	67 ± 15	48 ± 8	49 ± 9
Activación									
V _{1/2} (mV)	-45.7 ± 0.7	-37.3 ± 1.0**	-30.3 ± 1.1**	-39.8 ± 1.0*	-39.3 ± 1.0**	-48.9 ± 0.6*	-46.3 ± 1.6	-44.9 ± 0.8	-40.4 ± 1.6**
k (mV)	5.6 ± 0.1	6.9 ± 0.2**	8.4 ± 0.3**	7.2 ± 0.4**	7.5 ± 0.3**	5.9 ± 0.2	5.6 ± 0.2	6.8 ± 0.2**	7.1 ± 0.4**
V _{inv} (mV)	27.0 ± 0.5	29.4 ± 1.0	26.3 ± 0.8	24.9 ± 2.2	26.6 ± 1.5	20.2 ± 0.5**	28.2 ± 1.0	28.7 ± 1.4	29.8 ± 1.0*
Inactivación									
V _{1/2} (mV)	-74.9 ± 0.7	-73.1 ± 2.7	-80.3 ± 0.9**	-77.4 ± 2.5	-77.8 ± 1.4	-85.4 ± 0.8**	-73.8 ± 0.6	-80.7 ± 0.7**	-81.6 ± 0.8**
k (mV)	4.8 ± 0.1	5.4 ± 0.3	6.2 ± 0.3**	4.0 ± 0.3*	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.3	6.2 ± 0.4**	4.7 ± 0.2	4.4 ± 0.1
Cinética									
τ _h (ms)	383 ± 17	553 ± 35**	241 ± 32*	1359 ± 150**	891 ± 126**	829 ± 86**	301 ± 47	714 ± 61**	501 ± 33*
τ _{desac} a -80 mV (ms)	3.7 ± 0.4	1.6 ± 0.2*	1.4 ± 0.2**	1.5 ± 0.1	3.2 ± 0.4	8.0 ± 1.0**	6.5 ± 0.6**	3.3 ± 0.2	1.7 ± 0.1*

** Significancia estadística con análisis de varianza.

* Significancia estadística con *t* de Student.

Conforme se despolariza la membrana hacia valores más positivos, el tamaño de las corrientes crece hasta alcanzar un máximo y después la amplitud de éstas disminuye gradualmente hasta que, a un potencial dado, la amplitud alcanza un valor de cero pA. El valor al cual ocurre este fenómeno se denomina potencial de inversión (V_{inv}), es decir, es el valor a partir del cual el sentido del flujo de la corriente cambia de entrante a saliente. A potenciales más positivos que este parámetro, los canales conducen corriente hacia fuera de la célula. Bajo las condiciones experimentales de registro utilizadas en este trabajo, las corrientes salientes son generadas por el flujo de iones Cs^+ (130 mM) contenidos en la solución interna (véase Métodos, Soluciones de registro), dado que a dichos voltajes existe una fuerza impulsora más grande para la salida del Cs^+ que para la del Ca^{2+} . Un cambio sustancial en el valor de V_{inv} implicaría que la selectividad iónica del canal está siendo alterada. La única mutante para la que hubo un cambio estadísticamente significativo fue la construcción G814P, en la que el V_{inv} se modificó 7 mV hacia voltajes menos positivos respecto al canal silvestre (Tabla 2). Considerando el cambio en la magnitud de las corrientes registradas de esta mutante y que dicha mutación se encuentra cercana al poro de selectividad del canal, cabe la posibilidad de que la selectividad del mismo haya sido modificada. Sin embargo, en el presente trabajo no se realizaron experimentos para evaluar la selectividad de la mutante G814P.

6.2.2. Inactivación en el estado estacionario

El siguiente aspecto biofísico que se estudió en el presente trabajo fue el efecto que podrían tener las mutaciones realizadas en los S6 en la inactivación en el estado estacionario de los canales $Ca_v3.3$, es decir, sobre su disponibilidad para ser activados a diferentes valores de V_m . Para ello se utilizó el protocolo de voltaje descrito como *Hinf15-100i* (ver Métodos). Este consistió en aplicar a la célula bajo estudio un prepulso de 15 s de duración que llevó el V_m a diferentes valores, desde -110 hasta -40 mV, con la finalidad de promover la inactivación de los canales, seguido por un pulso de prueba a -30 mV. Este procedimiento nos permite estimar la proporción de canales que se encuentran disponibles para ser activados después de un lapso prolongado de tiempo bajo el voltaje del prepulso, dado que la I_{Ca} evocada por el pulso de prueba es inversamente proporcional a la fracción de canales que se inactivaron. En el panel A de la Figura 18 se muestran trazos representativos de corriente generados por el canal $Ca_v3.3$ silvestre y las mutantes G814P y V1383G en respuesta al pulso de prueba a -30 mV. Se puede constatar que la amplitud de la corriente disminuye conforme el prepulso es más despolarizante, de tal forma que para el canal silvestre alrededor del 50% de los canales

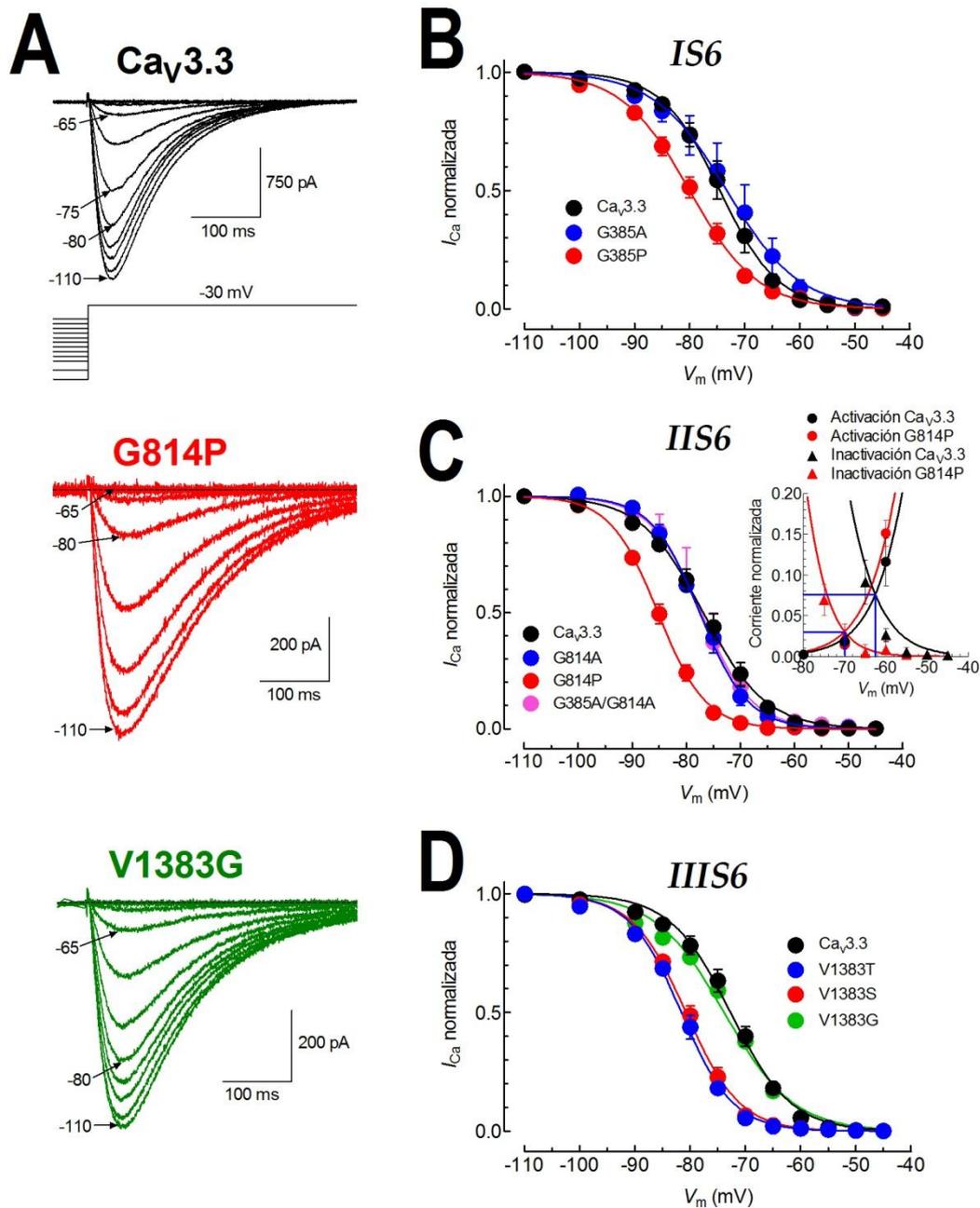


Figura 18. Inactivación en el estado estacionario de los canales Ca_v3.3. **A)** Familia de corrientes de calcio generadas por el canal Ca_v3.3 silvestre y los mutantes G814P y V1383G en respuesta al protocolo mostrado en la parte superior del panel. A pesar de que el prepulso condicionante se aplicó durante 15 s, en la figura se muestran únicamente los últimos 50 ms del mismo para mayor claridad; de igual manera sólo se muestran 390 ms de los 500 que dura el pulso de prueba a -30 mV. **B-D)** Curvas de inactivación en el estado estacionario. Los puntos representan el promedio de la amplitud de la corriente evocada por el pulso a -30 mV normalizada con respecto al valor de corriente máxima. Las líneas continuas indican el ajuste con la función de Boltzmann (Ecuación 2 en Métodos). Los parámetros respectivos de $V_{1/2}$ y k se presentan en la Tabla 2. El *Inserto* en (C) ejemplifica la corriente de ventana generada por el empalme de las curvas de activación e inactivación de los canales Ca_v3.3 silvestre y la mutante G814P. El porcentaje de canales que se pueden activar de manera estocástica disminuye a menos del 15% en los canales mutantes G814P (ver texto para explicación).

se inactivan después de permanecer a un V_m de -75 mV durante 15 s. La amplitud de la corriente evocada por el pulso de prueba se normalizó respecto a la amplitud máxima (usualmente obtenida en respuesta al pulso de prueba después del prepulso a -110 mV), se promedió entre grupos de células y se graficó en función del valor de V_m del prepulso correspondiente. Los datos así obtenidos se ajustaron con la ecuación de Boltzmann para obtener las curvas de inactivación en el estado estacionario que se ilustran en la Figura 18. Los parámetros obtenidos con las funciones de Boltzmann se presentan en la Tabla 2.

En concordancia con resultados previos de nuestro laboratorio (Lopez-Charcas, 2011), el $V_{1/2}$ para la inactivación de los canales $Ca_v3.3$ silvestres observado en el presente trabajo de tesis se alcanzó con un prepulso de 15 ms a -75 mV (Tabla 2). La introducción de una Pro en la posición Gly385 provocó un desplazamiento en la curva de inactivación hacia potenciales más hiperpolarizados, como puede apreciarse en el panel B de la Figura 18, mientras que una Ala en la misma posición no generó cambios significativos en la dependencia al voltaje de la inactivación en el estado estacionario. No obstante, el efecto más drástico en dicha propiedad se observó al introducir una Pro en el residuo Gly814 del dominio II. En este caso el cambio en el $V_{1/2}$ de inactivación fue de alrededor de -10 mV con respecto al $Ca_v3.3$ silvestre (Tabla 2). Por lo que respecta al segmento S6 del dominio III, la sustitución de la Val1383 por los residuos polares Ser o Thr desplazó la curva de inactivación a potenciales más negativos (al menos en 5 mV, Tabla 2), mientras que la sustitución de este mismo residuo por una Gly no tuvo efectos significativos sobre la inactivación en el estado estacionario de los canales $Ca_v3.3$. Por lo que respecta a la pendiente de las curvas de inactivación, los efectos más significativos se apreciaron con las mutantes G385P y V1383G, en las cuales el valor de k aumentó de 4.8 ± 0.1 a 6.2 ± 0.3 y 6.2 ± 0.4 respectivamente.

6.2.3. Recuperación de la inactivación

Si bien es cierto que, al introducir mutaciones en los segmentos que delinear el poro, se predecían efectos en los procesos de activación y desactivación principalmente, nuestros resultados también evidencian alteraciones en el mecanismo de inactivación (Figura 18). En el sistema nervioso central, la actividad de los canales Ca_v3 es determinante para el disparo en ráfagas característico de algunos tipos neuronales, como las neuronas talámicas de relevo y las de Purkinje del cerebelo (Huguenard, 1996; Kim *et al.*, 2001; Miyasho *et al.*, 2001). Dicha actividad depende, entre otros factores, del periodo refractario necesario para que se produzca cada disparo, y éste a su vez está subordinado al curso temporal bajo el cual se recuperan los

canales del estado inactivado. Una alteración en este curso temporal como consecuencia de la introducción de una mutación en los segmentos S6 podría tener consecuencias fisiológicas notables. Para explorar la posibilidad de que dicho parámetro se viera alterado en las mutantes generadas para el $Ca_v3.3$, se aplicó un protocolo denominado *recover-100i* (véase Métodos), el cual consiste en la aplicación de dos pulsos despolarizantes de igual magnitud, separados entre sí por un tiempo variable. El primer pulso tiene el propósito de activar y posteriormente inactivar a los canales, y se aplica a un potencial de -30 mV debido a que a este voltaje se obtiene la amplitud máxima de I_{Ca} en los $Ca_v3.3$ bajo nuestras condiciones experimentales. Después de aplicado este pulso, el V_m se repolariza a -100 mV durante un periodo de tiempo que osciló entre 1 y 2000 ms. Una vez transcurrido dicho lapso, se aplicó otro pulso al mismo valor de V_m . La amplitud de la corriente evocada por el segundo pulso se normalizó con respecto a la registrada durante el primer pulso para calcular la fracción de la corriente que se logró recuperar de la inactivación durante el lapso de tiempo entre la aplicación de los dos pulsos.

La Figura 19 ilustra los resultados de tales experimentos. En el panel A se presentan registros representativos obtenidos del canal $Ca_v3.3$ silvestre, la doble mutante G385A/G814A, y la mutante sencilla V1383G. Se puede observar que la corriente registrada después de 2 s entre el primer y segundo pulso a -30 mV es de la misma amplitud en el caso del canal silvestre y la mutante del dominio III (V1383G), mientras que en la doble mutante el valor final de amplitud fue menor que la corriente del primer pulso (aproximadamente 20% menos). Para analizar con mayor detalle los efectos de las mutaciones sobre el curso temporal de recuperación de la inactivación, el porcentaje promedio de la I_{Ca} recuperada en función del tiempo (en segundos) para cada construcción se presenta en los paneles B, C y D. La constante de tiempo (τ_h) para este comportamiento de los canales $Ca_v3.3$ se obtuvo a partir del ajuste de los puntos experimentales con una función exponencial y se presenta en la Tabla 2. La doble mutante G385A/G814A se caracterizó por presentar la recuperación de la inactivación más lenta de todas las construcciones exploradas (3 veces más lenta que el canal silvestre), de tal manera que en los dos segundos de tiempo que se exploraron en estos experimentos sólo se logró recuperar el 79% de la corriente control (Figura 19C). Interesantemente, dicho retraso fue prácticamente aditivo de los efectos observados en las mutantes individuales correspondientes (Tabla 2). Las construcciones G385P y V1383G, por su parte, aceleraron la recuperación de la inactivación, aunque sólo la primera lo hizo de manera significativa (Tabla 2). Las construcciones G814P y V1383S retardaron la

recuperación considerablemente, mientras que los cambios asociados a la mutación de la Val1383 por Thr fueron menos pronunciados.

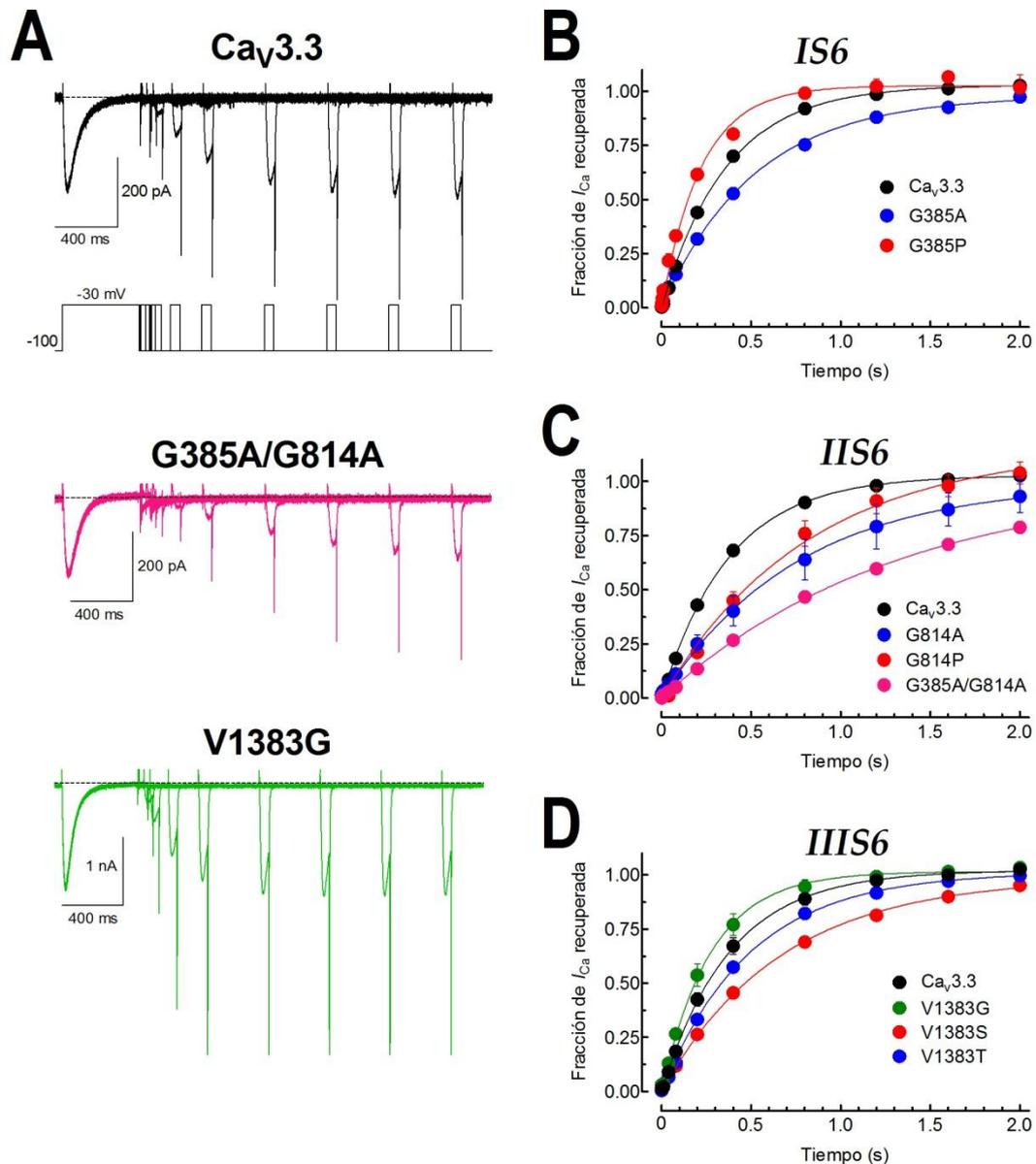


Figura 19. Modificaciones al curso temporal de la recuperación de la inactivación en los mutantes del canal Ca_v3.3. **A)** Trazos representativos de corriente a -30 mV del canal Ca_v3.3 silvestre, la doble mutante G385A/G814A, y la mutante V1383G obtenidos en respuesta al protocolo mostrado debajo de las corrientes del canal silvestre. Debido a que la duración del segundo pulso a -30 mV es de sólo 60 ms, al repolarizar la célula a -100 mV se generan colas de corrientes muy prominentes, mismas que fueron “recortadas” para una mejor apreciación de la corriente durante el pulso a -30 mV. **B)** Curso temporal de la recuperación de la inactivación. Se presentan los promedios de la fracción de I_{Ca} recuperada a los intervalos de tiempo indicados. Las líneas continuas indican el ajuste de los datos con una función exponencial simple, cuyos valores de constantes de tiempo se presentan en la Tabla 2.

6.2.4. Cinética de las corrientes generadas por los canales $\text{Ca}_v3.3$

6.2.4.1. Cinética de activación e inactivación

Si bien la exploración del mecanismo de inactivación no fue el objetivo principal del presente trabajo de tesis, su análisis es relevante debido a que para algunos canales Ca_v3 el segmento IIS6 parece tener un papel importante en tal proceso, tal como ha sido documentado previamente para el canal $\text{Ca}_v3.1$ (Marksteiner *et al.*, 2001). En el presente trabajo, el curso temporal de los procesos de activación e inactivación de las poblaciones de canales $\text{Ca}_v3.3$ se estudió mediante el análisis de los trazos de corriente obtenidos a partir de los protocolos *I-V500*, como se ejemplificó previamente en la Figura 16. Cada trazo de corriente fue ajustado con dos funciones exponenciales, la primera correspondiente al componente creciente que parte de la línea basal hasta el pico máximo (activación), y la segunda correspondiente al componente decreciente que tiende a regresar hacia la línea basal (inactivación). Dichos ajustes proporcionan las constantes de tiempo (τ o τ) de activación e inactivación de la corriente, respectivamente. Estos valores se graficaron en función del V_m , y se presentan en la Figura 20. En la mayoría de los canales estudiados, la cinética de la corriente iónica es fuertemente dependiente de voltaje en el intervalo entre -50 y -20 mV; por el contrario, a voltajes más positivos (entre -10 a +20 mV) los valores de las constantes de tiempo de activación e inactivación no sufren cambios de consideración, por lo que su comportamiento se vuelve independiente de voltaje. La única excepción fue la mutante G814P, la cual mostró un enlentecimiento de la τ de inactivación entre -20 y +20 mV (Figura 20, *IIS6*, panel derecho). Es prudente señalar que en los trazos de los registros a -50 mV se presentaron dificultades para el ajuste adecuado de las funciones exponenciales, merced del tamaño reducido de las corrientes en conjunción con el ruido inherente del sistema, como queda de manifiesto por el tamaño del error estándar de aquellos valores registrados a -50 mV.

Como consecuencia de la mutación G385P, se observaron alteraciones discretas en la constante de activación, misma que se manifestó como una aceleración significativa de la activación de la corriente en relación con la observada en el canal silvestre. Esto se observó principalmente entre -50 y -30 mV (Figura 20, *IS6*, panel derecho). Asimismo, se detectó una aceleración de la inactivación a voltajes entre -10 y +20 mV (panel izquierdo). La mutación por Pro del dominio II (G814P) también generó cambios significativos en la inactivación de la corriente entre -30 y +20 mV (Figura 20, *IIS6*, panel derecho). Debido a que la dependencia al voltaje de la activación de dicha mutante se desplazó únicamente 3 mV hacia voltajes más negativos con respecto a la del canal silvestre (véase Tabla 2), los cambios en la cinética de

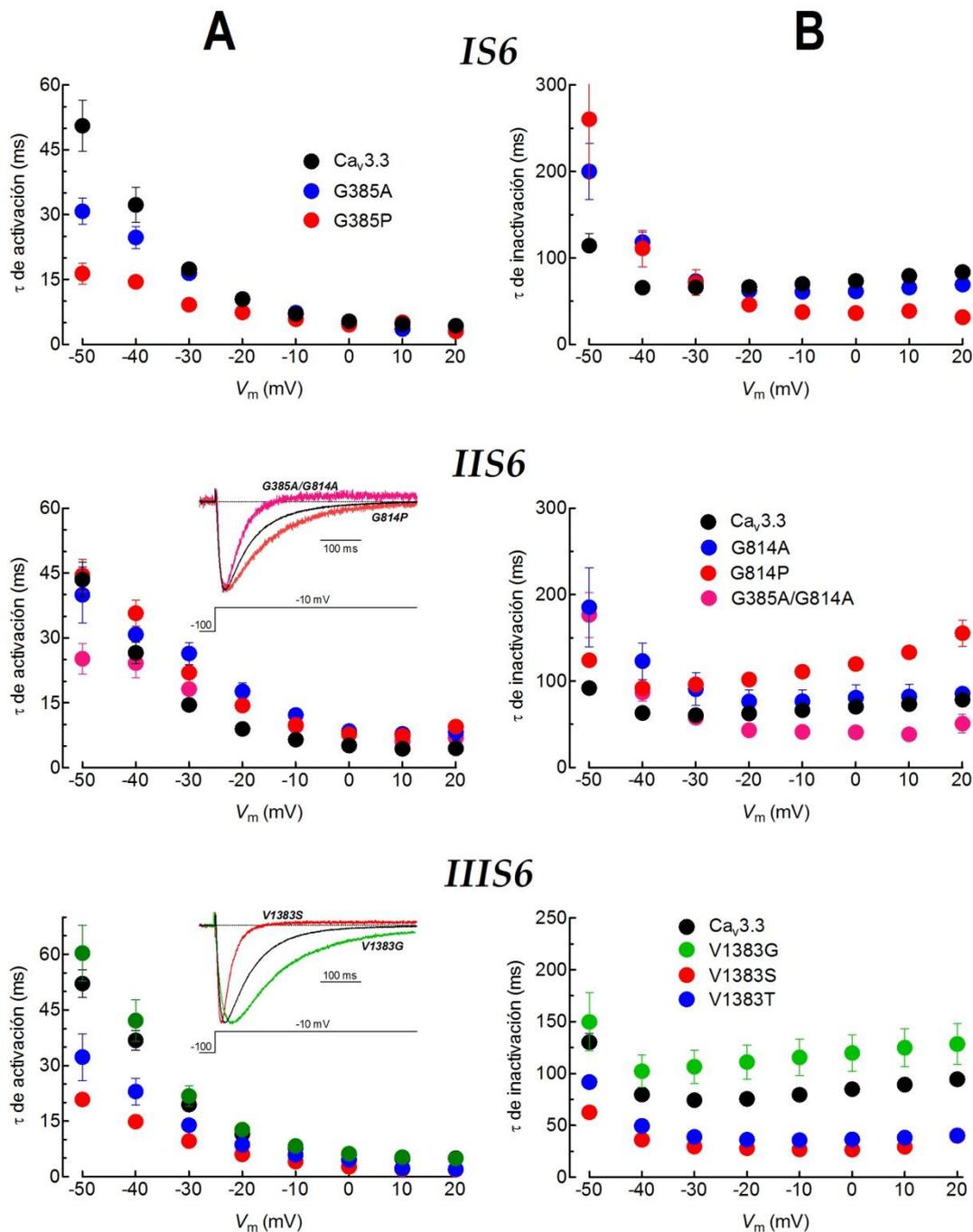


Figura 20. Cinética de activación e inactivación de las corrientes expresadas por los canales $Ca_v3.3$. Constantes de tiempo de activación (A) e inactivación (B) obtenidas a partir del ajuste con una función biexponencial de trazos de corriente como los ejemplificados en la Figura 16. Las constantes de tiempo así obtenidas para la activación e inactivación, se promediaron entre grupos y se graficaron en función del V_m respectivo. Los insertos en el panel (A) muestran trazos representativos a -10 mV del canal $Ca_v3.3$ silvestre (trazo en negro) y de aquellas mutantes con efectos significativos sobre la cinética de la corriente. Nótese que los efectos fueron más drásticos en la cinética de inactivación del canal $Ca_v3.3$, principalmente en las mutantes de los dominios II y III.

inactivación no se pueden atribuir a la activación de la corriente a voltajes más negativos en dicha mutante, por lo que tal enlentecimiento debe ser explicado como un efecto de la mutación sobre el curso temporal del mecanismo de inactivación de dicho canal mutante. Por su parte, las mutaciones que introdujeron una Ala (G385A y G814A) no produjeron cambios importantes en la cinética de la corriente del canal $Ca_v3.3$. Los cambios más relevantes en la cinética de la corriente se observaron al introducir mutaciones en el residuo Val1383 del dominio III. Interesantemente, la introducción de una Gly en esta posición derivó en un enlentecimiento significativo de la constante de tiempo de inactivación, en el intervalo comprendido entre -30 y +20 mV. La introducción de una Ser o una Thr ocasionó el efecto contrario, acelerando la inactivación del canal de manera considerable: constante de tiempo a -20 mV de 28 ± 2 ms para V1383S, en contraposición a los 76 ± 4 ms del canal $Ca_v3.3$ silvestre (Figura 20, *IIIS6*, panel derecho). Esta tendencia fue menos acentuada en el proceso de apertura del canal (panel izquierdo).

6.2.4.2. Cinética de desactivación de los canales $Ca_v3.3$

El aspecto más importante que se abordó en esta tesis fue el papel que tienen los segmentos S6 en el accionar de la compuerta de activación, la cual determina la apertura y cierre del canal ante el estímulo de voltaje adecuado. En el apartado anterior se analizó el efecto de las mutaciones sobre la cinética de apertura del canal $Ca_v3.3$, la cual sufrió modificaciones discretas. Para estudiar la cinética de cierre de los canales se utilizó el protocolo de colas de corriente (véase Métodos, Protocolos de voltaje), con el cual se despolariza brevemente la membrana a un potencial muy positivo (+60 mV), buscando activar la totalidad (o un porcentaje muy cercano al 100%) de canales presentes en la membrana plasmática, con un pulso de únicamente 10 ms de duración para evitar al máximo que los canales transiten al estado inactivado. La cola de corriente que se genera describe el curso temporal con el que se cierra el canal. Debido a la velocidad con la que ocurre el fenómeno de cierre, es necesario registrar las colas de corriente con una frecuencia de 10 kHz, en lugar de los 5 kHz empleados para el resto de los registros, para tener una mejor resolución temporal de las corrientes. Por la misma razón, se procuró que la constante de tiempo de fijación de voltaje (τ_{HP}) proporcionada por el producto de C_m por R_s fuera menor a 45 μ s.

A pesar de que las células HEK-293 utilizadas como sistema de expresión fueron transfectadas únicamente con canales $Ca_v3.3$ y que las condiciones experimentales estuvieron diseñadas para excluir la contribución de cualquier otro canal endógeno presente en esta línea

celular, las colas de corriente no se ajustaron adecuadamente con una sola función exponencial como podría esperarse para una población homogénea de canales, fenómeno que ya ha sido descrito con anterioridad (Frazier *et al.*, 2001; Gomora *et al.*, 2002). Debido a ello, las colas fueron ajustadas con dos funciones exponenciales, identificándose un componente rápido (τ_1) y uno lento (τ_2) en el registro completo, a partir de los cuales se calculó una τ ponderada como se explica en el apartado de Métodos. El trabajo de Gomora *et al.* (2002) ha mostrado que este parámetro ponderado es una buena aproximación a la dependencia al voltaje de ambos componentes de las colas de corriente en los canales $Ca_v3.3$. En el panel A de la Figura 21 se ilustran colas de corriente representativas para la construcción silvestre y las mutantes G385A y V1383G, evocadas al repolarizar la membrana a voltajes comprendidos entre -120 y -80 mV. Las colas de corriente registradas en dicho intervalo reflejan exclusivamente el cierre de los canales, mientras que a voltajes más positivos las colas incorporan un componente adicional debido a la inactivación de los canales (Serrano *et al.*, 1999). A simple vista se puede observar que las colas de corriente generadas por el canal $Ca_v3.3$ silvestre transcurren con un curso temporal más lento que las de la mutante G385A, mientras que las de la mutante V1383G son más lentas que estas últimas dos (Figura 21A). Con el propósito de cuantificar dichas diferencias se graficaron los valores promediados de la τ ponderada en función del V_m de repolarización para cada una de las mutantes estudiadas (Figura 21B-D). La sustitución por Ala o Pro en la posición Gly385 del dominio I acelera significativamente y en la misma magnitud el cierre del canal $Ca_v3.3$; el mismo resultado se obtuvo con la doble mutación por Ala de los dominios I y II. Sin embargo, esta última diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 2), probablemente debido al bajo número de células estudiadas con la doble mutante ($n = 3$).

Por el contrario, la introducción de Pro en la potencial bisagra del dominio II enlenteció el proceso de cierre del canal, sobre todo a valores de V_m cercanos a los fisiológicos (-90 y -80 mV; Figura 21C). A -80 mV la constante de tiempo de los canales G814P fue 2 veces más lenta que la del canal $Ca_v3.3$ silvestre (Tabla 2). Un efecto similar aunque de menor magnitud se detectó en la mutante V1383G del dominio III. La mutación por Ser no tuvo ningún efecto en la desactivación del canal, mientras que la introducción de una Thr en el mismo sitio aumentó al doble la velocidad de cierre del canal, es decir, la tau de desactivación se modificó de 3.7 ± 0.4 a 1.7 ± 0.1 ms (Tabla 2).

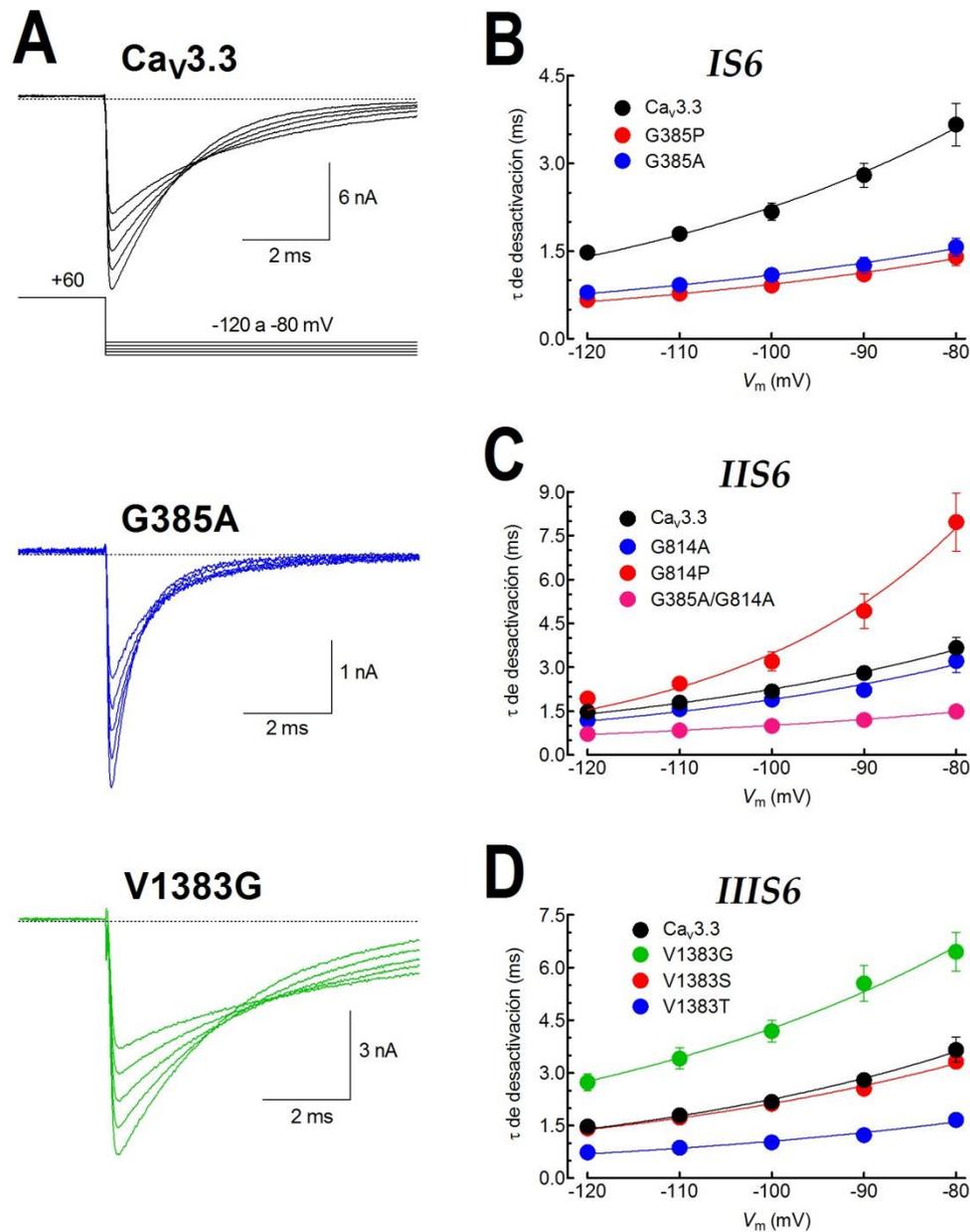


Figura 21. Modificación de la cinética de cierre del canal Ca_v3.3 por la introducción de mutaciones en los dominios I, II y III. **A)** Trazos representativos de colas de corriente de los canales Ca_v3.3 silvestre y las mutantes G385A y V1383G. Los registros de corriente se obtuvieron en respuesta a la repolarización de la membrana a los V_m indicados después de despolarizaciones de 10 ms a +60 mV, tal como lo muestra el protocolo de voltaje debajo de los trazos correspondientes al canal silvestre. Para mayor claridad se muestra sólo una fracción de los trazos de corriente, así como únicamente las cinco colas de corriente evocadas por los potenciales que muestra el protocolo. Nótese la alta velocidad de cierre de la mutante G385A, y la lenta desactivación de V1383G. **B-D)** Promedio de las constantes de tiempo de desactivación obtenidas a partir del ajuste biexponencial de las colas de corriente (ver Métodos) en función del valor de V_m . Los valores obtenidos de los ajustes con exponenciales se presentan para cada construcción en la Tabla 2.

6.3. Localización de subunidades $\alpha 1$ de los canales $Ca_v3.3$ en la membrana celular

Con la finalidad de encontrar una posible explicación sobre la ausencia total de corrientes de calcio en las células HEK-293 en las que se transfectaron algunas de las construcciones del canal $Ca_v3.3$ (ver Figura 16), se realizó una serie de experimentos de microcopía confocal para localizar la distribución de dichos canales en tales células. Para tales fines, se procedió a la subclonación del cDNA del canal $Ca_v3.3$ silvestre y las mutantes en cuestión en un vector que contiene el cDNA codificante para la proteína verde fluorescente (GFP), resultando en la expresión de un canal $Ca_v3.3$ con la GFP fusionada en el amino terminal del canal. Empleando un microscopio confocal FluoView FV1000 (Shinjuku, Tokio, Japón), se observó la distribución celular de la señal verde correspondiente a la GFP (y, consecuentemente, del canal $Ca_v3.3$ fusionado a ella). La Figura 22 presenta imágenes de microscopía confocal obtenidas de células HEK-293 transfectadas con el canal $Ca_v3.3$ silvestre ($Ca_v3.3$ -GFP) y las mutantes G814P (G814P-GFP), V1383P (V1383P-GFP) y V1383G (V1383G-GFP). También se presentan imágenes de una célula transfectada únicamente con el cDNA de la GFP. La distribución de la GFP en esta última célula fue, de acuerdo a lo esperado, generalizada en todo el citosol, incluyendo el núcleo celular (Figura 22, Columna GFP). La localización de la GFP, cuando ésta se fusionó al canal $Ca_v3.3$ silvestre, se limitó más a regiones cercanas a la membrana plasmática y membranas intracelulares que podrían corresponder a retículo endoplásmico (Figura 22, Columna $Ca_v3.3$ -GFP). Por otro lado, la fluorescencia de la GFP en las células transfectadas con las mutantes G814P-GFP y V1383P-GFP, cuya expresión de corrientes fue muy baja y nula, respectivamente (Figura 17), también se localizó primordialmente en las cercanías de las membranas celulares (Figura 22, Columnas G814P-GFP y V1383P-GFP), aunque con una intensidad menor que la del $Ca_v3.3$ -GFP. La mutante V1383G-GFP, generadora de corrientes muy robustas (comparables con la del canal silvestre, Figura 17), mostró una distribución e intensidad de la fluorescencia de la GFP similar a la del canal $Ca_v3.3$ silvestre (Figura 22, Columna V1383G-GFP). Estos resultados sugieren que la ausencia o disminución de las corrientes en mutantes como G814P y V1383P es debida a un efecto de las mutaciones sobre el mecanismo funcional del canal y no a un efecto sobre el plegamiento y/o tráfico del canal hacia la membrana plasmática.

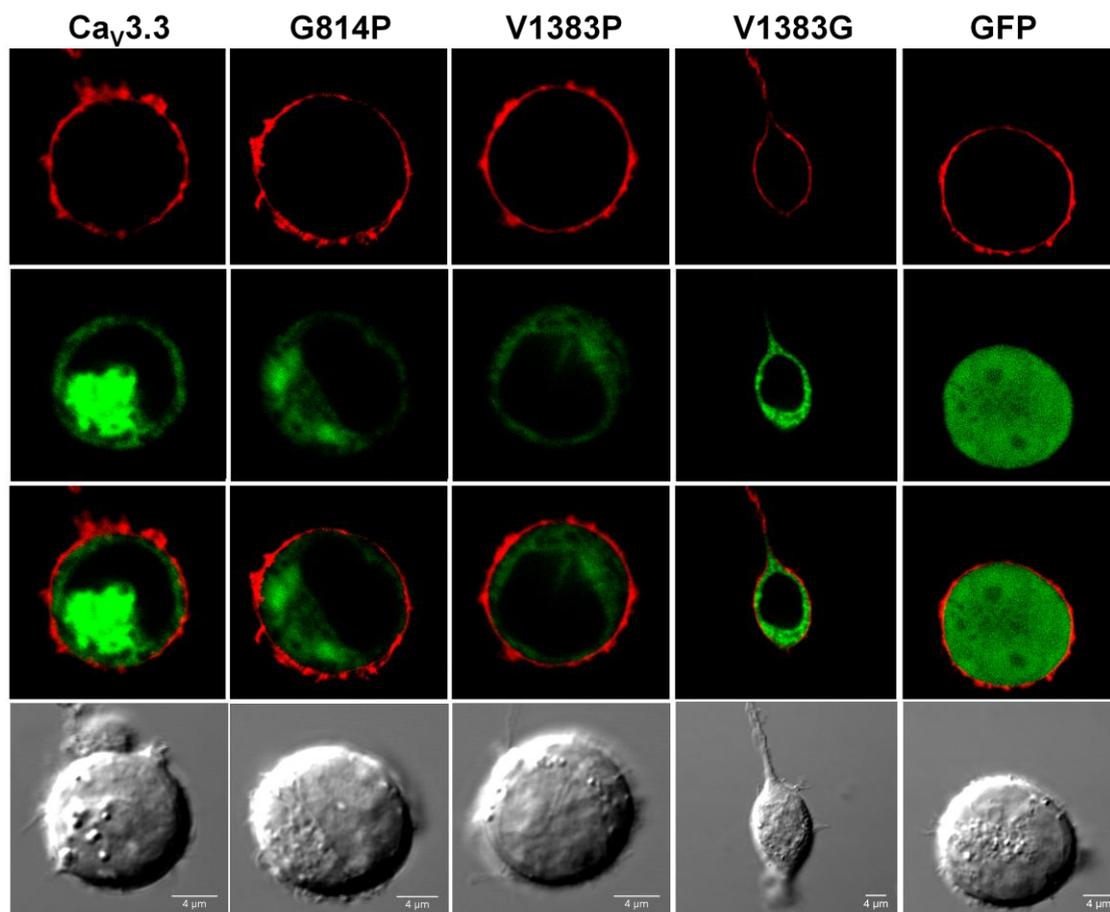


Figura 22. Ensayos de localización celular de los canales $Ca_v3.3$. El canal $Ca_v3.3$ silvestre y los canales mutantes G814P, V1383P y V1383G se fusionaron a la proteína verde fluorescente (GFP) mediante procedimientos de biología molecular, por lo que la señal de fluorescencia verde es indicativa de la localización del canal respectivo. La columna de la extrema derecha muestra una célula transfectada únicamente con el cDNA de la GFP. En la línea superior de imágenes se presenta la señal de la membrana (rojo) marcada con FM4-64. La segunda línea muestra la señal de la proteína del canal en verde. La tercera es el empalme de las primeras dos señales, mientras la línea inferior muestra las mismas imágenes en campo claro. La escala para todas las imágenes es de 4 μm . Las imágenes de los cuatro canales muestran que la distribución de los mismos tiende en mayor medida hacia la membrana celular. Las imágenes son representativas de 12 células del canal silvestre, 9 de G814P, 14 de V1383P, 12 de V1383G y 6 de GFP. En todos los casos la adquisición de las imágenes se realizó en distintos planos focales (Z) de la célula, manteniéndose constante la obtención de 10 cortes en Z para cada célula (cuyo grosor varió de 1.38 a 3.82 μm).

VII. DISCUSIÓN

Un aspecto crucial para el funcionamiento de un canal iónico como es el fenómeno mecánico que subyace la apertura de la compuerta de activación no ha sido todavía suficientemente estudiado en muchas familias de ellos, incluyendo los canales activados por voltaje, y el canal $Ca_v3.3$ no es la excepción. El surgimiento de los primeros reportes de estructuras cristalizadas de canales iónicos ha permitido generar nuevas perspectivas acerca de dicho proceso. En el presente trabajo de tesis, el empleo de técnicas de biología molecular y de electrofisiología nos permitió estudiar varios parámetros biofísicos de este canal de bajo umbral de activación, entre ellos los procesos de activación y desactivación del canal. Los resultados originales mostrados en el apartado anterior sugieren en conjunto que en el $Ca_v3.3$ el mecanismo involucrado en la apertura y el cierre de la compuerta de activación difiere del planteado para canales homotetraméricos de sodio y potasio. Tal mecanismo parece involucrar más elementos estructurales que el de estos últimos, ya que la mutación individual de las glicinas de los segmentos IS6 y IIS6, así como de la valina del IIS6 genera efectos contrastantes en la estabilidad del estado abierto del canal $Ca_v3.3$. A continuación se discute el significado de los resultados obtenidos y la relevancia de los mismos.

7.1. Las mutaciones puntuales en los segmentos S6 del canal $Ca_v3.3$ disminuyen significativamente la amplitud de las corrientes macroscópicas

Las 14 mutaciones estudiadas en el presente trabajo exhibieron invariablemente corrientes macroscópicas significativamente menores a las del canal $Ca_v3.3$ silvestre (Figura 16). Es probable que la sustitución de Gly385, Gly814 y Val1383 por los aminoácidos elegidos en este trabajo modifiquen la estructura del canal de tal forma que la apertura de estos se torne menos probable, lo cual explicaría la disminución de las corrientes macroscópicas. Varios trabajos previos han reportado efectos similares al mutar puntualmente residuos de los segmentos S6 de los canales Ca_v . Concretamente, cuando se realizaron mutaciones de la Gly422 y Gly770 del canal $Ca_v1.2$ (equivalente a la Gly385 y Gly814 de $Ca_v3.3$) se obtuvieron corrientes macroscópicas más pequeñas que la del canal $Ca_v1.2$ silvestre al ser expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* (Raybaud *et al.*, 2006). Interesantemente, en ese trabajo la mutación G770P produjo canales funcionales mientras que G422P y la doble mutante (G422P/G770P) no generaron corrientes medibles, resultado similar al obtenido en el presente trabajo de tesis (Figura 16). Lo anterior sugiere que el papel que juegan ambas glicinas (las del dominio I y II) en los canales $Ca_v1.2$ y $Ca_v3.3$ en la activación del canal es

similar, por lo que probablemente sea el mismo para todos los canales Ca_v . Otra evidencia en este sentido es que nuestra doble mutante G385A/G814A generó corrientes más pequeñas que las registradas para cada una de las mutaciones individuales (Figura 16 y 17), lo que sugiere que la disminución en movilidad de los dos segmentos S6 inducida por la ausencia de las Gly bisagras repercute directamente en la activación normal de los canales $Ca_v3.3$.

Por otro lado, mutaciones de residuos ubicados más cercanos a la cara intracelular del canal en el segmento S6 del dominio III de los canales $Ca_v3.1$ produjeron canales funcionales en todos los casos y la amplitud de las corrientes macroscópicas se mantuvo como la del canal silvestre, aumentando significativamente en algunos casos (Marksteiner *et al.*, 2001). Más contrastante aún resultan las mutaciones puntuales en el asa intracelular que une el dominio I y II de los canales $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$, las cuales generan corrientes macroscópicas de mayor magnitud que las del canal silvestre (Arias-Olguin *et al.*, 2008; Baumgart *et al.*, 2008). Una posible explicación para la disminución (y en algunos casos la ausencia) en las corriente macroscópicas observadas en el presente trabajo, es la ubicación estratégica de los aminoácidos mutados (Gly385, Gly814 y Val1383) en relación con la posible compuerta de activación del canal y a su vez con el filtro de selectividad del mismo.

El residuo Val1383 del segmento IIS6 parece tener un papel importante en el mecanismo de apertura del canal $Ca_v3.3$. El canal mutante V1383P no fue funcional (Figura 16), a diferencia de las mutaciones por Pro en los segmentos IS6 y IIS6, donde sí se presentan las glicinas bisagra y cuyas sustituciones por Pro generaron canales funcionales. Es decir, es probable que la interacción de la Val1383 con residuos de los segmentos IS6 y IIS6 resulte en una coordinación para el mecanismo de apertura del canal $Ca_v3.3$. Otra evidencia en este sentido se presenta con la mutación del mismo residuo por Gly (V1383G), la cual generó las corrientes macroscópicas más robustas después el canal $Ca_v3.3$ silvestre (Figura 17, IIS6). Como ya se mencionó, la Gly proporciona mayor flexibilidad (movilidad) a la α -hélice, en este caso del segmento IIS6, por lo que la apertura del canal no se ve afectada como en el caso de la Pro, la cual interrumpe la estructura en α -hélice haciéndola más rígida.

7.2 Los residuos bisagra Gly385 y Gly814, así como la Val1383 son importantes para el cierre del canal $Ca_v3.3$

El objetivo principal del presente trabajo fue abordar la posibilidad de que el mecanismo de apertura en el $Ca_v3.3$ estuviera mediado por residuos bisagra de manera similar a como ocurre

en canales de sodio y potasio. El proceso de cierre de la compuerta de activación fue, por lo tanto, un aspecto crucial para contribuir al entendimiento de cómo podría estar funcionando tal mecanismo. A partir del análisis de la cinética de las colas de corriente registradas mediante el protocolo de *I-V* instantánea (véase Métodos, apartado 5.4.3.4), se obtuvieron resultados contrastantes (ver Figura 21). Como denotan las constantes de tiempo de desactivación calculadas para las construcciones mutantes, al realizar la sustitución de la Gly bisagra de los dominios I y II por Pro, no genera necesariamente el mismo resultado. Dadas las propiedades que adoptan las α -hélices al sustituir una Gly por una Pro (es decir, ruptura de la estructura y mayor rigidez de la misma), cabría esperar que las mutantes G385P y G814P proporcionaran las evidencias cruciales sobre si dichas glicinas funcionan como bisagras en el mecanismo de apertura de los canales $Ca_v3.3$. Contrariamente, los resultados obtenidos sobre la cinética de cierre del canal fueron contrastantes: por un lado la mutante G385P aceleró significativamente la desactivación del canal mientras que la mutante G814P mostró evidencias de estabilizar el estado abierto del canal al enlentecer la transición del estado abierto al cerrado (Figura 21 *IS6* y *IIS6*). Las mutaciones por Ala en las mismas posiciones aceleraron o no modificaron dicha transición, lo cual es consistente con las propiedades de este aminoácido para preservar la estructura de una α -hélice, aunque con menor movilidad que la Gly (O'Neil & DeGrado, 1990; Chakrabarty *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren el mecanismo de cierre de los canales $Ca_v3.3$ involucra elementos estructurales adicionales a las Gly bisagra de los dominios I y II. Desafortunadamente, la doble mutante G385P/G814P resultó en canales no funcionales, por lo que no fue posible evaluar el efecto dual de la prolina sobre estas posiciones. En el canal de sodio NaChBac se observó que se requiere la contribución de al menos una de las glicinas bisagra para la iniciación del mecanismo de cierre del canal, aunque se requiere de las cuatro (la de cada dominio) para que se cierre completamente el canal (Zhao *et al.*, 2004). En este contexto, es probable que en los canales $Ca_v3.3$ de igual manera se requiera de la contribución de residuos bisagra de los dominios III y IV para completar el mecanismo de cierre del canal. Con el propósito de explorar con mayor detalle la contribución de las Gly bisagra de los dominios I y II se realizaron las mutaciones de éstas por Ser y Thr, buscando introducir cambios menos drásticos en la estructura de las α -hélices que los observados con las mutaciones por Pro, como se ha reportado previamente en canales HVA (Hohaus *et al.*, 2005). Sorprendentemente, las mutaciones derivaron en canales no funcionales o generando corrientes tan pequeñas que resultó imposible realizar un análisis confiable de las colas de corriente (Figura 16). Por su parte, la doble mutante G385A/G814A

exhibió una cinética de cierre significativamente más rápida que el canal Ca_v3.3 silvestre (Figura 21C), sugiriendo que al disminuir la movilidad de los segmentos IS6 y IIS6 (por la ausencia de la Gly bisagra en cada dominio), la compuerta de activación del canal se desplaza más rápidamente en su transición al estado cerrado. Al conferir una mayor rigidez a dichos segmentos mediante la introducción de las prolinas respectivas, la compuerta se desplaza más lentamente (G814P) o más rápidamente (G385P) que el canal Ca_v3.3 silvestre (Figura 21B y C, respectivamente).

Las mutaciones del dominio III, por otro lado, mostraron resultados de alguna manera inesperados. Las mutaciones se realizaron en la Val1383, que de acuerdo con alineamientos con canales de sodio y potasio se ubica en la posición equivalente de la Gly bisagra del dominio III (o tercer monómero en los que son homotetrámeros; ver Figura 10). La mutación de dicho residuo por Gly (V1383G) generó canales funcionales cuyas corrientes fueron comparables en magnitud a las del canal Ca_v3.3 silvestre. Además, esta mutante se caracterizó por poseer las corrientes con la cinética más lenta de todos los canales estudiados en el presente trabajo (Figura 20 *IIIS6* y 21D). Particularmente, la constante de tiempo de cierre de los canales de dicha mutante fue la más lenta junto con la registrada para la mutante G814P. Es decir, en este dominio la inserción de una Gly indujo una estabilización del canal en el estado abierto, haciendo que la compuerta de cierre del canal regrese a su configuración en reposo con una cinética sustancialmente más lenta (Figura 21D). En este caso no se obtuvieron canales funcionales con la mutación por Pro, pero sí cuando las sustituciones fueron por Ser o Thr (Figura 16D). El efecto sobre el cierre del canal de estas últimas fue nulo (V1383S) o exhibió una aceleración del mismo (V1383T), es decir, nuevamente un efecto contrario a lo predecible, pues podría presumirse que tanto Ser como Thr disminuyan significativamente la movilidad de las α -hélices, comparado con la Val (y aún en mayor medida con la Gly). Así, la sustitución de la Val1383 por aminoácidos que confieren mayor movilidad estabiliza el estado abierto del canal, mientras que las sustituciones que disminuyen la movilidad de la misma aceleran la transición del estado abierto al cerrado.

A la fecha no existen datos directos acerca del arreglo estructural del canal Ca_v3.3. Sin embargo, es probable que el aumento en la τ de desactivación (de G814P, por ejemplo) refleje una dificultad en la transición de las α -hélices a una posición de reposo, derivada del impedimento estérico causado por la presencia de la prolina. Interesantemente, si el canal silvestre contara con otra glicina en la posición 1383 del dominio III, el canal tendría una

cinética de cierre bastante más lenta de lo normal (ver Figura 21D), lo cual repercutiría directamente en un aumento en la cantidad de calcio que podría entrar al medio intracelular. Cabe recordar que los canales Ca_v3 se caracterizan por presentar una lenta desactivación, lo cual se traduce en una mayor entrada de Ca^{2+} a las células (neuronas principalmente). Por lo tanto, la presencia de una Val en esa posición asegura que el canal se cierre lo suficientemente rápido para evitar una entrada masiva del ion Ca^{2+} que pudiera ser nociva para la célula. Interesantemente, los canales de sodio sí presentan una Gly bisagra en el segmento S6 del dominio III, a pesar de lo cual tales canales se cierran 10-20 veces más rápido que los tres miembros de la subfamilia de canales Ca_v3 (Nigro *et al.*, 2011). Existe la hipótesis de que evolutivamente los canales Ca_v aparecieron en la naturaleza antes que los de sodio, y que ambos se originaron a partir de los canales de potasio (que tienen sólo seis regiones transmembranales, 6TM) por dos rondas de duplicación génica (Armstrong & Hille, 1998). Por ello, resulta intrigante la posibilidad de que en la segunda duplicación génica se haya incorporado una Gly en el tercer dominio de los canales de sodio, lo cual resultó en canales ultra rápidos; al insertar experimentalmente la tercera Gly en los canales Ca_v , éstos se cierran por el contrario más lentamente. Lo anterior sugiere que en el mecanismo de apertura de los canales Ca_v3 intervienen las dos Gly bisagra de los dominios I y II, así como la Val del dominio IIIS6, y seguramente otros elementos estructurales no identificados todavía.

7.3. La introducción de aminoácidos con baja preferencia por las α -hélices altera la dependencia al voltaje y cinética de la inactivación de los canales $Ca_v3.3$

Las curvas de inactivación en el estado estacionario (Figura 18) demostraron que las sustituciones por aminoácidos con menor propensión a formar estructuras en α -hélice (Pro, Ser y Thr) en cualquiera de los tres dominios explorados, resultaron en un corrimiento de dichas curvas hacia voltajes más negativos (de 5 a 10 mV; Tabla 2). Lo anterior implica que, a un voltaje dado, hay menos canales mutantes disponibles para ser abiertos, en comparación con los $Ca_v3.3$ silvestres.

La propiedad de los canales tipo T de activarse a valores de V_m fisiológicos, aunado al hecho de que un pequeño porcentaje de canales se encuentran disponibles para ser activados en ese mismo rango de voltajes (Figura 18B-D), les permite generar una corriente “de ventana”. Dicha corriente de ventana clásicamente se define como la región de empalme entre las curvas que describen la dependencia al voltaje de la activación y la inactivación en estado estacionario e implica que los canales se pueden abrir estocásticamente en los voltajes que

abarca dicha “ventana”. Por ejemplo, la mutación de Gly por Pro en el segmento IIS6 provocó una disminución importante en la proporción de canales que se pueden activar de manera aleatoria dentro de dicha ventana de corriente, como se observó en el *Inserto* de la Figura 18C. Usando los ajustes de los datos experimentales se calculó que el porcentaje de canales que se pueden abrir de manera aleatoria disminuyó de 0.6% en el canal $Ca_v3.3$ (a -62 mV) a 0.09% en el canal mutante (a -70 mV). Los valores se obtuvieron multiplicando el porcentaje de canales activados (curva de activación) por el porcentaje de canales disponibles para ser activados (curva de inactivación). Si bien una proporción mínima de los canales participa en la corriente de ventana, ésta es suficiente para incrementar las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , y provocar cambios en el V_m que pueden alterar el disparo neuronal (Serrano *et al.*, 1999; Crunelli *et al.*, 2005).

La cinética de inactivación del canal $Ca_v3.3$ fue principalmente afectada por las mutaciones en el dominio III (Figura 20, *IIS6*). Los determinantes estructurales de la inactivación en los canales Ca_v , y en particular de la subfamilia Ca_v3 , no son del todo conocidos. Las evidencias recabadas hasta ahora indican que no existe una estructura única responsable de este proceso, tal como ocurre en los canales de sodio (Stuhmer *et al.*, 1989; Kellenberger *et al.*, 1997); por el contrario, se han descrito varias regiones de la subunidad $\alpha 1$ que contribuyen a la cinética de inactivación de los canales Ca_v3 (Marksteiner *et al.*, 2001; Staes *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004; Baumgart *et al.*, 2008). Coincidentemente con nuestros resultados, el trabajo de Marksteiner y colaboradores (Marksteiner *et al.*, 2001) reportó la participación del segmento IIS6 en la inactivación del canal $Ca_v3.1$, otro miembro del grupo de canales tipo T. Dicho grupo de investigación encontró que los residuos Met1510, Phe1511 y Val1512, que se encuentran localizados más cercanos al extremo intracelular del segmento IIS6, tienen una participación relevante en la inactivación del canal $Ca_v3.1$. Nuestros resultados sugieren que en el proceso de inactivación del $Ca_v3.3$ podría estar participando también de manera relevante el segmento IIS6, ya que los efectos más drásticos sobre la cinética de inactivación se observaron en las mutaciones de la Val1383 del dominio IIS6 (Figura 20). Por último, la introducción de alaninas ocasionó los efectos más visibles sobre la recuperación de la inactivación de los canales $Ca_v3.3$. La recuperación de la inactivación en los Ca_v3 es un proceso lento, especialmente si se compara con el mismo evento en canales de sodio. La cinética de inactivación y la recuperación de la inactivación de los canales de calcio tipo T son determinantes críticos de la excitabilidad celular, en especial en lo que respecta a su actividad marcapasos (Huguenard & Prince, 1994). Si bien la mayoría de las sustituciones

ocasionaron que la constante de tiempo de recuperación de la inactivación aumentara en mayor o menor medida, es destacable que las mutantes G385A y G814A derivaron en una cinética de recuperación más lenta que la mutación por Pro en los mismos sitios, siendo la recuperación para la mutante G385P inclusive más rápida que la del canal $Ca_v3.3$ silvestre. Interesantemente, la mutación que tuvo la τ_h más grande de todas fue la doble mutante G385A/G814A, mayor incluso que la suma de sus mutaciones sencillas respectivas. Por el contrario, la introducción de una Pro en el dominio I y de una Gly en el dominio III aceleró modestamente la recuperación de la inactivación de los canales mutantes (Tabla 2).

7.4. El canal $Ca_v3.3$ posee un mecanismo de apertura diferente al de las glicinas bisagra

La glicina es un residuo único por su propiedad intrínseca de adoptar un intervalo de ángulos más amplio que cualquier otro aminoácido, lo que la convierte en un residuo ideal para originar rotaciones o giros en las estructuras proteicas como las α -hélices que conforman los segmentos transmembranales de los canales iónicos. La alta conservación de estos residuos aminoacídicos en segmentos análogos de numerosos canales de calcio, sodio y potasio activados por voltaje (y por otros estímulos), lo convierten en un mecanismo plausible para un canal de calcio activado por voltaje como el $Ca_v3.3$. La premisa de contar con residuos de Gly en los segmentos S6 se cumple, aunque sólo se presente en dos de los cuatro dominios del canal. Adicionalmente, la naturaleza homotetramérica de los canales de potasio conlleva una carga explícita de simetría, la cual no comparten los heterotetrámeros como los canales Ca_v .

Después de realizar mutaciones puntuales en los probables sitios equivalentes del $Ca_v3.3$, correspondientes a los segmentos transmembranales IS6, IIS6 y IIIS6, se observó que la contribución de cada uno de los tres residuos no es suficiente para explicar el mecanismo asociada a la activación o apertura del canal $Ca_v3.3$. Las contribuciones individuales de cada Gly parecen ser además contrastantes entre ellas, ya que la inserción de una Pro en el dominio IS6 aceleró la transición del canal al estado cerrado, mientras que la misma mutación en el dominio IIS6 estabilizó el estado abierto del canal (Figura 21). Lo anterior depende muy probablemente del contexto tridimensional de la proteína, el cual no fue abordado directamente en este trabajo de tesis. Los resultados sugieren la posibilidad de que la compuerta de activación esté regulada bajo un elemento estructural diferente, o adicional a las glicinas bisagra, como ya ha sido planteado para canales HVA (Hohaus *et al.*, 2005). No obstante, aún falta por explorar la posible contribución del segmento S6 del dominio IV.

VIII. CONCLUSIONES

1. Las mutaciones puntuales en los segmentos S6 del canal $Ca_v3.3$ disminuyen significativamente la amplitud de las corrientes macroscópicas, aunque no parece haber efectos significativos en la cantidad de canales que se trafican a la membrana plasmática.
2. Las mutaciones realizadas en el residuo Gly385 aceleraron el cierre de los canales y desplazaron la dependencia al voltaje de la activación a potenciales más positivos, estabilizando así el estado cerrado del canal.
3. La introducción de una Pro en el residuo Gly814 resulta en un cierre más lento del canal, al igual que en una inactivación más lenta, estabilizando el estado abierto del canal.
4. El residuo Val1383 tiene un papel importante en los mecanismos de inactivación y desactivación del canal $Ca_v3.3$. La introducción de una Gly enlentece notablemente ambos parámetros, mientras la inserción de una Ser o Thr los acelera.
5. Los resultados sugieren que el mecanismo de apertura de los canales $Ca_v3.3$ no reside en los mismos elementos estructurales del mecanismo de apertura mediado por las glicinas bisagra en canales homoméricos de canales de potasio y sodio.

IX. REFERENCIAS

- Alam, A. & Jiang, Y.X. 2009. High-resolution structure of the open NaK channel. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:30-34.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. Fifth Edition ed. Garland Publishing.
- Arias, J.M., Murbartian, J., Vitko, I., Lee, J.H., & Perez-Reyes, E. 2005. Transfer of beta subunit regulation from high to low voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* 579:3907-3912.
- Arias-Olguin, I.I., Vitko, I., Fortuna, M., Baumgart, J.P., Sokolova, S., Shumilin, I.A., Van Deusen, A., Soriano-Garcia, M., Gomora, J.C., & Perez-Reyes, E. 2008. Characterization of the Gating Brake in the I-II Loop of Cav3.2 T-type Ca²⁺ Channels. *J Biol Chem* 283:8136-8144.
- Arikkath, J. & Campbell, K.P. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.
- Armstrong, C.M. & Hille, B. 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20; 4:371-380.
- Armstrong, C.M. & Matteson, D.R. 1985. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227:65-67.
- Arteaga, R. 2007. Papel del triptófano en la región AID de los canales de calcio HVA en la modulación del canal de calcio alfa1G por subunidades beta. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Baumgart, J.P., Vitko, I., Bidaud, I., Kondratskyi, A., Lory, P., & Perez-Reyes, E. 2008. I-II loop structural determinants in the gating and surface expression of low voltage-activated calcium channels. *PLoS ONE* 3:e2976.
- Bean, B.P. 1985. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86:1-30.
- Bean, B.P. 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51:367-384.
- Benardeau, A., Weissenburger, J., Honddeghem, L., & Ertel, E.A. 2000. Effects of the T-type Ca(2+) channel blocker mibefradil on repolarization of guinea pig, rabbit, dog, monkey, and human cardiac tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 292:561-575.
- Berridge, M.J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499 (Pt 2):291-306.
- Bezanilla, F. 2008. Ion channels: from conductance to structure. *Neuron* 60:456-468.
- Bootman, M.D. & Berridge, M.J. 1995. The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83:675-678.
- Carbone, E. & Lux, H.D. 1984. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-502.
- Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall, W.A., Dib-Hajj, S., Meisler, M.H., & Pietrobon, D. 2008. Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases. *J Neurosci* 28:11768-11777.
- Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P., & Perez-Reyes, E. 2003. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* 55:579-581.
- Chakrabarti, R. & Chakrabarti, R. 2006. Calcium signaling in non-excitabile cells: Ca(2+) release and influx are independent events linked to two plasma membrane Ca(2+) entry channels. *Journal of Cellular Biochemistry* 99:1503-1516.
- Chakrabartty, A., Schellman, J.A., & Baldwin, R.L. 1991. Large Differences in the Helix Propensities of Alanine and Glycine. *Nature* 351:586-588.
- Chandy, K.G. & Gutman, G.A. 1993. Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci* 14:434.
- Colquhoun, D. & Sivilotti, L.G. 2004. Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. *Trends in Neurosciences* 27:337-344.
- Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., & Perez-Reyes, E. 1998. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
- Crunelli, V., Toth, T.I., Cope, D.W., Blethyn, K., & Hughes, S.W. 2005. The "window" T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states. *Journal of Physiology-London* 562:121-129.
- Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., Hernandez-Gonzalez, E.O., Nishigaki, T., Trevino, C.L., Wood, C., & Beltran, C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131:977-988.

- Ding, S., Ingleby, L., Ahern, C.A., & Horn, R. 2005. Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *J Gen Physiol* 126:213-226.
- Doering, C.J. & Zamponi, G.W. 2003. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.
- Dolphin, A.C., Wyatt, C.N., Richards, J., Beattie, R.E., Craig, P., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Volsen, S.G., & Perez-Reyes, E. 1999. The effect of $\alpha 2\delta$ and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel $\alpha 1G$. *J Physiol* 519 Pt 1:35-45.
- Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., & MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E., & Nargeot, J. 2004. Plasma membrane expression of T-type calcium channel $\alpha(1)$ subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *J Biol Chem* 279:29263-29269.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., & Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Ertel, S.I., Ertel, E.A., & Clozel, J.P. 1997. T-type Ca²⁺ channels and pharmacological blockade: potential pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther* 11:723-739.
- Fatt, P. & Ginsborg, B.L. 1958. The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J Physiol* 142:516-543.
- Fatt, P. & Katz, B. 1953. The Electrical Properties of Crustacean Muscle Fibres. *Journal of Physiology-London* 120:171-&.
- Flink, M.T. & Atchison, W.D. 2003. Ca²⁺ channels as targets of neurological disease: Lambert-Eaton Syndrome and other Ca²⁺ channelopathies. *J Bioenerg Biomembr* 35:697-718.
- Frazier, C.J., Serrano, J.R., George, E.G., Yu, X., Viswanathan, A., Perez-Reyes, E., & Jones, S.W. 2001. Gating kinetics of the $\alpha 1I$ T-type calcium channel. *J Gen Physiol* 118:457-470.
- Geduldig, D. & Gruener, R. 1970. Voltage Clamp of Aplysia Giant Neurone - Early Sodium and Calcium Currents. *Journal of Physiology-London* 211:217-&.
- George, A.L. 2005. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *Journal of Clinical Investigation* 115:1990-1999.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., Noda, M., Tamkun, M.M., Waxman, S.G., Wood, J.N., & Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28:365-368.
- Gomora, J.C., Daud, A.N., Weiergraber, M., & Perez-Reyes, E. 2001. Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol* 60:1121-1132.
- Gomora, J.C., Murbartian, J., Arias, J.M., Lee, J.H., & Perez-Reyes, E. 2002. Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys J* 83:229-241.
- Hagiwara, S. & Byerly, L. 1981. Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* 4:69-125.
- 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.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hardman, R.M., Dalibalta, S., & Mitcheson, J.S. 2005. The role of inner helix glycine residues in the activation gating of HERG potassium channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39:169-170.
- Hardman, R.M., Stansfeld, P.J., Dalibalta, S., Sutcliffe, M.J., & Mitcheson, J.S. 2007. Activation Gating of hERG potassium channels - S6 glycines are not required as gating hinges. *J Biol Chem* 282:31972-31981.
- Higueldo García, J. 2007. Efecto de las subunidades beta de los canales HVA sobre el canal Cav3.3. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM. México.
- Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952a. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952b. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116:449-472.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952c. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116:473-496.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., & KATZ, B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116:424-448.

- Hohaus, A., Beyl, S., Kudrnac, M., Berjukow, S., Timin, E.N., Marksteiner, R., Maw, M.A., & Hering, S.** 2005. Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal disorder. *J Biol Chem* 280:38471-38477.
- Huguenard, J.R.** 1996. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 58:329-348.
- Huguenard, J.R. & Prince, D.A.** 1994. Intrathalamic rhythmicity studied in vitro: nominal T-current modulation causes robust antioscillatory effects. *J Neurosci* 14:5485-5502.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** 2002a. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-522.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** 2002b. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417:523-526.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., & MacKinnon, R.** 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:42-48.
- Kellenberger, S., West, J.W., Catterall, W.A., & Scheuer, T.** 1997. Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 109:607-617.
- Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M.J., Kim, S.S., McEnery, M.W., & Shin, H.S.** 2001. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* 31:35-45.
- Krishtal, O.A. & Magura, I.S.** 1970. Calcium Ions As Inward Current Carriers in Mollusc Neurones. *Comparative Biochemistry and Physiology* 35:857-&.
- Kudrnac, M., Beyl, S., Hohaus, A., Stary, A., Peterbauer, T., Timin, E., & Hering, S.** 2009. Coupled and independent contributions of residues in IS6 and IIS6 to activation gating of CaV1.2. *J Biol Chem* 284:12276-12284.
- Lipscombe, D.** 2001. Ion Channels. In *Encyclopedia of Life Sciences*. L. John Wiley & Sons, editor. Chichester, UK. 1-9.
- Llinas, R., Sugimori, M., Hillman, D.E., & Cherksey, B.** 1992. Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* 15:351-355.
- Long, S.B., Campbell, E.B., & MacKinnon, R.** 2005. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science*.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., & MacKinnon, R.** 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450:376-382.
- Lopez-Charcas, O.** 2011. Efecto del fármaco amilorida sobre las propiedades biofísicas de los canales de calcio tipo T clonados de humano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.
- Magidovich, E. & Yifrach, O.** 2004. Conserved gating hinge in ligand- and voltage-dependent K⁺ channels. *Biochemistry* 43:13242-13247.
- Marksteiner, R., Schurr, P., Berjukow, S., Margreiter, E., Perez-Reyes, E., & Hering, S.** 2001. Inactivation determinants in segment IIS6 of Ca(v)3.1. *J Physiol* 537:27-34.
- Marty, A. and E. Neher.** 1995. Tight-seal whole-cell recording. In *Single Channel Recording*. B. Sakmann and E. Neher, editors. Plenum Press, New York. 31-52.
- McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W., & Yoshikami, D.** 1987. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4327-4331.
- Miller, R.J.** 1987. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235:46-52.
- Mintz, I.M., Adams, M.E., & Bean, B.P.** 1992. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9:85-95.
- Mitterdorfer, J., Grabner, M., Kraus, R.L., Hering, S., Prinz, H., Glossmann, H., & Striessnig, J.** 1998. Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:319-334.
- Miyasho, T., Takagi, H., Suzuki, H., Watanabe, S., Inoue, M., Kudo, Y., & Miyakawa, H.** 2001. Low-threshold potassium channels and a low-threshold calcium channel regulate Ca²⁺ spike firing in the dendrites of cerebellar Purkinje neurons: a modeling study. *Brain Res* 891:106-115.
- Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., & MacKinnon, R.** 2001. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414:37-42.
- Neher, E. & Sakmann, B.** 1976. Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. *J Physiol* 258:705-729.

- Nelson, M.T., Todorovic, S.M., & Perez-Reyes, E.** 2006. The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Curr Pharm Des* 12:2189-2197.
- Nigro, M.J., Perin, P., & Magistretti, J.** 2011. Differential effects of Zn(2+) on activation, deactivation, and inactivation kinetics in neuronal voltage-gated Na(+) channels. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 462:331-347.
- Nilius, B., Hess, P., Lansman, J.B., & Tsien, R.W.** 1985. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316:443-446.
- Nimigean, C.M. & Allen, T.W.** 2011. Origins of ion selectivity in potassium channels from the perspective of channel block. *Journal of General Physiology* 137:405-413.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., & .** 1984. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T., & Numa, S.** 1982. Primary Structure of Alpha-Subunit Precursor of Torpedo-Californica Acetylcholine-Receptor Deduced from Cdna Sequence. *Nature* 299:793-797.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T., & Numa, S.** 1983. Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302:528-532.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., & Tsien, R.W.** 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- O'Neil, K.T. & DeGrado, W.F.** 1990. A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* 250:646-651.
- Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N., & Jan, L.Y.** 1987. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science* 237:749-753.
- Park, J.Y., Kang, H.W., Jeong, S.W., & Lee, J.H.** 2004. Multiple structural elements contribute to the slow kinetics of the Cav3.3 T-type channel. *J Biol Chem* 279:21707-21713.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W.A.** 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475:353-U104.
- Perez-Reyes, E.** 1999. Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol Life Sci* 56:660-669.
- Perez-Reyes, E.** 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
- 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.
- Petsko, G.A. and D.Ringe.** 2004. Protein structure and function. New Science Press Ltd, London, UK.
- Raftery, M.A., Hunkapiller, M.W., Strader, C.D., & Hood, L.E.** 1980. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208:1454-1456.
- Raja-Rayan, D.L. and M.G.Hanna.** 2010. Ion Channels and Human Disorders. In Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 1-13.
- Randall, A. & Benham, C.D.** 1999. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* 14:255-272.
- Randall, A. & Tsien, R.W.** 1995. Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:2995-3012.
- Raybaud, A., Dodier, Y., Bissonnette, P., Simoes, M., Bichet, D.G., Sauve, R., & Parent, L.** 2006. The role of the GX(9)GX(3)G motif in the gating of high voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 281:39424-39436.
- Sands, Z., Grottesi, A., & Sansom, M.S.** 2005. Voltage-gated ion channels. *Curr Biol* 15:R44-R47.
- Sather, W.A. & McCleskey, E.W.** 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol* 65:133-159.
- Serrano, J.R., Perez-Reyes, E., & Jones, S.W.** 1999. State-dependent inactivation of the alpha1G T-type calcium channel. *J Gen Physiol* 114:185-201.
- Staes, M., Talavera, K., Klugbauer, N., Prenen, J., Lacinova, L., Droogmans, G., Hofmann, F., & Nilius, B.** 2001. The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel alpha1G. *J Physiol* 530:35-45.
- Stary, A., Shafrir, Y., Hering, S., Wolschann, P., & Guy, H.R.** 2008. Structural model of the Ca^v1.2 pore. *Channels (Austin)* 2:210-215.

- Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., & Numa, S.** 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339:597-603.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., & Numa, S.** 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
- Thompson, W.R., Majid, A.S., Czymmek, K.J., Ruff, A.L., Garcia, J., Duncan, R.L., & Farach-Carson, M.C.** 2011. Association of the alpha(2)delta(1) Subunit With Ca(v)3.2 Enhances Membrane Expression and Regulates Mechanically Induced ATP Release in MLO-Y4 Osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* 26:2125-2139.
- Tikhonov, D.B. & Zhorov, B.S.** 2011. Possible Roles of Exceptionally Conserved Residues around the Selectivity Filters of Sodium and Calcium Channels. *J Biol Chem* 286:2998-3006.
- Todorovic, S.M. & Jevtovic-Todorovic, V.** 2011. T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. *British Journal of Pharmacology* 163:484-495.
- Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y.** 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:23-52.
- Tsien, R.W., Fox, A.P., Hess, P., McCleskey, E.W., Nilius, B., Nowycky, M.C., & Rosenberg, R.L.** 1987. Multiple types of calcium channel in excitable cells. *Soc Gen Physiol Ser* 41:167-187.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R., & Fox, A.P.** 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11:431-438.
- Unwin, N.** 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology* 346:967-989.
- Vassort, G. & Alvarez, J.** 1994. Cardiac T-type calcium current: pharmacology and roles in cardiac tissues. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5:376-393.
- Yuan, P., Leonetti, M.D., Pico, A.R., Hsiung, Y.C., & MacKinnon, R.** 2010. Structure of the Human BK Channel Ca(2+)-Activation Apparatus at 3.0 angstrom Resolution. *Science* 329:182-186.
- Zhao, Y., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., & Catterall, W.A.** 2004. A gating hinge in Na⁺ channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* 41:859-865.